

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Parentalstamm-Charakterisierung

Zu Beginn der experimentellen Untersuchungen wurde der Inzuchtgrad der verwendeten Rattenstämme MWF und Lew über eine systematische Genom-Analyse überprüft. Alle Tiere innerhalb eines Stammes wiesen nach der Genotypisierung dasselbe homozygote Bandenmuster auf und zeigten damit an den jeweils untersuchten Loci genetische Homogenität. Eventuelle Tierverwechslungen zwischen den Stämmen wurden auf diese Weise ausgeschlossen.

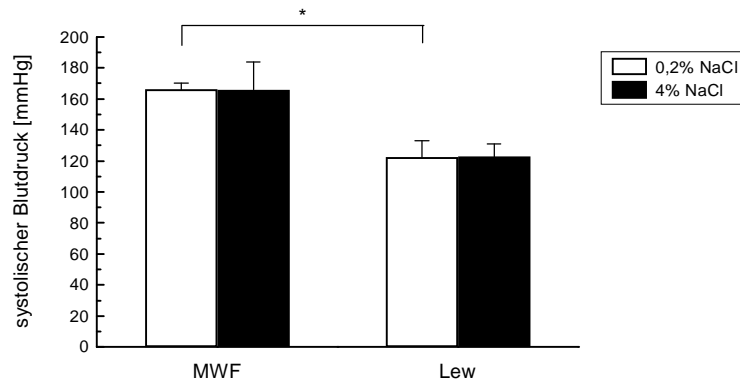
#### 3.1.1 Phänotypisierung der Parentalstämme MWF und Lew

##### 3.1.1.1 Phänotypische Charakterisierung und Untersuchung auf Salzsensitivität

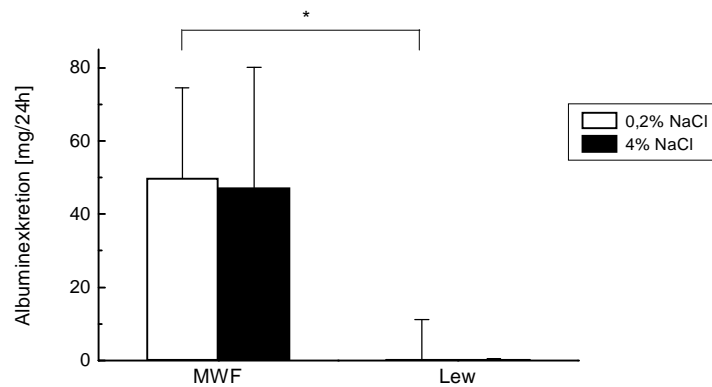
Zur Klärung der Frage, ob der angeborene Nierendefekt der MWF-Ratten ursächlich mit einer Salzsensitivität der Hypertonie assoziiert ist, wurden in der 6.-18. Woche jeweils eine Gruppe männlicher MWF-Ratten und eine Gruppe männlicher Lew-Ratten (Kontrollstamm) auf eine Hochsalzdiät (4% NaCl im Futter) bzw. auf eine Normaldiät (0,2% NaCl im Futter) gesetzt. Die Phänotypisierung der Tiere erfolgte in der 14. Woche mit Hilfe biochemischer Analysen sowie Messungen des systolischen Blutdrucks.

Die MWF-Männchen zeigten unter Normaldiät einen signifikant erhöhten systolischen Blutdruck von  $166,0 \pm 4,3$  mmHg ( $p < 0,0001$ ), die Lew-Männchen blieben normotensiv mit Werten von  $122,4 \pm 10,8$  mmHg. Die Verabreichung einer Hochsalzdiät (4% NaCl) ließ keinen signifikanten Blutdruckanstieg erkennen (Abb. 7).

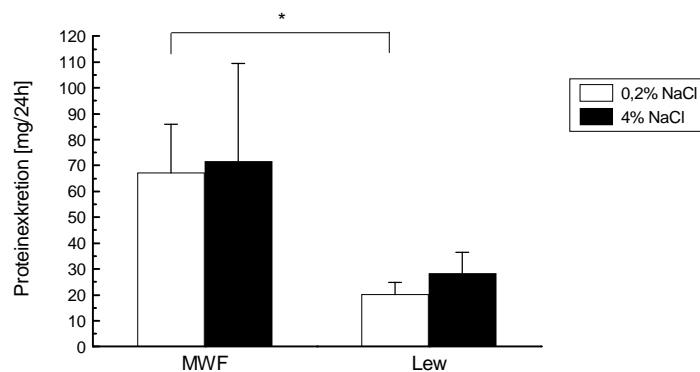
Mit Hilfe des zum spezifischen Nachweis von Rattenalbumin etablierten ELISA-Assays konnte für die Albuminurie als wichtigsten, quantitativ erfaßbaren Phänotyp der Studie bei den MWF-Männchen unter basalen Bedingungen als auch unter Salzbelastung ein hoch signifikanter Anstieg auf Werte von  $49,86 \pm 24,77$  mg/24h bzw.  $47,24 \pm 33,01$  mg/24h ( $p < 0,0001$ ) nachgewiesen werden. Bei den Lew-Männchen wurde dagegen eine Albuminexkretion von  $0,35 \pm 0,22$  mg/24h bzw.  $0,38 \pm 0,18$  mg/24h gemessen. Der Grad der Albuminurie differierte bei den Stämmen MWF und Lew beträchtlich um den Faktor 143 bzw. 124 (Abb. 8, Tab. 5).



**Abb. 7: Systolischer Blutdruck bei männlichen MWF- und Lew-Ratten (n=8) in der 14. Woche. \* MWF vs. Lew,  $p < 0,0001$ .**



**Abb. 8: Albuminexkretion bei männlichen MWF- und Lew-Ratten (n=8) in der 14. Woche. \* MWF vs. Lew,  $p < 0,0001$ .**



**Abb. 9: Gesamtprotein-Exkretion bei männlichen MWF- und Lew-Ratten (n=8) in der 14. Woche. \* MWF vs. Lew,  $p < 0,0001$ .**

Die Gesamtprotein-Exkretion männlicher MWF-Tiere zeigte im Vergleich zu männlichen Lew-Tieren unter basalen Bedingungen einen signifikanten Anstieg auf  $67,2 \pm 18,8$  mg/24h vs.  $20,2 \pm 4,7$  mg/24h ( $p < 0,0001$ ), unter Hochsalzdiät hingegen trat keine signifikante Steigerung der Gesamtprotein-Exkretion auf (Abb. 9, Tab. 5).

**Tab. 5: Biochemische Untersuchungen in Serum und Urin bei männlichen MWF- und Lew-Ratten (n=8) in der 14. Woche.**

	MWF 0,2% NaCl	MWF 4% NaCl	Lew 0,2% NaCl	Lew 4% NaCl	ANOVA Stamm	ANOVA Diät
<b>Serum</b>						
Natrium [mmol/l]	142,5±2,2	143,0±2,8	141,1±1,2	145,0±1,6	p=0,68	p=0,01
Kreatinin [mmol/l]	0,043±0,009	0,041±0,008	0,037±0,002	0,041±0,003	p=0,28	p=0,72
<b>Urin</b>						
Urinvolumen [ml/24h]	12,5±5,0	35,4±6,2	8,6±1,8	24,6±3,8	p=0,0001	p<0,0001
Natrium [mmol/24h]	1,21±0,38	11,36±1,10	1,02±0,20	8,99±2,86	p=0,03	p<0,0001
Kreatinin-Clearance [μl/sec•100 g]	7,82±2,44	6,65±1,20	6,52±0,69	7,21±2,44	p=0,60	p=0,73
Gesamtprotein-Exkretion [mg/24h]	67,2±18,8	71,6±38,0	20,2±4,7	28,3±8,1	p<0,0001	p=0,39
Albuminexkretion [mg/24h]	49,86±24,77	47,24±33,01	0,35±0,22	0,38±0,18	p<0,0001	p=0,85

Die biochemischen Daten wiesen hinsichtlich der Konzentration an Natriumionen im Serum zwischen den unter Basalbedingungen gehaltenen Parentalstämmen MWF und Lew keine signifikanten Unterschiede auf. Bei Gabe einer Hochsalzdiät konnte bei beiden Stämmen ein leicht signifikanter Anstieg verzeichnet werden ( $p=0,01$ ). Signifikante Unterschiede der Kreatininkonzentrationen im Serum wurden zwischen den Parentalstämmen nach Gabe einer Normal- bzw. Hochsalzdiät nicht beobachtet.

Die Einzeldaten sind in Tab. 5 visualisiert.

Die Urinvolumina (Tab. 5) ließen unter Basalbedingungen in der 14. Lebenswoche bei den MWF-Männchen im Vergleich zu den Lew-Männchen signifikante Unterschiede erkennen ( $12,5 \pm 5,0$  ml/24h bzw.  $8,6 \pm 1,8$  ml/24h,  $p < 0,0001$ ). Unter Salzbelastung kam es zu signifikanten Anstiegen bei MWF- und Lew-Ratten auf Werte von  $35,4 \pm 6,2$  ml/24h bzw.  $24,6 \pm 3,8$  ml/24h ( $p < 0,0001$ ).

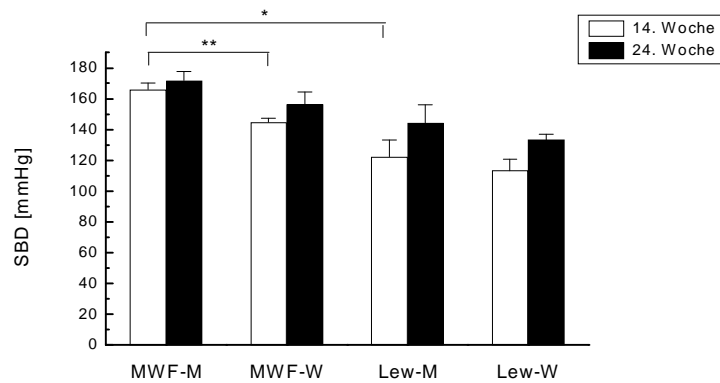
Die Natriumexkretion im Urin zeigte unter basalen Bedingungen bei beiden Stämmen ähnliche Werte von  $1,21 \pm 0,38$  mmol/24h bzw. von  $1,02 \pm 0,20$  mmol/24h. Unter Salzbelastung wurde ein hoch signifikanter Anstieg in beiden Stämmen auf Werte von  $11,36 \pm 1,10$  mmol/24h bzw.  $8,99 \pm 2,86$  mmol/24h ( $p < 0,0001$ ) verzeichnet (Tab. 5).

Die Kreatinin-Clearance ließ zwischen den Parentalstämmen weder unter Normalbedingungen noch unter Salzbelastung signifikante Unterschiede erkennen (Tab. 5).

### **3.1.1.2 Vergleich der Phänotypen männlicher und weiblicher MWF- und Lew-Ratten**

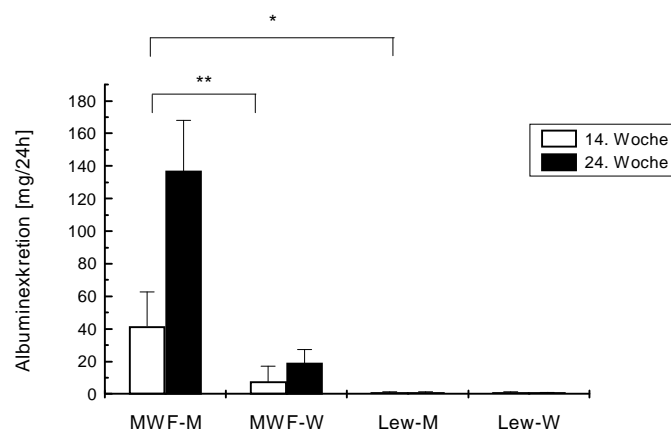
Zur phänotypischen Charakterisierung männlicher und weiblicher MWF- und Lew-Ratten wurden in der 14. und 24. Woche Messungen des systolischen Blutdrucks vorgenommen, die Albuminexkretion quantitativ ermittelt und die Befunde vergleichend bewertet (Tab. 6).

Männliche MWF-Ratten wiesen in der 14. Woche einen systolischen Blutdruck von  $166,0 \pm 4,3$  mmHg auf, der in der 24. Woche auf Werte von  $171,7 \pm 6,0$  mmHg angestiegen war (Abb. 10). Die Blutdruckwerte weiblicher MWF-Ratten lagen in der 14. Woche bei  $144,7 \pm 2,8$  mmHg und hatten sich in der 24. Woche auf  $156,4 \pm 8,1$  mmHg erhöht. Bei männlichen Lew-Ratten wurden in der 14. Woche Blutdruckwerte von  $122,4 \pm 10,8$  mmHg und in der 24. Woche von  $144,4 \pm 11,6$  mmHg ermittelt. Dagegen wurden bei den weiblichen Lew-Tieren in der 14. Woche die niedrigsten Blutdrücke von  $113,4 \pm 7,2$  mmHg gemessen, die sich zur 24. Woche auf  $133,4 \pm 3,4$  mmHg potenzierten. Die Unterschiede zwischen den Stämmen und zwischen den Geschlechtern waren in der 14. als auch in der 24. Woche hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ).



**Abb. 10: Systolischer Blutdruck (SBD) bei männlichen (M) und weiblichen (W) MWF- und Lew-Ratten (n=10). \* MWF vs. Lew 14. und 24. Woche,  $p < 0,0001$ ; \*\* männliche vs. weibliche Ratten 14. und 24. Woche,  $p < 0,0001$ .**

Männliche MWF-Ratten zeigten in der 14. Woche eine Albuminexkretion von  $41,61 \pm 21,02$  mg/24h, die in der 24. Woche auf Werte von  $136,92 \pm 31,17$  mg/24h deutlich anstieg (Abb. 11). Die Albuminexkretion weiblicher MWF-Ratten lag in der 14. Woche bei  $0,98 \pm 0,67$  mg/24h und erreichte in der 24. Woche Werte von  $19,25 \pm 7,99$  mg/24h. Männliche und weibliche Lew-Ratten wiesen Werte unter  $0,62$  mg/24h auf, so daß zwischen den Stämmen in der 14. Woche ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0007$ ) und in der 24. Woche ein hoch signifikanter Unterschied vorlag ( $p < 0,0001$ ). Zwischen männlichen und weiblichen Tieren wurde in der 14. als auch in der 24. Woche ein hoch signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ) beobachtet.



**Abb. 11: Albuminexkretion bei männlichen (M) und weiblichen (W) MWF- und Lew-Ratten (n=10). \* MWF vs. Lew 14. Woche,  $p < 0,0007$  und 24. Woche,  $p < 0,0001$ ; \*\* männliche vs. weibliche Ratten 14. und 24. Woche,  $p = 0,0001$ .**

**Tab. 6: Phänotypische Charakterisierung von weiblichen (W) und männlichen (M) MWF- und Lew-Ratten (n=10).**

	<b>systolischer Blutdruck [mmHg]</b>	<b>Albuminexkretion [mg/24h]</b>
<b>MWF-M 14. Woche</b>	166,0±4,3	41,61±21,02
<b>MWF-M 24. Woche</b>	171,7±6,0	136,92±31,17
<b>MWF-W 14. Woche</b>	144,7±2,8	0,98±0,67
<b>MWF-W 24. Woche</b>	156,4±8,1	19,25±7,99
<b>Lew-M 14. Woche</b>	122,4±10,8	0,35±0,22
<b>Lew-M 24. Woche</b>	144,4±11,6	0,31±0,14
<b>Lew-W 14. Woche</b>	113,4±7,2	0,62±0,26
<b>Lew-W 24. Woche</b>	133,4±3,4	0,15±0,03
<b>Statistik</b>		
<b>ANOVA Stamm 14. Woche</b>	p<0,0001	p=0,0007
<b>ANOVA Stamm 24. Woche</b>	p<0,0001	p<0,0001
<b>ANOVA Geschlecht 14. Woche</b>	p<0,0001	p=0,0001
<b>ANOVA Geschlecht 24. Woche</b>	p<0,0001	p<0,0001

Um die Entwicklung der altersabhängigen Albuminurie bei MWF-Männchen, MWF-Weibchen und bei Lew-Weibchen zu dokumentieren, wurde die Albuminexkretion zu verschiedenen Zeitpunkten im 24-Stunden-Urin bis zum natürlichen Tod der Tiere ermittelt und parallel dazu das Lebensalter der Ratten bestimmt. Da Lew-Männchen gesund sind und keinen pathologischen Albuminurieverlauf zeigen (Rittinghausen, 1985), wurde auf eine Verlaufsstudie verzichtet.

Die Einzeldaten werden in Tab. 7 präsentiert.

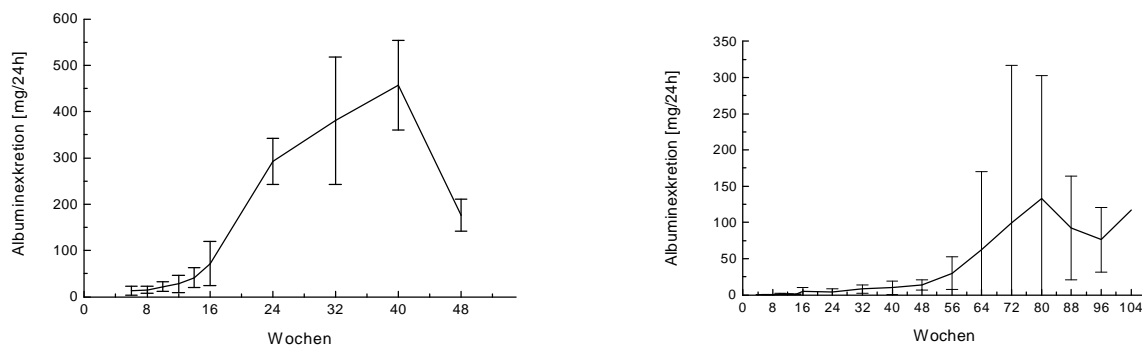
Tab. 7: Altersabhängiger Albuminurieverlauf bei MWF- und Lew-Ratten (n=12).

	Albuminexkretion im Urin [mg/24h]		
	MWF-Männchen	MWF-Weibchen	Lew-Weibchen
5. Woche		0,26±0,09 0,25±0,07	0,59±0,28 0,63±0,15
6. Woche	13,27±10,17	0,30±0,10 0,36±0,11	0,65±0,23 0,77±0,30
7. Woche		0,45±0,18 0,62±0,45	0,90±0,41 0,84±0,33
8. Woche	14,77±7,72	0,49±0,27 0,55±0,47	0,94±0,36 0,92±0,36
10. Woche	21,97±10,31	1,50±0,83	1,03±0,46
12. Woche	27,87±18,34	1,20±0,61	0,83±0,31
14. Woche	41,61±21,02	0,98±0,67	0,71±0,46
16. Woche	71,84±47,65	4,90±5,73	0,43±0,15
24. Woche	293,10±49,86	4,04±4,72	0,18±0,11 (n=10)
32. Woche	380,32±137,53	8,41±5,91	0,10±0,04 (n=9)
40. Woche	457,31±96,33	10,09±9,40	0,46±0,76 (n=9)
48. Woche	176,25±35,00 (n=6)	13,94±7,00	0,39±0,63 (n=9)
56. Woche		30,09±22,44 (n=11)	1,35±3,01 (n=9)
64. Woche		62,17±107,57 (n=9)	1,51±1,52 (n=8)
72. Woche		99,37±217,55 (n=9)	2,56±3,93 (n=6)
80. Woche		133,08±169,74 (n=7)	0,71±0,14 (n=4)
88. Woche		92,58±71,59 (n=6)	3,26±0,00 (n=1)
96. Woche		76,19±45,02 (n=5)	
104. Woche		117,45±65,72 (n=3)	

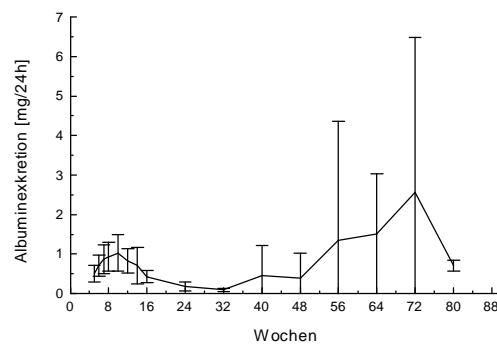
Die MWF-Männchen zeigten in der 6. Woche eine Albuminexkretion mit Werten von 13,27±10,17 mg/24h. Zwischen der 8.-40. Woche imponierte ein starker Anstieg der Albuminwerte auf 457,31±96,33 mg/24h, die sich jedoch bis zur 48. Woche auf 176,25±35,00 mg/24h reduzierten (Abb. 12).

Die Albuminkonzentrationen lagen bei den MWF-Weibchen zwischen der 5.-8. Woche unter 0,62 mg/24h und erhöhten sich dann bis zur 80. Woche auf Werte von 133,08±169,74 mg/24h. Ab dem 20. Monat wurde eine leichte Minderung der Albuminurie beobachtet (Abb. 12).

Lew-Weibchen wiesen bis zur 48. Woche eine Albuminurie unter 1 mg/24h auf. Ab der 56. Woche stiegen die Werte nur geringfügig auf 2,56±3,93 mg/24h an. Innerhalb der einzelnen Gruppen wurde vor allem bei den weiblichen Tieren eine deutliche Varianz der Werte auffällig (Abb. 13).



**Abb. 12: Albuminurieverlauf bei MWF-Männchen (li.) und MWF-Weibchen (re.), n=12.**



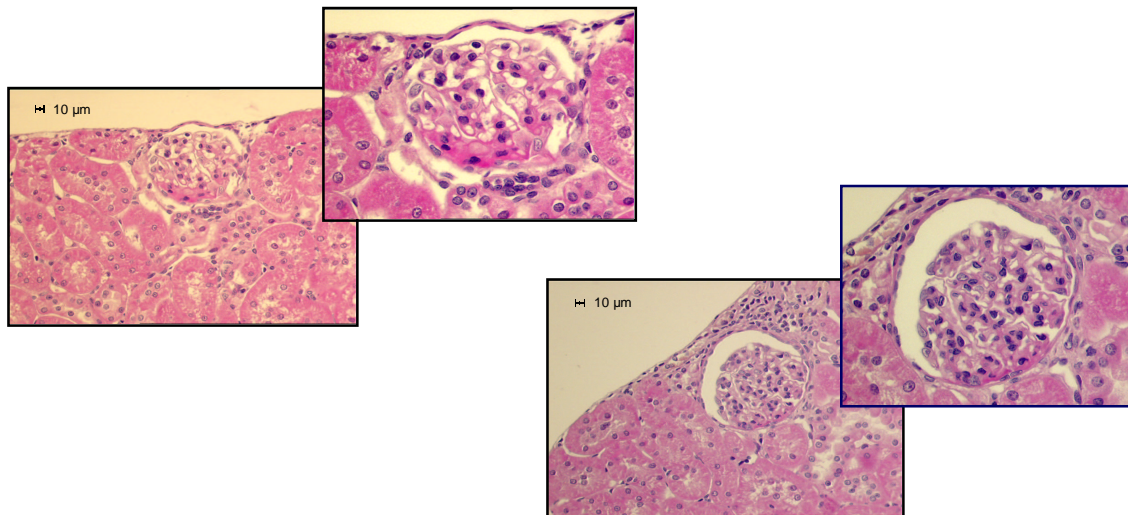
**Abb. 13: Albuminurieverlauf bei Lew-Weibchen (n=12).**

Die Lebenserwartung männlicher MWF-Ratten wurde auf ca. 11-18 Monate bestimmt, wohingegen MWF-Weibchen ungefähr 14-30 Monate leben. Nach Literaturangaben beträgt die mittlere Lebenserwartung gesunder weiblicher und männlicher Lew-Ratten ca. 28-33 Monate (Baum et al., 1995).

### 3.1.1.3 Nieren-Histologie

Die Nieren männlicher MWF-Ratten wiesen in der 18. Woche in der äußeren Zone der Nierenrinde subkapsuläre Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt (Abb. 14) auf. Bei männlichen Lew-Ratten wurde dagegen eine glomerulifreie Zone unter der Nierenkapsel, der sog. Cortex Corticis, beobachtet.





**Abb. 14: Histologische Nierenquerschnitte der MWF-Ratte in der 18. Woche. Subkapsuläres Glomerulum mit (li.) und ohne Kapselkontakt (re.) im Cortex Corticis (HE-Färbung, Vergrößerung 200fach bzw. 400fach).**

Die histologischen Befunde ergaben zwischen männlichen und weiblichen Tieren beider Stämme für den Phänotyp subkapsuläre Glomeruli ohne Kapselkontakt keine signifikanten Unterschiede. Bei Vergleich der Parentalstämme beeindruckte bei den MWF-Ratten eine signifikant erhöhte Anzahl subkapsulärer Glomeruli ohne Kapselkontakt ( $p < 0,0001$ ). Subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt waren bei den MWF-Weibchen mit einer hoch signifikant höheren Anzahl zu beobachten als bei den MWF-Männchen. Auch der Parentalstamm MWF zeigte bezüglich der Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit Kapselkontakt hoch signifikant höhere Werte als der Referenzstamm Lew ( $p < 0,0001$ ). Die Befunde sind in Tab. 8 dargestellt.

**Tab. 8: Auswertung der Nierenhistologie bei männlichen und weiblichen MWF- und Lew-Ratten (n=10) in der 24. Woche. Anzahl der Glomeruli bezogen auf einen Nierenquerschnitt.**

	Anzahl subkapsulärer Glomeruli ohne Kapselkontakt	Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit Kapselkontakt
<b>MWF-Männchen</b>	19,4±4,0	2,9±1,6
<b>MWF-Weibchen</b>	21,1±3,2	6,3±1,7
<b>Lew-Männchen</b>	6,3±3,1	0,0±0,0
<b>Lew-Weibchen</b>	8,2±3,2	0,0±0,0
<b>ANOVA Stamm</b>	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
<b>ANOVA Geschlecht</b>	$p = 0,28$	$p < 0,0001$

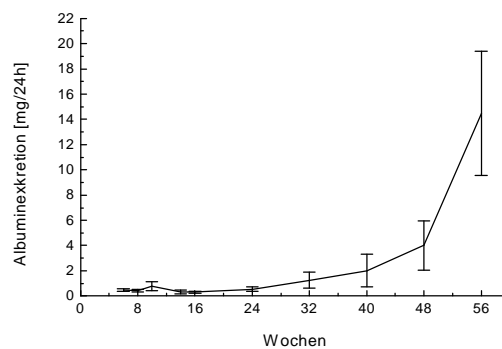
## 3.2 Kosegregationsanalyse

### 3.2.1 Phänotypisierung der Backcross-Population Lew x MWF

Bei den für die Kosegregationsanalyse eingesetzten drei MWF-Männchen wurden die Albuminexkretionen im Urin zur Kontrolle bestimmt. Die drei Parentaltiere wiesen im Alter zwischen 13-18 Monaten Albuminwerte von 185,13 mg/24h, 434,50 mg/24h und 756,80 mg/24h auf.

Um zu untersuchen, ob die F1-Männchen der Backcrosszucht Lew x MWF phänotypisch unauffällig waren, wurden die Albuminexkretionen bei den F1-Männchen regelmäßig bis zum 14. Lebensmonat gemessen (Abb. 15).

Die Lew x MWF F1-Männchen zeigten zwischen der 6.-24. Woche Albuminwerte unter  $0,55 \pm 0,17$  mg/24h. Von der 32.-48. Woche lagen die Exkretionen zwischen  $1,26 \pm 0,65$ - $4,01 \pm 1,95$  mg/24h und erst ab der 56. Woche stiegen sie auf  $14,48 \pm 4,93$  mg/24h an.



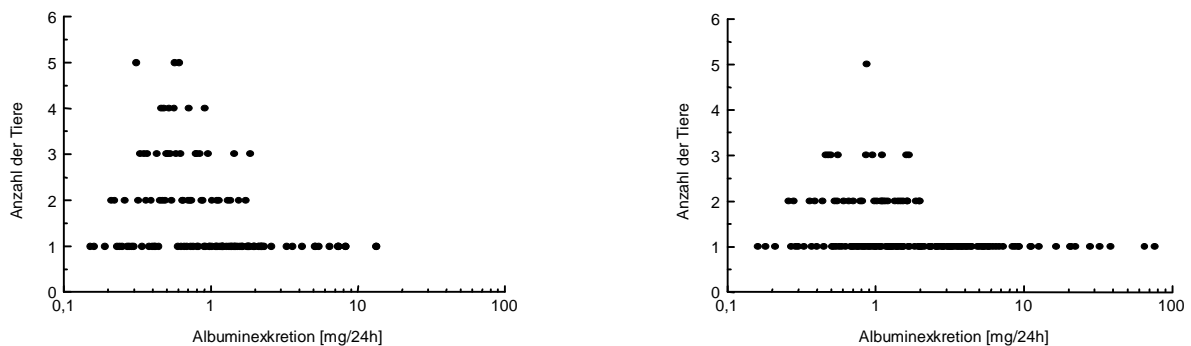
**Abb. 15: Albuminurieverlauf bei Lew x MWF F1 (n=12).**

Der systolische Blutdruck der Lew x MWF F1-Männchen lag in der 14. Woche im Bereich von  $134,8 \pm 6,8$  mmHg und damit zwischen den Blutdruckwerten der Parentaltiere MWF und Lew.

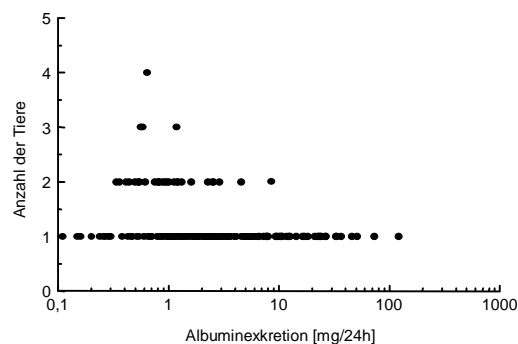
**Tab. 9: Systolischer Blutdruck (SBD), Gesamtprotein- und Albumin-Exkretion (UAE) im Urin bei Lew x MWF-Backcross-Tieren (n=213).**

	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimalwert	Maximalwert	Varianz
<b>SBD [mmHg] 14. Woche</b>	160,4	13,4	136,7	214,2	178,8
<b>SBD [mmHg] 24. Woche</b>	159,9	15,2	117,5	216,7	231,7
<b>UAE [mg/24h] 8. Woche</b>	1,10	1,41	0,15	13,35	2,00
<b>UAE [mg/24h] 14. Woche</b>	3,05	6,52	0,05	65,15	42,48
<b>UAE [mg/24h] 24. Woche</b>	4,78	8,89	0,11	73,00	79,08
<b>Gesamtprotein [mg/24h] 24. Woche</b>	17,5	15,6	3,4	162,6	244,2

Bei den 213 Backcross-Tieren wurden zur Erfassung genetischer Faktoren mit einem altersabhängigen Effekt („age of onset“) in der 8. Woche Albuminexkretionen zwischen 0,15-13,35 mg/24h (MW=1,10±1,41 mg/24h), in der 14. Woche zwischen 0,05-65,15 mg/24h (MW=3,05±6,52 mg/24h) und in der 24. Woche zwischen 0,11-73,00 mg/24h (MW=4,78±8,89 mg/24h) gemessen (Tab. 9, Abb. 16-17). Zu allen drei Zeitpunkten deutet sich eine unimodale Normalverteilung an.

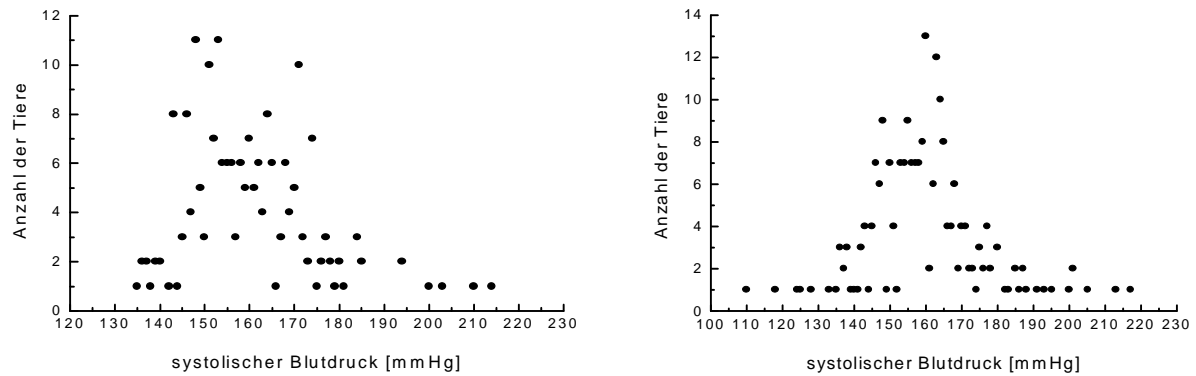


**Abb. 16: Albuminurie bei Lew x MWF BC (n=213) in der 8. (li.) und 14. (re.) Woche.**



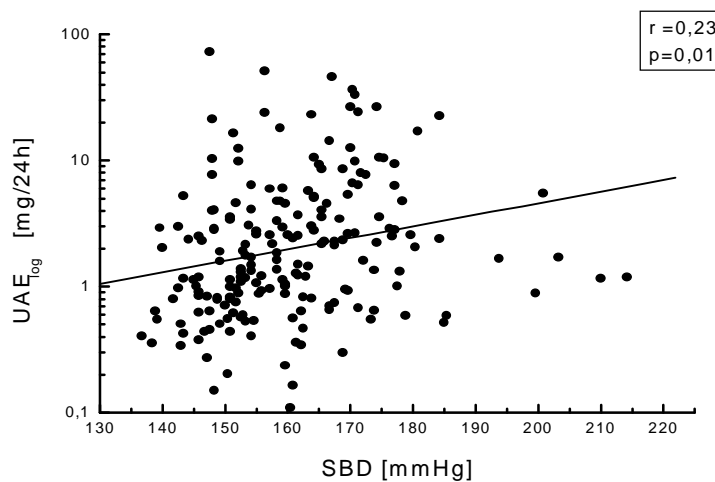
**Abb. 17: Albuminurie bei Lew x MWF BC (n=213) in der 24. Woche.**

Die Verteilung der systolischen Blutdruckwerte lag in der 14. Woche im Bereich zwischen 136,7-214,2 mmHg (MW=160,4±13,4 mmHg) und in der 24. Woche zwischen 117,5-216,7 mmHg (MW=159,9±15,2 mmHg). In der 14. Woche beginnt sich eine unimodale Normalverteilung abzuzeichnen, die in der 24. Woche deutlich sichtbar wird (Abb. 18).



**Abb. 18: Systolischer Blutdruck bei Lew x MWF BC (n=213) in der 14. (li.) und 24. (re.) Woche.**

Nach einer Korrelationsanalyse (Abb. 19) zwischen den Phänotypen Albuminurie der 14. Woche ( $r=0,14$ ,  $r^2=0,02$ ;  $p=0,04$ ) und systolischer Blutdruck der 24. Woche ( $r=0,16$ ,  $r^2=0,03$ ;  $p=0,01$ ) ergab sich eine leicht signifikante Korrelation zwischen beiden Parametern ( $r=0,23$ ,  $r^2=0,05$ ;  $p=0,01$ ).



**Abb. 19: Albuminexkretion im Urin (UAE) in der 14. Woche und systolischer Blutdruck (SBD) in der 24. Woche bei Lew x MWF BC (n=213).**

In dem in der 24. Woche gewonnenen Serum der Backcross-Tiere lagen die Befunde für Kreatinin zwischen 0,044-0,087 mmol/l und für Harnstoff zwischen 5,18-9,35 mmol/l. Die Urinvolumina wurden mit 3,3-60,7 ml/24h und die Kreatinin-Clearance mit 1,65-9,01  $\mu\text{l}/\text{sec}\cdot 100\text{ g}$  gemessen.

Die Meßdaten und die statistischen Bewertungen sind in Tab. 10 aufgeführt.

**Tab. 10: Biochemische Untersuchungen in Serum und Urin bei Lew x MWF-Backcross-Tieren (n=213) in der 24. Woche.**

	Mittelwert	Standard-abweichung	Minimalwert	Maximalwert
<b>Serum</b>				
Kreatinin [mmol/l]	0,057	0,006	0,044	0,087
Harnstoff [mmol/l]	7,43	0,82	5,18	9,35
<b>Urin</b>				
Urinvolumen [ml/24h]	16,2	10,7	3,3	60,7
Kreatinin-Clearance [ $\mu\text{l}/\text{sec}\cdot 100\text{ g}$ ]	5,54	1,02	1,65	9,01

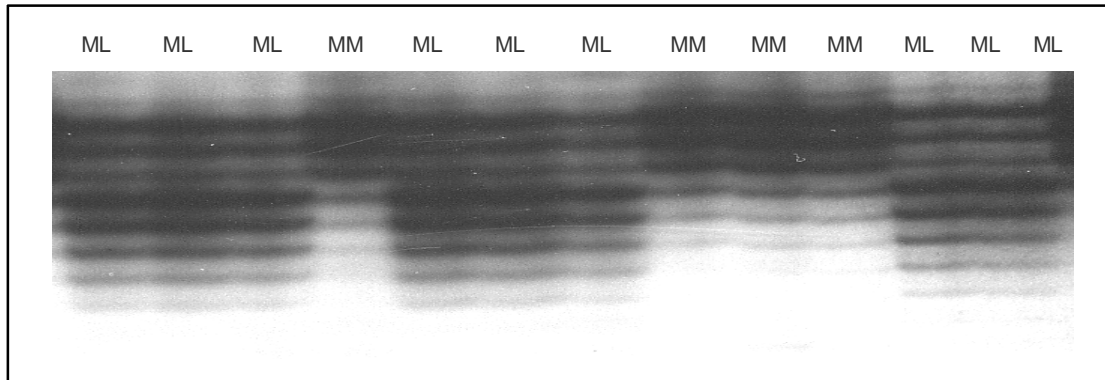
Bei der nierenhistologischen Auswertung der Backcross-Population (Tab. 11) resultierten eine Anzahl subkapsulärer Glomeruli ohne Kapselkontakt von 3,3-28,7 und eine geringere Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit Kapselkontakt von 0,0-5,0.

**Tab. 11: Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt bei Lew x MWF BC (n=213).**

	Mittelwert	Standard-abweichung	Minimalwert	Maximalwert
Anzahl subkapsulärer Glomeruli ohne Kapselkontakt	12,9	4,4	3,3	28,7
Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit Kapselkontakt	0,8	1,0	0,0	5,0

### 3.2.2 QTL-Mapping und Kopplungsanalyse

Zwischen den Parentalstämmen MWF und Lew ergab die systematische Analyse von insgesamt 500 getesteten Mikrosatellitenmarkern eine durchschnittliche Polymorphismusrate von 37%.



**Abb. 20: Genom-Analyse der Backcross-Tiere Lew x MWF mit dem Mikrosatellitenmarker D6Rat12 (MM = homozygot für MWF-Allel, ML = heterozygot für MWF- und Lew-Allel).**

In der Backcross-Population wurde nach Durchführen der Genom-Analyse, wie nach Mendel postuliert, eine Genotypenaufspaltung im Verhältnis 1:1 beobachtet; die Backcross-Männchen waren entweder homozygot (MM) für das MWF-Allel oder heterozygot (ML) für das MWF- und Lew-Allel (Abb. 20). Das X-Chromosom indizierte erwartungsgemäß eine Hemizygotie für das MWF- oder für das Lew-Allel.

**Tab. 12: Ergebnisse der Kopplungsanalyse der Backcross-Zucht Lew x MWF.**

Parameter	Alter	Locus	Phänotypen		Statistik ANOVA	max. Lod-Score
			MM	ML		
systolischer Blutdruck [mmHg]	14. Woche	D1Rat136	163,5±13,9	157,8±12,4	p=0,0024	2,1
	14. Woche	D4Rat41	163,1±14,5	157,3±11,5	p=0,0021	2,2
	24. Woche	D4Rat196	163,3±15,4	156,9±14,5	p=0,0017	2,1
	14. Woche	D5Rat41	156,3±10,8	164,7±14,4	p<0,0001	<b>4,3</b>
Albuminexkretion [mg/24h]	14. Woche	D1Rat38	4,41±8,70	1,92±3,56	p<0,0001	<b>3,8</b>
	14. Woche	D1Rat51	3,64±5,94	2,54±6,96	p=0,0007	2,5
	24. Woche	D1Rat38	6,43±11,41	3,38±5,80	p=0,0020	2,1

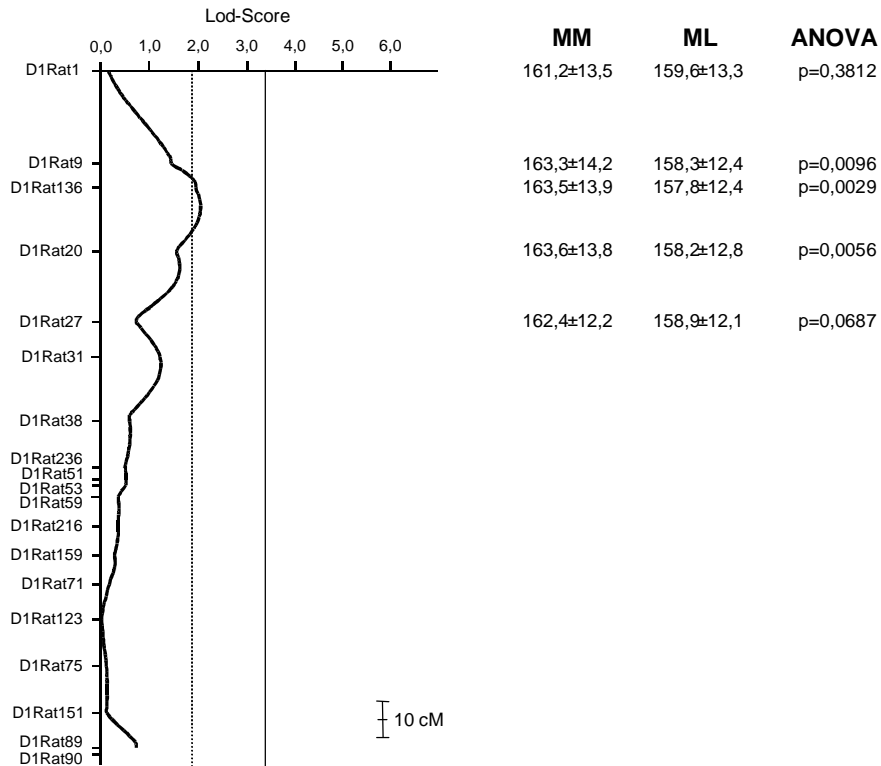
## Fortsetzung Tab. 12

Parameter	Alter	Locus	Phänotypen		Statistik ANOVA	max. Lod-Score
			MM	ML		
<b>Albuminexkretion [mg/24h]</b>	8. Woche	D6Mgh5	1,34±1,81	0,89±0,88	p=0,0030	1,8
	14. Woche	D6Mgh5	4,55±9,02	1,73±2,41	p=0,0005	2,7
	24. Woche	D6Rat71	6,33±9,63	3,53±8,12	p=0,0005	2,7
	24. Woche	D6Mgh5	6,73±11,53	3,05±5,22	p=0,0018	2,6
	14. Woche	D12Rat37	3,75±6,47	2,40±6,59	p=0,0012	2,3
	24. Woche	D12Rat37	6,47±9,79	3,17±7,78	p<0,0001	<b>4,9</b>
	14. Woche	D17Rat58	4,25±7,94	1,65±3,91	p<0,0001	<b>4,9</b>
	24. Woche	D17Rat58	6,54±10,55	2,73±5,87	p<0,0001	<b>4,5</b>
<b>Gesamtprotein-Exkretion [mg/24h]</b>	24. Woche	D17Rat58	20,7±19,9	13,8±6,8	p=0,0001	<b>3,3</b>
<b>Anzahl subkapsulärer Glomeruli</b>	24. Woche	DXRat96	13,9±4,5	11,8±4,2	p=0,0004	2,8
<b>subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt</b>	24. Woche	D1Rat151	1,1±1,2	0,5±0,7	p=0,0001	<b>3,3</b>
	24. Woche	D13Rat62	1,0±1,2	0,5±0,7	p=0,0004	2,9

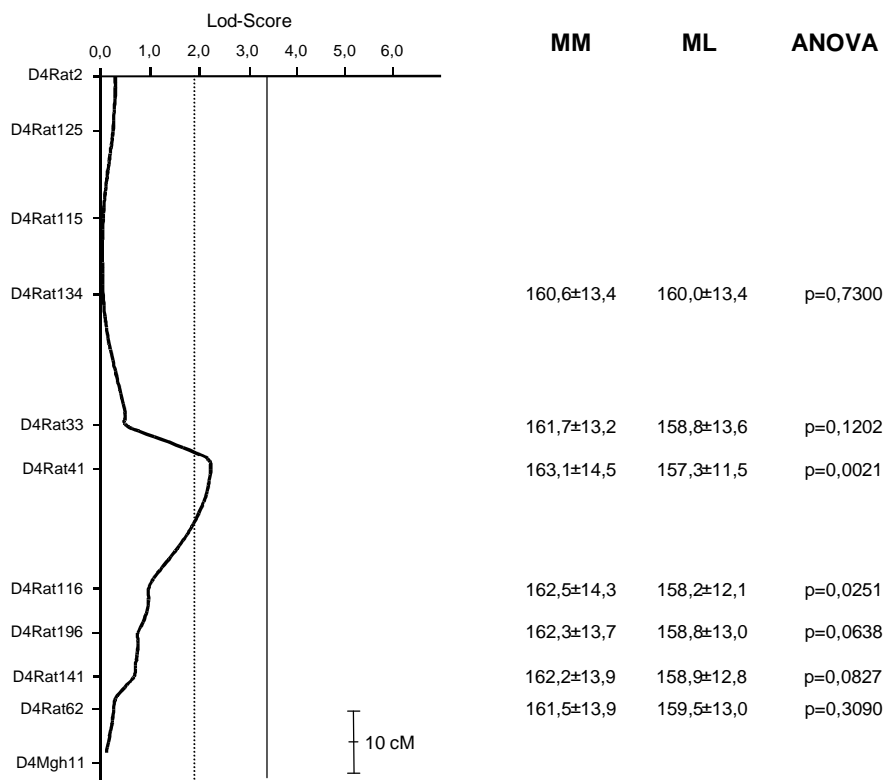
Die Auswertung der Kopplungsanalyse (Tab. 12) ergab eine wahrscheinliche Assoziation zwischen dem systolischen Blutdruck der 14. Woche und dem Marker D1Rat136 ( $p=0,0024$ , max. Lod-Score=2,1; Abb. 21) auf Ratten-Chromosom 1. Unter dem Einfluß des MWF-Allels wurde in der Markerregion D1Rat136 ein Anstieg des systolischen Blutdruckes um 5,7 mmHg bei den Backcross-Tieren beobachtet.

Eine zweite, wahrscheinliche Assoziation wurde zwischen dem Phänotyp systolischer Blutdruck der 14. Woche und dem Marker D4Rat41 ( $p=0,0021$ , max. Lod-Score=2,2; Abb. 22) auf Chromosom 4 ermittelt. Das MWF-Allel implizierte an diesem Locus einen Anstieg des systolischen Blutdruckes um 5,8 mmHg. Darüber hinaus wurde in der 24. Woche für den Marker D4Rat196 eine wahrscheinliche Assoziation gefunden ( $p=0,0017$ , max. Lod-Score=2,1). Das MWF-Allel bewirkte eine Blutdruckerhöhung von 6,4 mmHg.

Eine hoch signifikante Kopplung wurde zwischen dem systolischen Blutdruck der 14. Woche und dem Marker D5Rat41 ( $p<0,0001$ , max. Lod-Score=4,3) auf Chromosom 5 detektiert. Das Lew-Allel führte zu einem Blutdruckanstieg um 8,4 mmHg. Die Lod-Kurve weist einen Doppelpeak über einen relativ schmalen Signifikanzbereich von ca. 17 cM am Chromosomenende auf (Abb. 23).

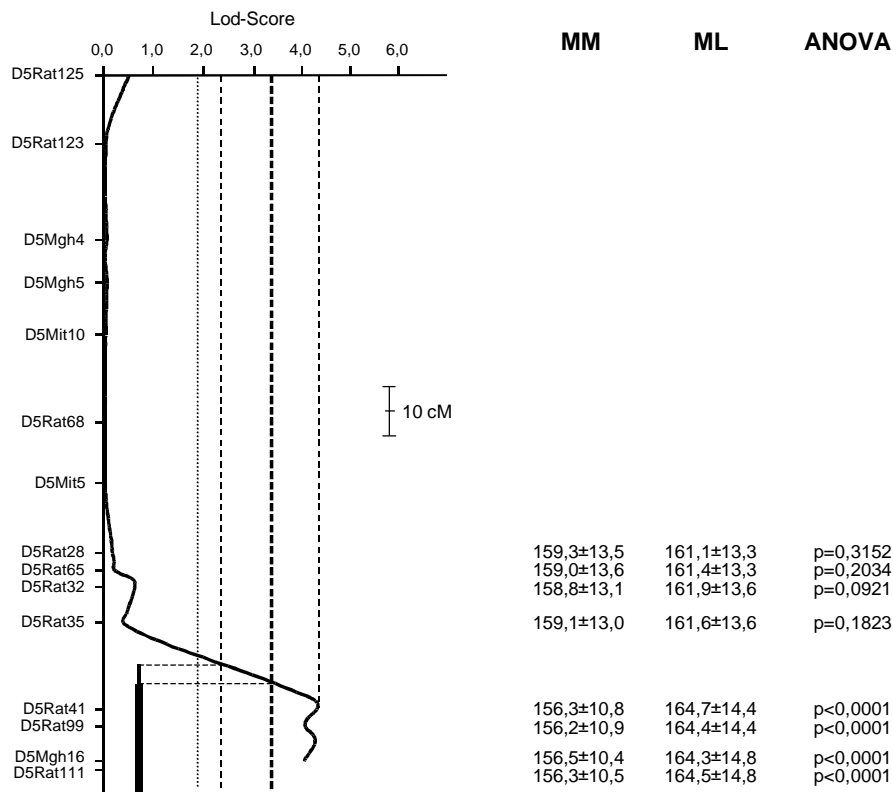


**Abb. 21: QTL für systolischen Blutdruck [mmHg] auf Chromosom 1 der 14. Woche. Max. Lod-Score=2,1. MM = homozygot für MWF-Allel, ML = heterozygot für MWF- und Lew-Allel, durchgezogene Linie bei Lod-Score 3,3 = signifikante Kopplung, gepunktete Linie bei Lod-Score 1,9 = wahrscheinliche Assoziation.**



**Abb. 22: QTL für systolischen Blutdruck [mmHg] auf Chromosom 4 in der 14. Woche. Max. Lod-Score=2,2 (Erläuterungen s. Abb. 21).**





**Abb. 23: QTL für systolischen Blutdruck [mmHg] auf Chromosom 5 in der 14. Woche. Max. Lod-Score=4,3. Gestrichelte Linien zur Konstruktion des 1-Lod- (Lod-Score-1) und 2-Lod-Intervalls (Lod-Score-2). Breiter Balken = 1-Lod-Intervall, schmaler Balken = 2-Lod-Intervall (weitere Erläuterungen s. Abb. 21).**

Die Ergebnisse der Kopplungsanalyse ergaben zwischen dem Phänotyp Albuminurie der 14. Woche und dem Marker D1Rat38 auf Ratten-Chromosom 1 eine hoch signifikante Kopplung ( $p < 0,0001$ , max. Lod-Score=3,8) und in der 24. Woche eine wahrscheinliche Assoziation ( $p = 0,0020$ , max. Lod-Score=2,1) im selben Markerbereich. In einer Distanz von 16,5 cM bildete sich in der Lod-Kurve ein kleinerer Doppel-Peak ab, der eine wahrscheinliche Assoziation ( $p = 0,0007$ , max. Lod-Score=2,5) zwischen der Albuminurie und dem Marker D1Rat51 erkennen ließ (Abb. 24-25). Das MWF-Allel bewirkte beim Marker D1Rat38 einen Anstieg der Albuminexkretion von 2,49 mg/24h in der 14. bzw. von 3,05 mg/24h in der 24. Woche und beim Marker D1Rat51 einen Anstieg von 1,10 mg/24h.

Zwischen der Albuminurie und dem Marker D6Mgh5 auf Chromosom 6 wurde eine wahrscheinliche Assoziation in der 8. ( $p = 0,0030$ ) und 14. Woche ( $p = 0,0005$ , max. Lod-Score=2,7) gefunden. In der 24. Woche resultierten zwischen der Albuminurie und dem Marker D6Rat71 ( $p = 0,0005$ , max. Lod-Score=2,7) und dem Marker D6Mgh5 ( $p = 0,0018$ ) weitere signifikante Assoziationen über einen Signifikanzbereich von ca. 29 cM (Abb. 26-27). Das MWF-Allel verursachte bei D6Mgh5 eine Steigerung der Albuminexkretion von 0,45 mg/24h, 2,82 mg/24h bzw. 3,68 mg/24h in der 8., 14. bzw. 24. Woche und bei D6Rat71 eine Steigerung von 2,80 mg/24h.

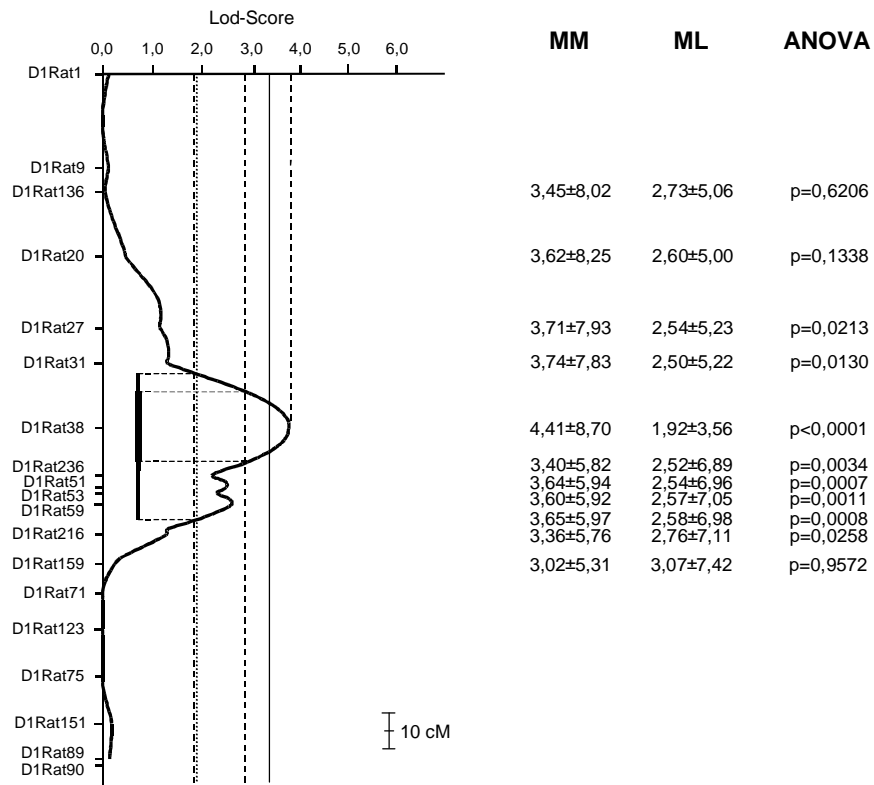


Abb. 24: QTL für Albuminurie [mg/24h] auf Chromosom 1 in der 14. Woche. Max. Lod-Score=3,8 (Erläuterungen s. Abb. 21 und 23).

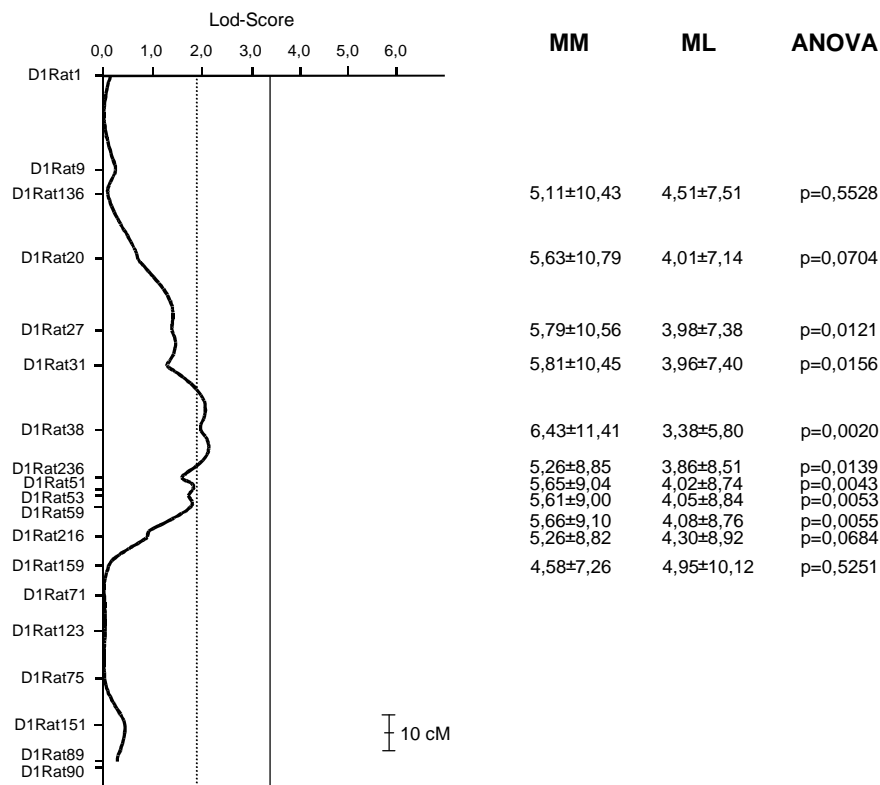
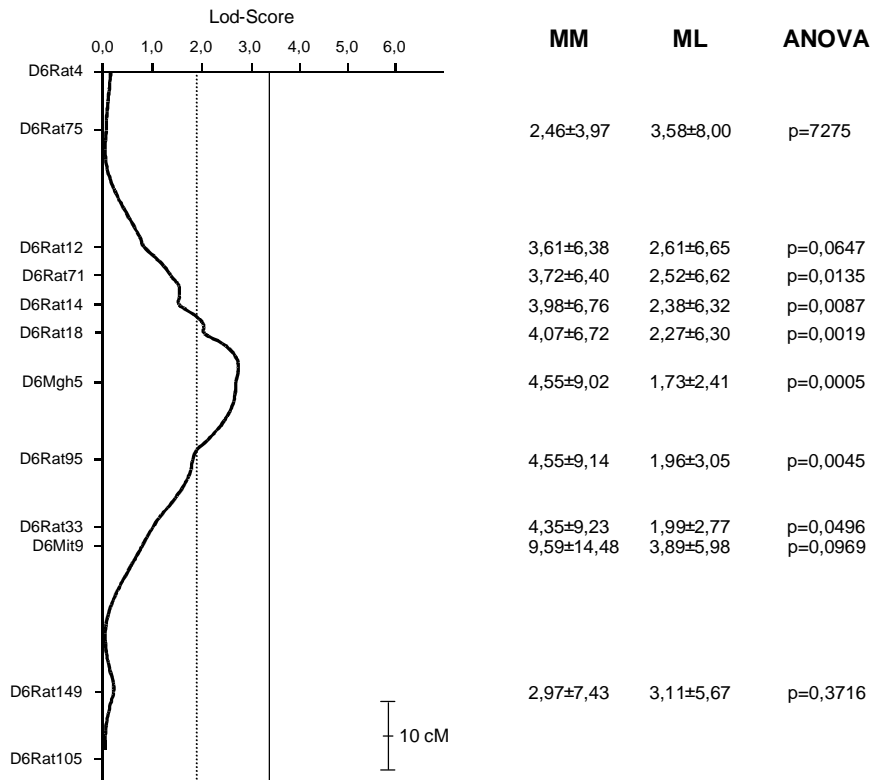
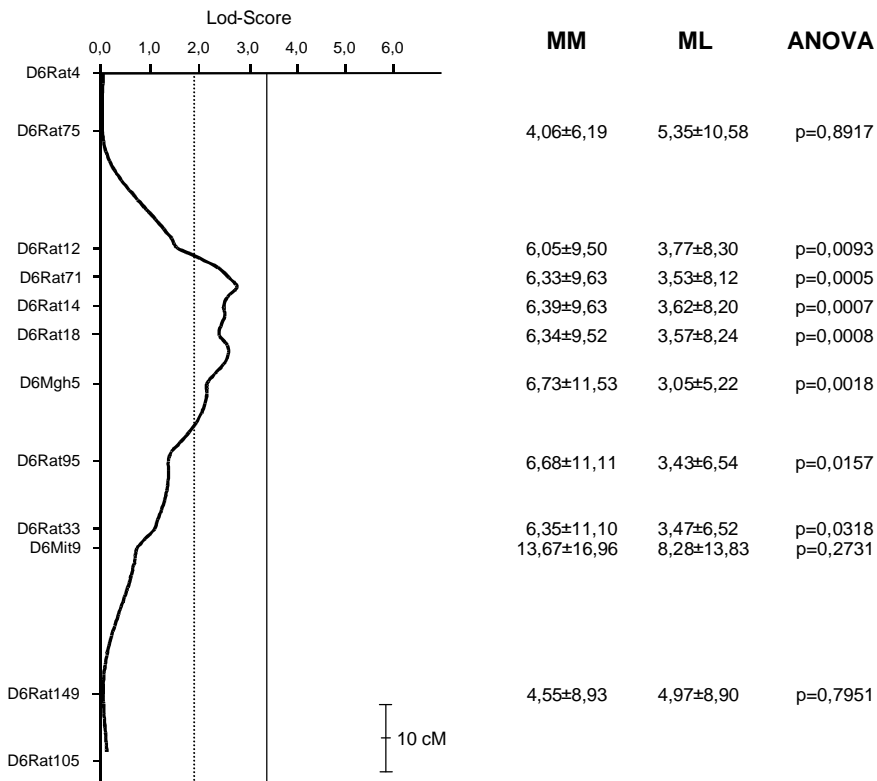


Abb. 25: QTL für Albuminurie [mg/24h] auf Chromosom 1 in der 24. Woche. Max. Lod-Score=2,1 (Erläuterungen s. Abb. 21).

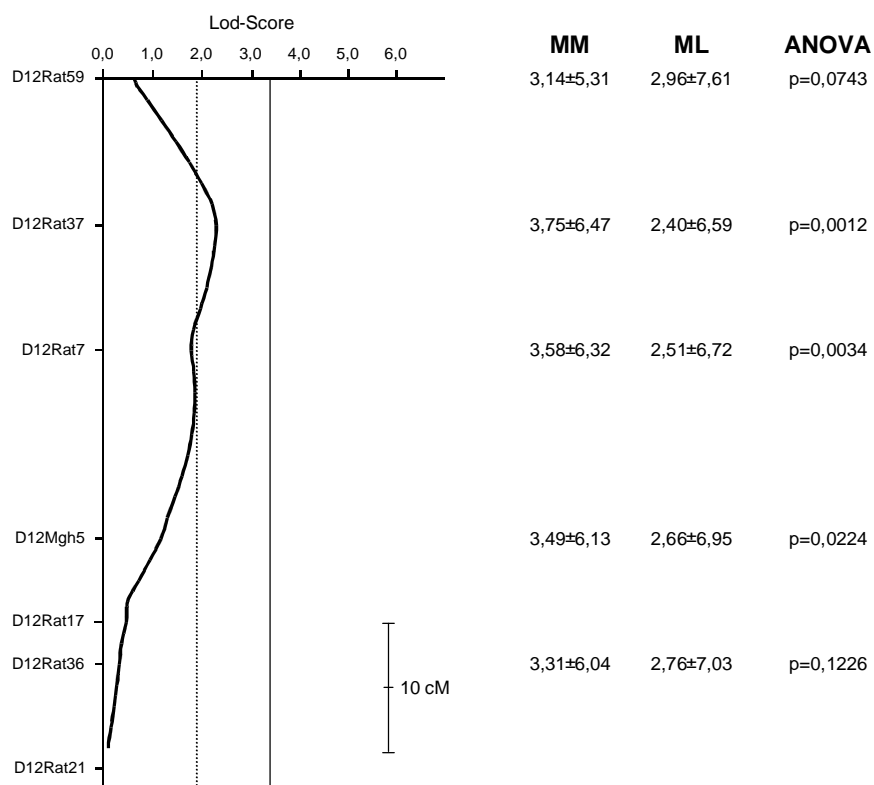


**Abb. 26: QTL für Albuminurie [mg/24h] auf Chromosom 6 in der 14. Woche. Max. Lod-Score=2,7 (Erläuterungen s. Abb. 21).**

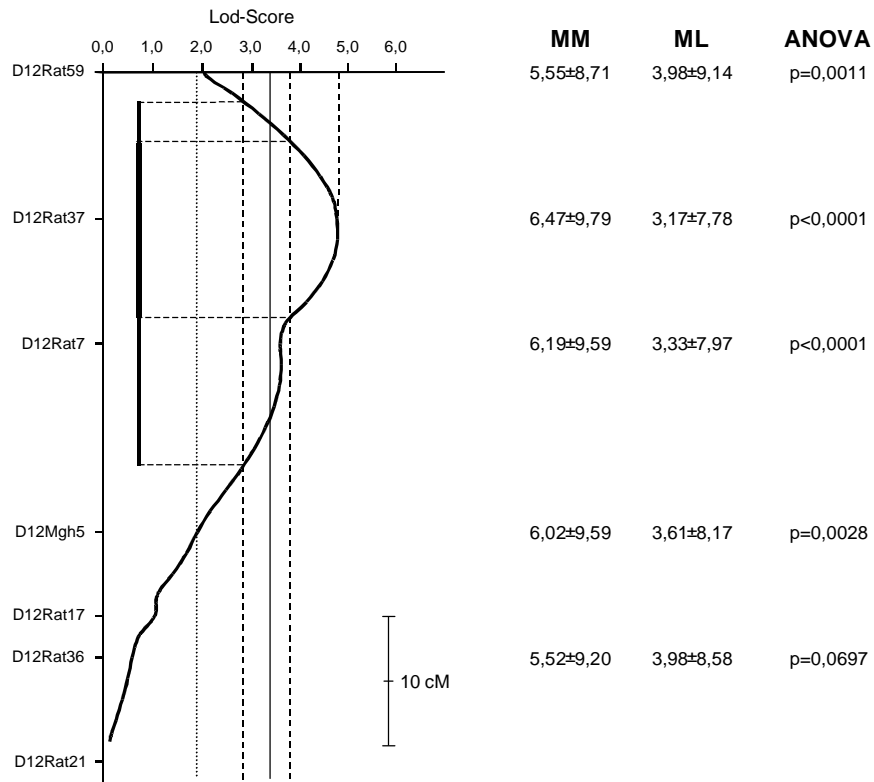


**Abb. 27: QTL für Albuminurie [mg/24h] auf Chromosom 6 in der 24. Woche. Max. Lod-Score=2,7 (Erläuterungen s. Abb. 21).**

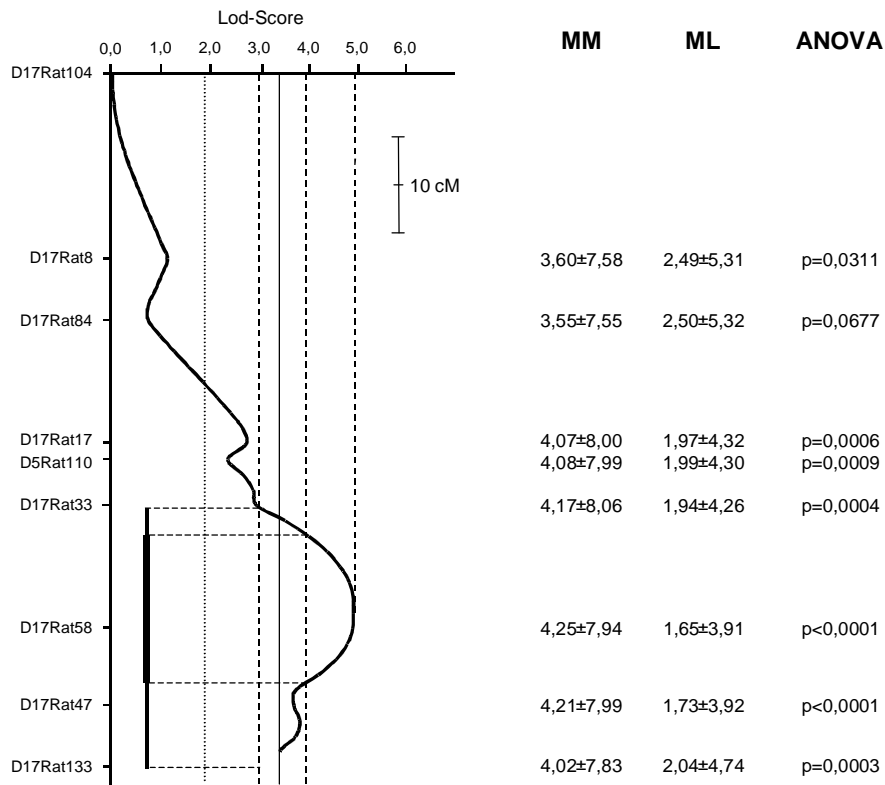
Eine wahrscheinliche Assoziation wurde zwischen der Albuminurie der 14. Woche und dem Marker D12Rat37 ( $p=0,0012$ , max. Lod-Score=2,3) auf Chromosom 12 bzw. eine hoch signifikante Kopplung in der 24. Woche ( $p<0,0001$ , max. Lod-Score=4,9) detektiert. Das MWF-Allel führte an diesem Locus zu einer Erhöhung der Exkretion um 1,35 mg/24h in der 14. bzw. 3,30 mg/24h in der 24. Woche. Der Signifikanzbereich der Lod-Kurve erstreckte sich mit ca. 28 cM über einen sehr breiten Chromosomenabschnitt und ließ einen zusätzlichen kleineren Peak zwischen D12Rat7 und D12Mgh5 erkennen (Abb. 28-29). Eine weitere hoch signifikante Kopplung wurde zwischen der Albuminurie und dem Marker D17Rat58 auf Chromosom 17 in der 14. ( $p<0,0001$ , max. Lod-Score=4,9) und 24. Woche ( $p<0,0001$ , max. Lod-Score=4,5) detektiert. Das MWF-Allel bewirkte bei D17Rat58 einen Anstieg der Albuminexkretion um 2,60 mg/24h in der 14. bzw. um 3,81 mg/24h in der 24. Woche. Das Signifikanzprofil wies ein Plateau über ca. 20 cM auf, das von insgesamt drei kleineren Neben-Peaks eingefaßt wurde (Abb. 30-31).



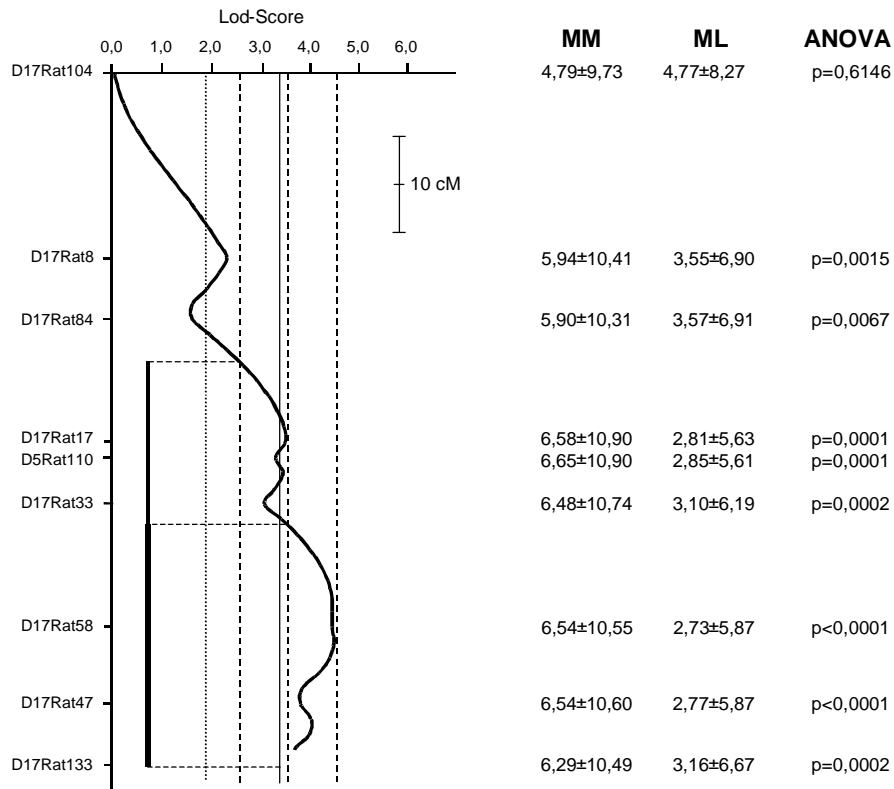
**Abb. 28: QTL für Albuminurie [mg/24h] auf Chromosom 12 in der 14. Woche. Max. Lod-Score=2,3 (Erläuterungen s. Abb. 21).**



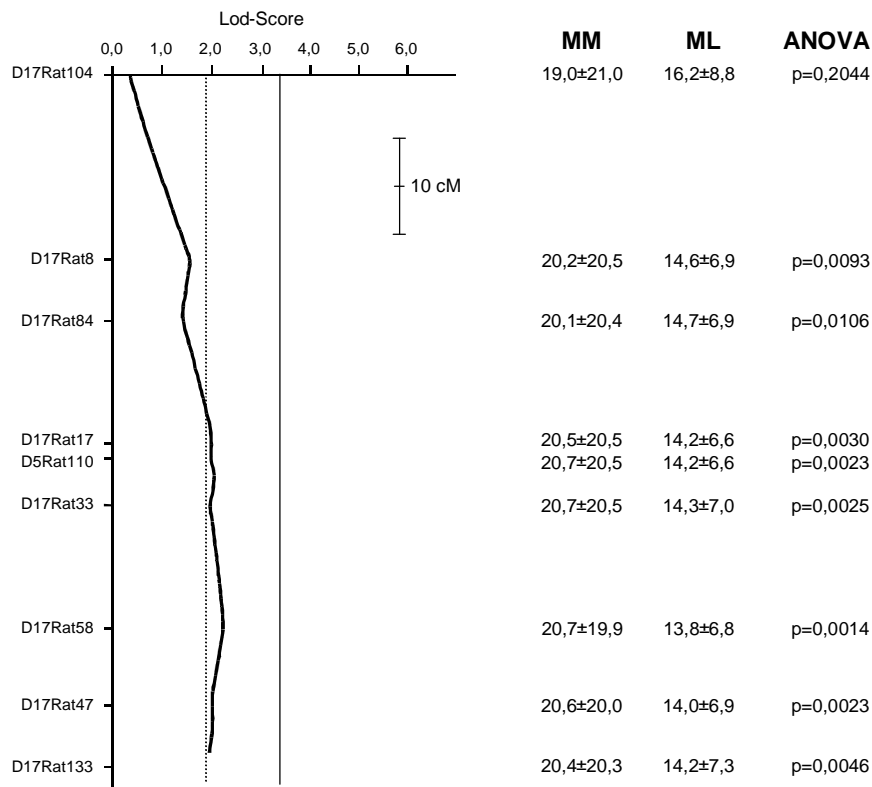
**Abb. 29: QTL für Albuminurie [mg/24h] auf Chromosom 12 in der 24. Woche. Max. Lod-Score=4,9 (Erläuterungen s. Abb. 21 und 23).**



**Abb. 30: QTL für Albuminurie [mg/24h] auf Chromosom 17 in der 14. Woche. Max. Lod-Score=4,9 (Erläuterungen s. Abb. 21 und 23).**



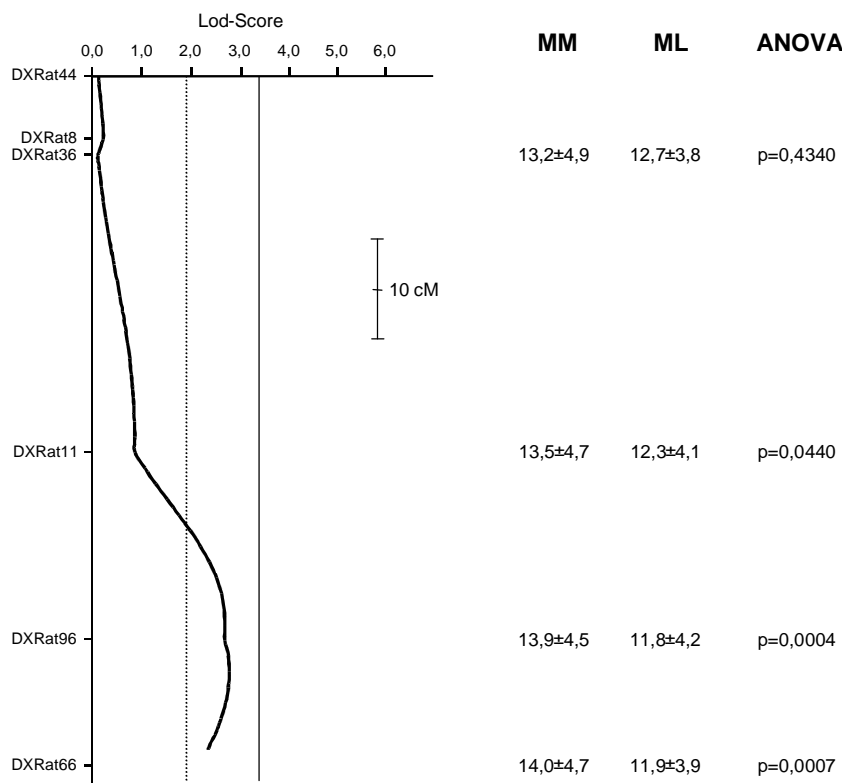
**Abb. 31: QTL für Albuminurie [mg/24h] auf Chromosom 17 in der 24. Woche. Max. Lod-Score=4,5 (Erläuterungen s. Abb. 21 und 23).**



**Abb. 32: QTL für Proteinurie [mg/24h] auf Chromosom 17 in der 24. Woche. Max. Lod-Score=2,2 (Erläuterungen s. Abb. 21).**

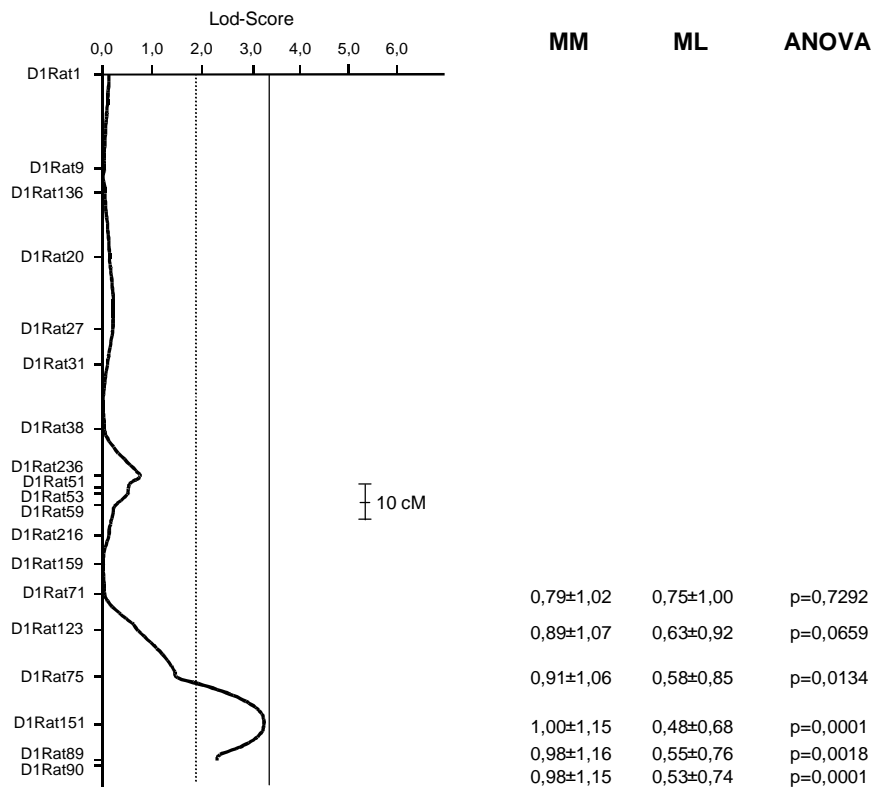
Die Ergebnisse der Kopplungsanalyse ergaben eine signifikante Kopplung zwischen der Proteinurie der 24. Woche und dem Marker D17Rat58 ( $p=0,0001$ , max. Lod-Score=3,3) auf Chromosom 17. Das MWF-Allel führte an diesem Locus zu einer Steigerung der Proteinexkretion auf Werte von 6,4 mg/24h (Abb. 32).

Die weitere Auswertung der Kopplungsanalyse ergab eine wahrscheinliche Assoziation zwischen der Anzahl subkapsulärer Glomeruli und dem Marker DXRat96 auf dem X-Chromosom in der 24. Woche ( $p=0,0004$ , max. Lod-Score=2,8). Das MWF-Allel erzielte eine erhöhte Glomerulianzahl von 2,1 Glomeruli/histologischem Nierenquerschnitt. Die Lod-Kurve erstreckte sich innerhalb des Signifikanzbereiches über ein relativ breites Plateau von ca. 24 cM (Abb. 33).



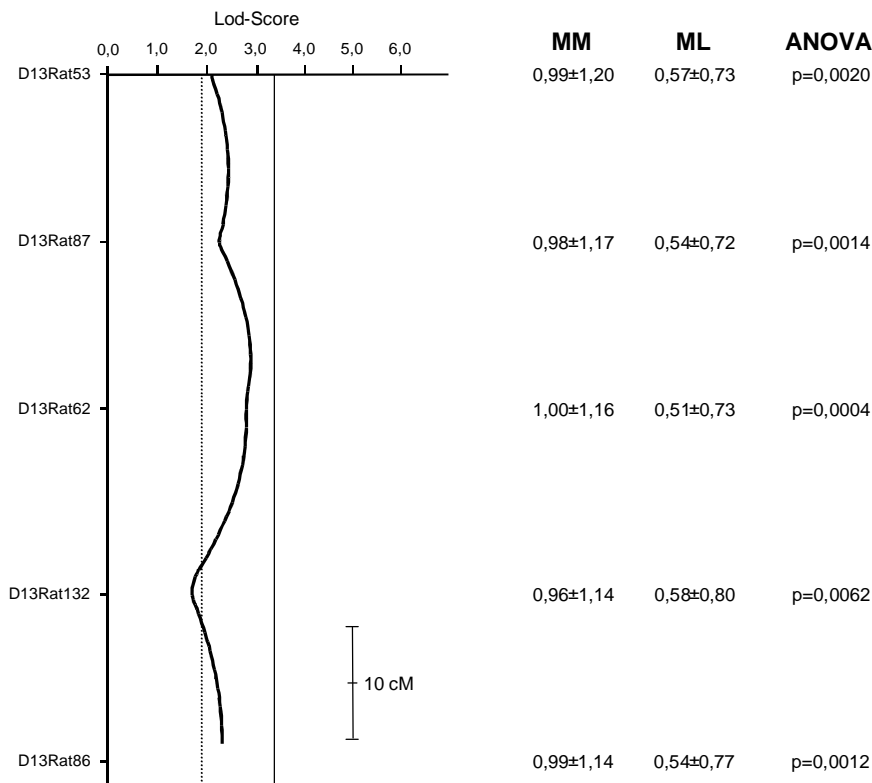
**Abb. 33: QTL für die Anzahl subkapsulärer Glomeruli auf dem X-Chromosom in der 24. Woche. Max. Lod-Score=2,8 (Erläuterungen s. Abb. 21).**

Für den Phänotyp subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt wurde eine signifikante Kopplung für den Marker D1Rat151 auf Chromosom 1 in der 24. Woche ( $p=0,0001$ , max. Lod-Score=3,3; Abb. 34) und eine wahrscheinliche Assoziation für D13Rat62 auf Chromosom 13 in der 24. Woche ( $p=0,0004$ , max. Lod-Score=2,9; Abb. 35) detektiert. In beiden Fällen nahm das MWF-Allel Einfluß auf den Phänotyp und führte jeweils mit 0,6 subkapsulären Glomeruli mit Kapselkontakt/histologischem Nierenquerschnitt zu höheren Werten. Der Signifikanzbereich auf Chromosom 13 zieht sich fast über das gesamte Chromosom und weist jeweils zwischen den drei Markerregionen D13Rat53 und D13Rat87, D13Rat87 und D13Rat132 sowie zwischen D13Rat132 und D13Rat86 einen flachen, aber signifikanten Kurvenanstieg auf.



**Abb. 34: QTL für subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt auf Chromosom 1 in der 24. Woche. Max. Lod-Score=3,3 (Erläuterungen s. Abb. 21).**

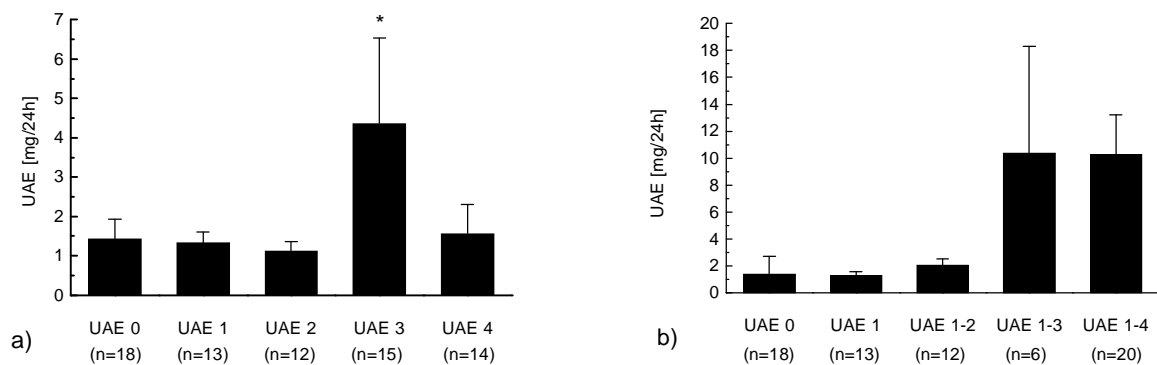




**Abb. 35: QTL für subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt auf Chromosom 13 in der 24. Woche. Max. Lod-Score=2,9 (Erläuterungen s. Abb. 21).**

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit 4 QTL (UAE 1-UAE 4) mit Einfluß auf die Albuminurie kartiert (Abb. 36 a). Zusätzlich wurde untersucht, ob zwischen den 4 QTL epistatische Beziehungen bestehen und welchen phänotypischen Effekt jeder einzelne QTL unabhängig von den anderen drei QTL ausübt. In Abb. 36 a) sind die Albuminurie-Mittelwerte für die Backcross-Tiere angegeben, die ausschließlich einen homozygoten Genotyp an jeweils nur einem der 4 QTL aufwiesen. Im Vergleich mit den Backcross-Tieren (n=18), die an keinem der 4 QTL Homozygotie zeigten (UAE 0), führte im Gegensatz zu UAE 0-Tieren lediglich die Homozygotie an UAE 3 zu einer signifikanten Erhöhung der Albuminurie. Das alleinige Vorhandensein von Homozygotie an UAE 1, UAE 2 oder UAE 4 hingegen wies einen Anstieg der Albuminurie im Vergleich zu UAE 0-Tieren auf. Bei der Untersuchung nach epistatischen Interaktionen mittels ANOVA fand sich eine signifikante positive Interaktion zwischen UAE 2 und UAE 4 ( $p=0,02$ ).

Die Darstellung und Analyse im additiven Modell (Abb. 36 b), bei der ausgehend von den Tieren mit der UAE 0-Konstellation der homozygote Genotypenstatus von UAE 1 bis nach UAE 1 + UAE 2 + UAE 3 + UAE 4 (UAE 1-UAE 4) konsekutiv addiert wurde, ergab signifikant erhöhte Albuminuriewerte im Bereich von 10 mg/24h nur bei Vorliegen einer Homozygotie an mindestens drei Loci.



**Abb. 36: a) Solitäre und b) additive Effekte der vier Albuminurie-QTL (UAE 1 auf Chromosom 1 [D1Rat38], UAE 2 auf Chromosom 6 [D6Mgh5], UAE 3 auf Chromosom 12 [D12Rat37] und UAE 4 auf Chromosom 17 [D17Rat58]) in der Backcross-Population Lew x MWF. \* UAE 3 vs. UAE 1, UAE 2 und UAE 4,  $p=0,01$ . UAE = Albuminurie.**

Die ermittelten Lokalisationen der einzelnen QTL ließen an keinem Albuminurie-Locus eine signifikante Kopplung mit einem Blutdruck-Locus erkennen. Die Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt wiesen keine signifikante Kopplung zu einem Blutdruck- oder Albuminurie-Locus auf.

### 3.3 Differentielle Genexpressionsanalyse

Um die Identifizierung von Kandidatengen zu beschleunigen, wurde parallel zur Kosegregationsanalyse eine differentielle Genexpressionsanalyse durchgeführt. Da die Nephronanzahl postnatal in den ersten Lebenstagen der Ratte festgelegt wird, wurden zur Detektion differentiell exprimierter Gene bzw. mRNAs die Nieren von 9 Tage alten MWF- und Lew-Ratten untersucht.

#### 3.3.1 Genotypisierung

Alle für die differentielle Genexpressionsanalyse eingesetzten MWF- und Lew-Ratten wurden hinsichtlich ihrer Stammeszugehörigkeit und ihrer genetischen Homogenität innerhalb des jeweiligen Stammes über eine Genotypisierung mit dem Marker D13Mit2 überprüft. Die Tiere wiesen innerhalb des jeweiligen Stammes dasselbe homozygote Bandenmuster auf. Damit war ihre Stammeszugehörigkeit eindeutig geklärt und eine ausreichende genetische Homogenität verifiziert.

#### 3.3.2 cDNA-Subtraktion

Mit Hilfe der cDNA-Subtraktion war es möglich, differentiell exprimierte Genprodukte in der Niere 9 Tage alter MWF- bzw. Lew-Ratten zu detektieren. Dazu wurde die RNA von Tester (MWF) und Driver (Lew) in cDNA umgeschrieben. Nach der Long-Distance-PCR trat bei der Kontroll-RNA eine distinkte Bande bei 900 bp und bei der Ratten-RNA ein moderater Schmier zwischen 0,5-6,0 kb auf. Für das weitere Vorgehen war der Prozentsatz des nach säulenchromatographischer cDNA-Aufreinigung noch verbleibenden PCR-Produktes größer als 30% und entsprach somit optimalen Bedingungen. Die über eine Rsa I-Spaltung generierten kürzeren Doppelstrang-cDNAs wurden gelelektrophoretisch analysiert. Bei der ungeschnittenen Doppelstrang-cDNA wurde ein Schmier zwischen 0,5-10,0 kb und bei der geschnittenen Doppelstrang-cDNA ein Schmier zwischen 0,1-2,0 kb beobachtet. Zur Überprüfung der Adapter-Ligation wurde die Ligationseffizienz mittels einer G3PDH-Analyse über eine PCR-Amplifikation ermittelt. Da die PCR-Produkte nicht mehr als das 4fache zwischen dem G3PDH-Amplifikaten bzw. den Produkten aus einem der G3PDH-Primer und einem Adapter-spezifischen Primer differierten, lag die Ligationseffizienz nicht unter 25%, so daß eine reduzierte Ligationseffizienz nicht zu erwarten war. Die Ratten-cDNA ergab mit

dem G3PDH-Primer und dem für den ersten Adapter spezifischen Primer (PCR-Primer 1) amplifiziert, ein 1,2 kb großes Fragment. Nach den Hybridisierungen, durch die eine signifikante Anreicherung differentiell exprimierter Sequenzen ermöglicht wurde, erfolgte in einem ersten PCR-Schritt das Auffüllen der für die Amplifizierung benötigten Adapter-Enden. Nach 27 Zyklen traten bei der subtrahierten PCR-Kontrolle die größten Banden auf, die mit den  $\phi$ X174 DNA/Hae III-Banden konform waren. Dieses Ergebnis ähnelte dem der Skelettmuskel-Subtraktion. Die Produkte der Proben aus der ersten PCR-Subtraktion traten als Schmier zwischen 0,2-2,0 kb mit distinkten Banden auf. In der zweiten (nested) PCR der cDNA-Subtraktion wurden die über diese Methodik erhaltenen potentiell differentiell exprimierten Genprodukte der Vorwärts-Subtraktion und der reversen Subtraktion angereichert. In einer Agarosegel-Analyse zeigte sich zwischen der subtrahierten und der nicht-subtrahierten cDNA ein unterschiedliches Bandenmuster (Schmier), das auf eine erfolgreiche Subtraktion hinwies. Die einzelnen Banden der subtrahierten cDNA repräsentierten die potentiell differentiell exprimierten Genprodukte. Zur Überprüfung der Subtraktionseffizienz der subtrahierten und nicht subtrahierten cDNA mit Hilfe von G3PDH 5'- und G3PDH 3'-Primern sollte bei der subtrahierten cDNA erst 5-15 PCR-Zyklen später ein Produkt sichtbar werden. Bei der nicht-subtrahierten cDNA trat das G3PDH-Produkt erwartungsgemäß nach 18-23 Zyklen und bei der subtrahierten cDNA 5-15 Zyklen später auf.

10 ng der potentiell differentiell exprimierten Genprodukte wurden kloniert, nach dem Zufallsprinzip von der Agarplatte gepickt und der Inserteinbau über einen EcoR I-Verdau überprüft. Da die Transformationseffizienz methodenbedingt sehr niedrig war, wiesen nur 39% aller Klone ein Insert auf. Um eine repräsentative Auswahl an Genprodukten zu erhalten, wurden für die Vorwärts-Subtraktion 222 Klone und für die reverse Subtraktion 217 Klone gepickt, so daß 83 erfolgreich transformierte, aus Vektor und Insert bestehende Klone für die Vorwärts-Subtraktion und 89 erfolgreich transformierte Klone für die reverse Subtraktion zur Verfügung standen. Die Sequenzlänge der erhaltenen Klone variierte zwischen ca. 118 bp und 1500 bp; ein großer Anteil der Klone wies eine Länge von 300-500 bp auf.

Zur Überprüfung der differentiellen Expression bzw. zum Eliminieren von falsch-positiven Genprodukten (Background) wurde die cDNA-Bank differentiell gescreent. Dazu wurden vier cDNA-Dot Blots mit den insgesamt 172 potentiell differentiell exprimierten Klonen mit der vorwärts-subtrahierten cDNA, der revers-subtrahierten cDNA, der nicht-subtrahierten Tester-Kontroll-cDNA und der nicht-subtrahierten Driver-Kontroll-cDNA hybridisiert.

Die Interpretation der unterschiedlichen Kombinationen der Hybridisierungssignale wird in Tab. 13 präsentiert.

**Tab. 13: Interpretation der Hybridisierungssignale aus dem differentiellen Screening.**

Vorwärts-Subtraktion	reverse Subtraktion	nicht-subtrahierter Tester	nicht-subtrahierter Driver	Interpretation
+	-	+	-	Klone zu 95% differentiell exprimiert
+	-	-	-	differentielle Expression sehr wahrscheinlich, Klone entsprechen „low-abundance“-Transkripten; gelegentlich Artefakte
+	-	+	+	Schwierige Interpretation, oftmals Artefakte; möglicherweise alternative Spleißformen vorhanden oder verschiedene Transkripte mit einer oder mehreren Banden spezifisch zur Tester-RNA. Oft Multi-Gen-Familien zugehörig.
++	+	+	+ oder -	Signalstärke größer als das 5fache: Klon wahrscheinlich differentiell exprimiert. Signalstärke kleiner als das 3fache: zufällige Schwankung in der Effizienz der Vorwärts- und reversen Subtraktion.
+	+	+	+	Klone niemals differentiell exprimiert
-	-	-	-	Klone nicht differentiell exprimiert, zufällig in der subtrahierten Bank als Einzelkopien vorhanden.

Eine mit hoher Wahrscheinlichkeit differentielle Expression zeigten nach dem Bewertungsschema in Tab. 13 die Klone 9.40, 9.68, 9.70, 9.71, 9.73, 9.107, 9.139, 9.407, 9.420 und 9.439 der Vorwärts-Subtraktion (VS) und die Klone 9.191, 9.193, 9.237, 9.249, 9.282, 9.306, 9.315, 9.330, 9.333, 9.352 und 9.383 der reversen Subtraktion (rS) auf.

### 3.3.3 Analyse der Genprodukte aus der differentiellen Genexpressionsanalyse

#### 3.3.3.1 Charakterisierung der Genprodukte

Die über das differentielle Screening bestätigten Genfragmente 9.40 (VS), 9.68 (VS), 9.70 (VS), 9.71 (VS), 9.73 (VS), 9.107 (VS), 9.139 (VS), 9.191 (rS), 9.193 (rS), 9.237 (rS), 9.249 (rS), 9.282 (rS), 9.306 (rS), 9.315 (rS), 9.330 (rS), 9.333 (rS), 9.352 (rS), 9.383 (rS), 9.407 (VS), 9.420 (VS) und 9.439 (VS) wurden sequenziert und einer BLAST-Analyse unterzogen. Die ermittelten Homologien zu bekannten Genprodukten und bereits bestehende Kartierungen sind in Tab. 14 aufgelistet.

**Tab. 14: Ergebnisse der BLAST-Analyse der differentiell exprimierten Genprodukte aus der cDNA-Subtraktion.**

Klon-Nr.	Homologie zu	Spezies	Kartierung auf Chromosom
<b>9.40 (VS)</b>	Hypothetisches Protein FLJ13204, clone MGC:28259 IMAGE:4007373, Mus musc. Accession-Nr.: BC020028	-	-
<b>9.68 (VS)</b>	Hypothetisches Protein MGC11352 (MGC11352), Homo sap. Accession-Nr.: XM_035943	Homo sap.	10q22.3
<b>9.70 (VS)</b>	Homologie unbekannt	-	-
<b>9.71 (VS)</b>	Hypothetisches Protein FLJ21986 (FLJ21986), Homo sap. Accession-Nr.: XM_015864	Homo sap.	7q31.31
<b>9.73 (VS)</b>	Ankyrin repeat hooked to zinc finger motif (Ankhzn), Mus musc. Accession-Nr.: NM_009671	Mus musc.	11
	Ankhzn, Mus musculus und Homo sap. Accession-Nr.: AB011370 und NM_016376	Homo sap.	17p13
	KIAA1255 protein (KIAA1255), Homo sap. Accession-Nr.: XM_040626	Homo sap.	17
<b>9.107 (VS)</b>	Aldolase A, Fruktose-bisphosphat (Aldoa), Rattus nor. Accession-Nr.: NM_012495	Rattus norv.	1 (D1Mco16, D1Arb19)
		Homo sap.	16q22-q24
<b>9.139 (VS)</b>	Leucin-Zipper-Protein 1 (Luzp1), Rattus nor. Accession-Nr.: NM_030830	Mus musc.	4 (zw. Fgr and Gpcr14)
		Homo sap.	1p36.2-1p36.1
<b>9.191 (rS)</b>	Sacm21/RT1-A intergenic region, haplotype RT1n and partial RT1-A gene for MHC Class I antigen, Rattus nor. Accession-Nr.: AJ276629. Endogene retrovirale Sequenz, 5' and 3' LTR, Rattus Accession-Nr.: D90005	Rattus norv.	20p12
<b>9.193 (rS)</b>	mRNA (pBUS19) mit repetitiven Elementen, Rattus nor. Accession-Nr.: X62951 Rat endogenous retroviral sequence, 5' and 3' LTR Accession-Nr.: D90005	-	-
<b>9.237 (rS)</b>	Retroviral-like ovarian specific transcript 30-1, Rattus nor. Accession-Nr.: U48828	-	-
<b>9.249 (rS)</b>	H1SHR mRNA, Rattus nor. Accession-Nr.: X79860. Retroviral-like ovarian specific transcript 30-1, Rattus nor. Accession-Nr.: U48828	-	-
		-	-
<b>9.282 (rS)</b>	Integrales Membranprotein 1 (Itm 1), Mus musc. Accession-Nr.: NM_008408	Homo sap. Mus musc.	11q23.3 9
<b>9.306 (rS)</b>	Möglicher Chromatin-Remodeling-Faktor, Mus musc. Accession-Nr.: AF247132. Hypothetisches Protein ASH1 (ASH1) Homo sap. Accession-Nr.: NM_018489	Homo sap.	1q21.3

## Fortsetzung Tab. 14

Klon-Nr.	Homologie zu	Spezies	Kartierung auf Chromosom
<b>9.315 (rS)</b>	Glutaminyl-tRNA Synthetase (QARS), clone MGC:8477 IMAGE:2821788, Homo sap. Accession-Nr.: BC000394 Adulte männliche Lungen-cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone: 1200016L19, Mus musc. Accession-Nr.: AK004814	-	-
<b>9.330 (rS)</b>	Transforming growth factor, beta induced, 68 kDa (Tgfb1), Mus musc. Accession-Nr.: NM_009369	Homo sap. Mus musc.	3p21.3-p21.1 13
<b>9.333 (rS)</b>	Homologie unbekannt	-	-
<b>9.352 (rS)</b>	Kynurenin-Aminotransferase II (Kat2), Rattus nor. Accession-Nr.: NM_017193	Mus musc.	8
<b>9.383 (rS)</b>	Gewebespezifischer Plasminogen-Aktivator, Rattus nor. Accession-Nr.: NM_013151	Rattus norv. Homo sap.	16 (D16Rat42) 8p12-q11.2
<b>9.407 (vS)</b>	Dermatansulfat-Proteoglycan-II (Decorin), Rattus rat. Accession-Nr.: Z12298 S46094	Homo sap. Mus musc.	12q23 10
<b>9.420 (vS)</b>	Homologie unbekannt	-	-
<b>9.439 (vS)</b>	Homologie unbekannt	-	-

Die Genprodukte 9.40, 9.68, 9.70, 9.73, 9.191, 9.193, 9.237, 9.249, 9.333, 9.420, 9.439, die keine eindeutigen Homologien aufwiesen, wurden auf einen möglichen offenen Leserahmen untersucht. Dabei wurden innerhalb der einzelnen systematischen Kategorien differente genetische Codes berücksichtigt.

Die Daten sind in Tab. 15 zusammengestellt.

Die größten möglichen offenen Leserahmen unter Verwendung unterschiedlicher genetischer Codes zeigten die Genprodukte 9.193, 9.237 und 9.439 mit nur 192-207 bp. Die Produkte 9.40, 9.68, 9.70, 9.73, 9.191, 9.249, 9.333 und 9.420 wiesen dagegen potentielle offene Leserahmen zwischen 343-897 bp auf. Bei den Mitochondrien der niederen Invertebraten und denen der Hefe wurden die längsten und untereinander überwiegend vergleichbar großen offenen Leserahmen beobachtet. Der Klon 9.333 zeigte bei allen untersuchten genetischen Codes einen sehr einheitlichen offenen Leserahmen über 325-343 bp auf.

**Tab. 15: Potentielle offene Leserahmen der differentiell exprimierten Genprodukte unter Berücksichtigung unterschiedlicher genetischer Codes verschiedener Organismen.**

Klon-Nr.	Standard	Vertebraten-Mitochondrien	Hefe-Mitochondrien	Invertebraten-Mitochondrien
<b>9.40 (SV)</b>	+1: 568-947, <b>381 bp</b>	+3: 735-947, <b>214 bp</b>	-2: 486-926, <b>441 bp</b>	-2: 486-926, <b>441 bp</b>
<b>9.68 (SV)</b>	+1: 148-540, <b>393 bp</b>	+1: 487-753, <b>267 bp</b>	+3: 69-819, <b>819 bp</b>	+2: 17-913, <b>897 bp</b>
<b>9.70 (SV)</b>	+2: 131-325, <b>195 bp</b>	-2: 283-501, <b>219 bp</b>	-1: 116-748, <b>633 bp</b>	-1: 116-748, <b>633 bp</b>
<b>9.73 (SV)</b>	+3: 531-879, <b>350 bp</b>	+1: 622-879, <b>258 bp</b>	+1: 334-879, <b>546 bp</b>	+1: 334-879, <b>546 bp</b>
<b>9.191 (rV)</b>	-2: 458-868, <b>411 bp</b>	+2: 530-868, <b>339 bp</b>	+3: 453-779, <b>327 bp</b>	+2: 359-868, <b>510 bp</b>
<b>9.193 (rV)</b>	-	-	-2: 273-383, <b>111 bp</b>	-3: 173-364, <b>192 bp</b>
<b>9.237 (rV)</b>	-	-	+2: 2-112, <b>111 bp</b>	+3: 21-212, <b>192 bp</b>
<b>9.249 (rV)</b>	+1: 172-354, <b>183 bp</b>	+1: 625-861, <b>237 bp</b>	+1: 172-489, <b>318 bp</b>	+1: 100-861, <b>762 bp</b>
<b>9.333 (rV)</b>	+3: 483-806, <b>325 bp</b>	+3: 465-806, <b>343 bp</b>	+3: 465-806, <b>343 bp</b>	+3: 465-806, <b>343 bp</b>
<b>9.420 (SV)</b>	+1: 70-585, <b>516 bp</b>	+3: 15-209, <b>195 bp</b>	+1: 70-585, <b>516 bp</b>	+1: 70-585, <b>516 bp</b>
<b>9.439 (SV)</b>	+3: 174-332, <b>159 bp</b>	-3: 204-371, <b>168 bp</b>	-3: 204-371, <b>168 bp</b>	+2: 479-685, <b>207 bp</b>

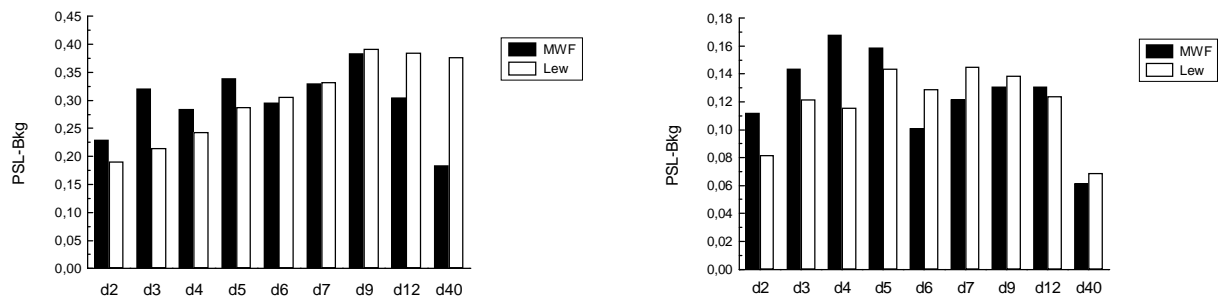
### 3.3.3.2 Northern Blot-Analyse

Die aus dem differentiellen Screening der cDNA-Subtraktion erhaltenen positiven Klone 9.40 (VS), 9.68 (VS), 9.70 (VS), 9.71 (VS), 9.73 (VS), 9.107 (VS), 9.139 (VS), 9.191 (rS), 9.193 (rS), 9.237 (rS), 9.249 (rS), 9.282 (rS), 9.306 (rS), 9.315 (rS), 9.330 (rS), 9.333 (rS), 9.352 (rS), 9.383 (rS), 9.407 (VS), 9.420 (VS) und 9.439 (VS) wurden zusätzlich mit Hilfe von Northern Blot-Analysen auf ihr differentielles Genexpressionsmuster überprüft (Abb. 37-48). Die Ergebnisse belegten, daß die überwiegende Anzahl der Genprodukte leicht bis eindeutig differentiell exprimiert waren. In den meisten Fällen wurde eine erhöhte Expression der Genprodukte bei den MWF-Ratten verzeichnet. Zu allen untersuchten Zeitpunkten konnte bei den Klonen 9.407 (VS) und 9.420 (VS) eine deutlich gesteigerte Expression in der Niere der MWF-Ratten beobachtet werden. Bei den Klonen 9.107 (VS), 9.306 (rS) und 9.383 (rS) lag nur zwischen Tag 2 und Tag 9 die Expression bei den MWF-Ratten erkennbar höher. Klon 9.139 (VS) indizierte in den frühen Lebensstagen zwischen Tag 2 und Tag 5 bei den MWF-Ratten eine manifest gesteigerte Expression. Bei den zwei Klonen 9.439 und 9.40 waren zu unterschiedlichen Zeitpunkten entweder in der MWF- oder in der Lew-Niere höhere Expressionsmuster zu detektieren. Der Klon 9.439 (VS) wies eine höhere Expression

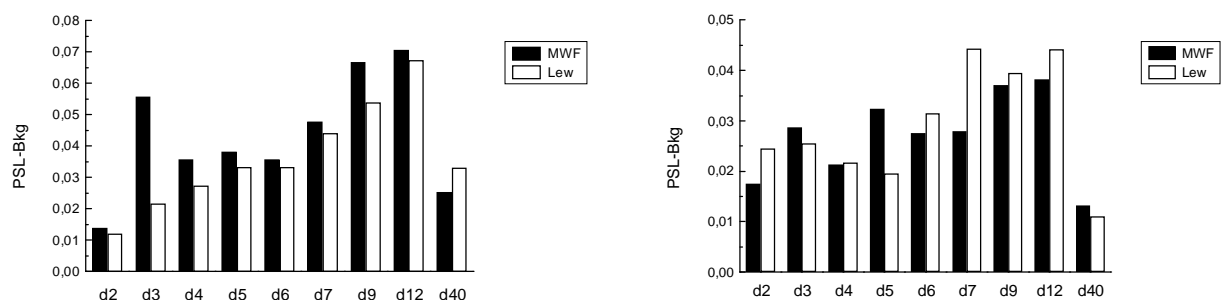


zwischen Tag 2 und Tag 6 und ab Tag 7 eine reduzierte Expression in der MWF-Niere auf und 9.40 (VS) dokumentierte bei der Lew-Ratte zwischen Tag 2 und Tag 5 eine leicht erniedrigte und ab Tag 12 eine deutlich ansteigende Expression. Nur bei den Klonen 9.193 (rS), 9.237 (rS) und 9.249 (rS) konnte bei der Lew-Ratte zu den untersuchten Zeitpunkten ein definitiv erhöhtes Expressionsmuster verzeichnet werden. Obwohl alle Klone aufgrund der Ergebnisse des differentiellen Screenings als eindeutig differentiell exprimiert klassifiziert wurden, war bei 6 Klonen zu diesem Zeitpunkt keine Abweichung im Expressionsmuster zu erkennen (z. B. 9.40 (VS), 9.68 (VS)). Wenige Klone wiesen dagegen nur am Tag 9 eine verstärkte Expression auf (9.282 (rS), 9.330 (rS)). Die Klone 9.70 (VS), 9.71 (VS), 9.73 (VS), 9.191 (rS), 9.315 (rS), 9.330 (rS), 9.352 (rS) waren überhaupt nicht oder nur unbedeutend differentiell exprimiert.

Der mit dem Genprodukt 9.333 (rS) hybridisierte Northern Blot offenbarte drei verschiedene Hybridisierungsmuster. Die erste und zugleich oberste Signalreihe mit einer Größe von ca. 9,49 kb zeigte höhere Werte, die zweite bzw. mittlere Signalreihe mit einer Größe von ca. 3,00 kb zwischen Tag 2 und Tag 5 eine leicht höhere und die dritte bzw. unterste Reihe mit einer Größe von ca. 0,20 kb eine zwischen Tag 4 und Tag 12 schwach erhöhte Expression in der MWF-Niere.



**Abb. 37: Northern Blot-Hybridisierung mit 9.40 (li.) und 9.68 (re.).**



**Abb. 38: Northern Blot-Hybridisierung mit 9.70 (li.) und 9.71 (re.).**

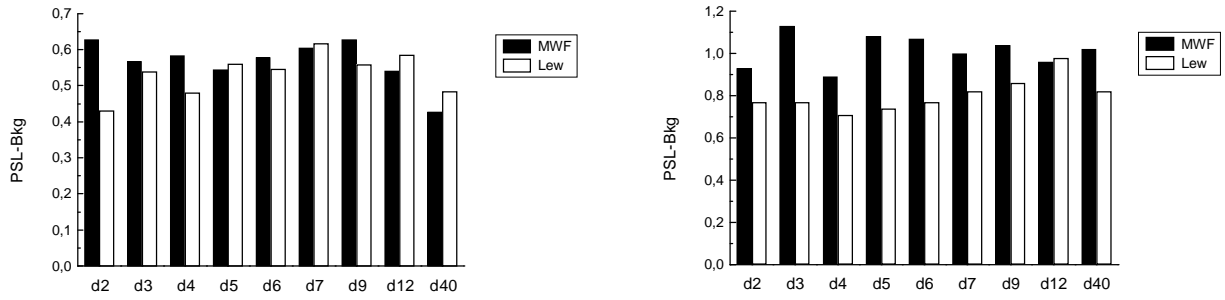


Abb. 39: Northern Blot-Hybridisierung mit 9.73 (li.) und 9.107 (re.).

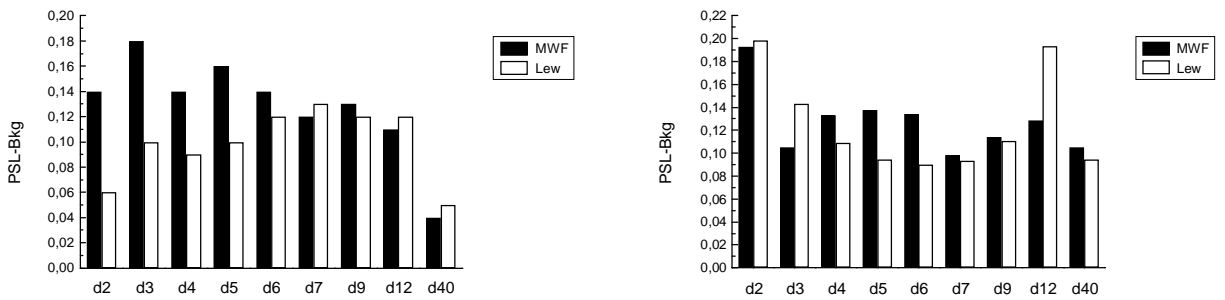


Abb. 40: Northern Blot-Hybridisierung mit 9.139 (li.) und 9.191 (re.).

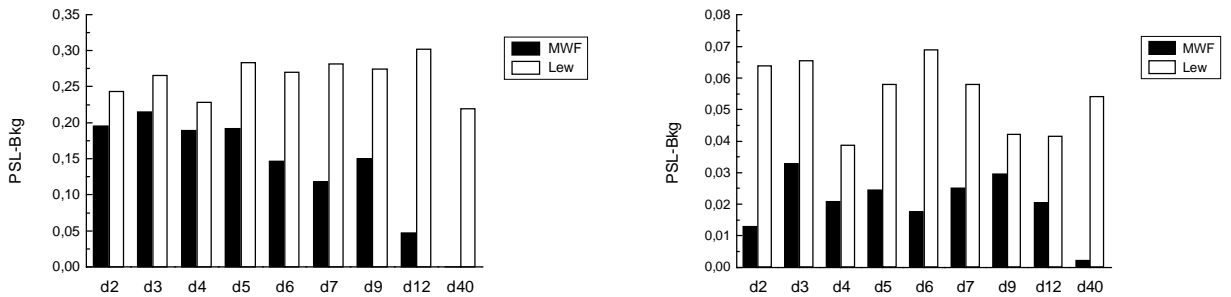


Abb. 41: Northern Blot-Hybridisierung mit 9.193 (li.) und 9.237 (re.).

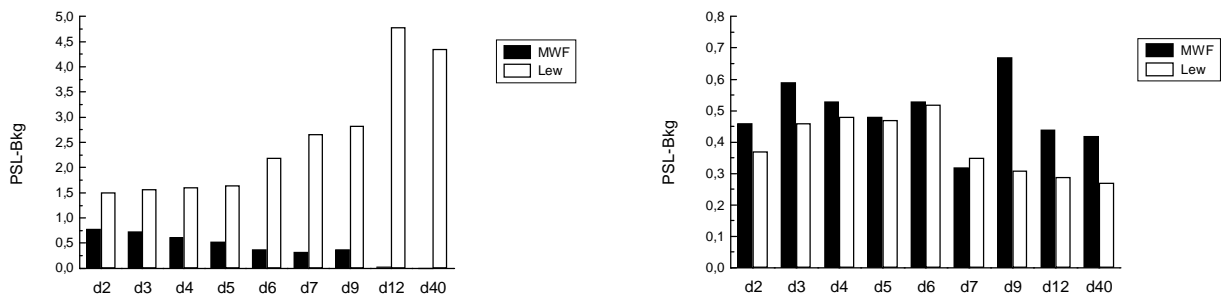


Abb. 42: Northern Blot-Hybridisierung mit 9.249 (li.) und 9.282 (re.).

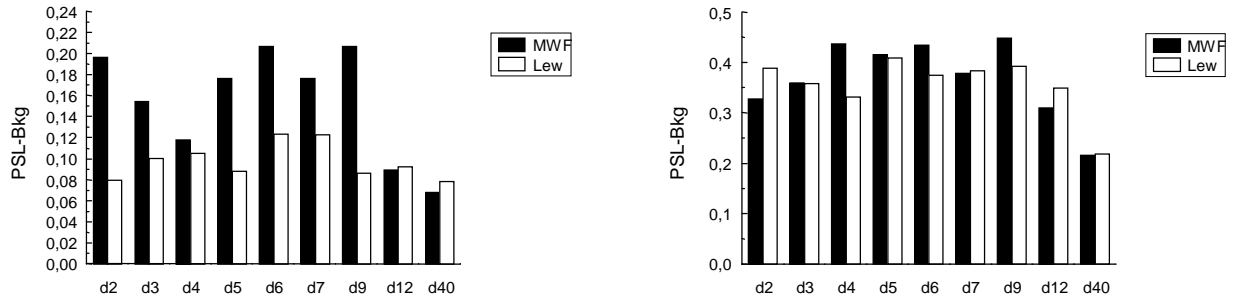


Abb. 43: Northern Blot-Hybridisierung mit 9.306 (li.) und 9.315 (re.).

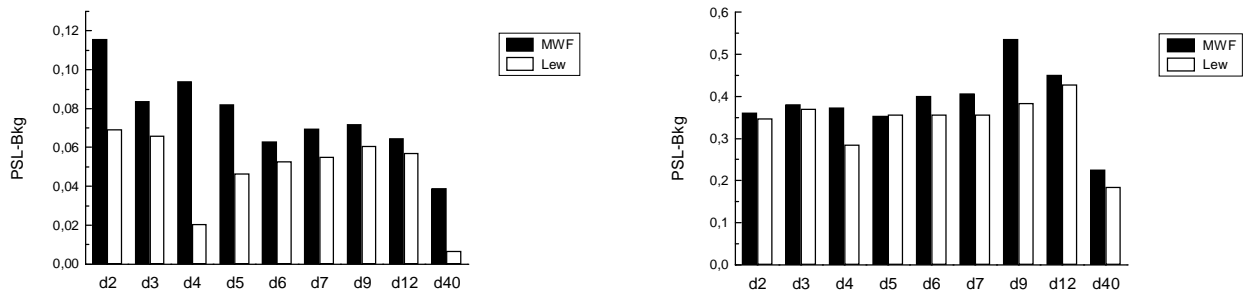


Abb. 44: Northern Blot-Hybridisierung mit 9.330 (li.) und 9.333 (re.), erstes Signal.

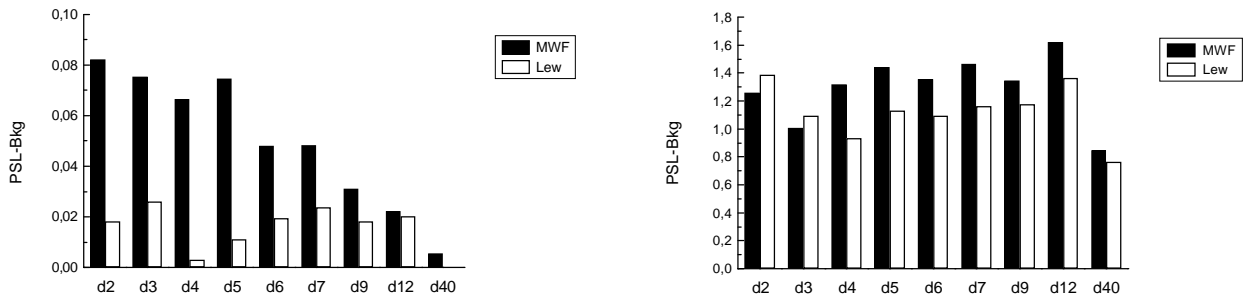


Abb. 45: Northern Blot-Hybridisierung mit 9.333 (li), zweites Signal und 9.333 (re.), drittes Signal.

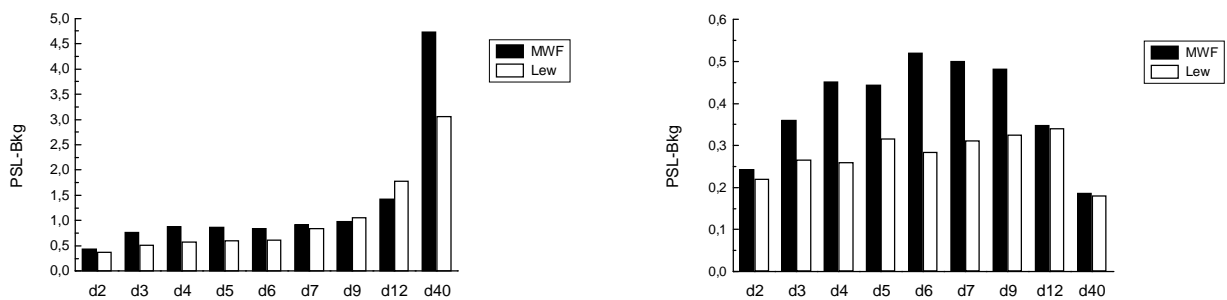
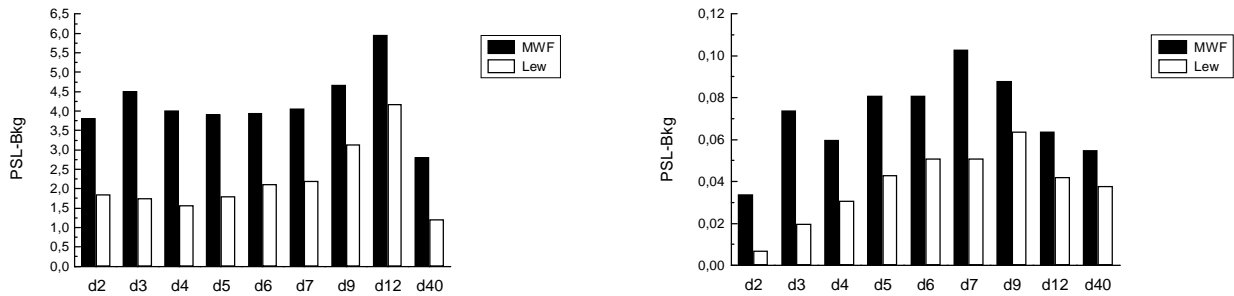
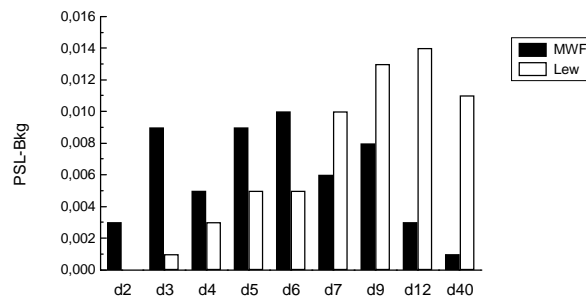


Abb. 46: Northern Blot-Hybridisierung mit 9.352 (li.) und 9.383 (re.).



**Abb. 47: Northern Blot-Hybridisierung mit 9.407 (li.) und 9.420 (re.).**



**Abb. 48: Northern Blot-Hybridisierung mit 9.439.**

### 3.3.3.3 Chromosomale Lokalisation der differentiell exprimierten Genprodukte

#### 3.3.3.3.1 Somatische Zellhybrid-Analyse

Einige der aufgrund der Northern Blot-Analysen differentiell exprimierten Genprodukte 9.71, 9.407 und 9.420 wurden über eine somatische Zellhybrid-Analyse bei der Ratte chromosomal lokalisiert. Die cDNA-Amplifikatlängen ließen bei den Klonen 9.71 mit 329 bp und 358 bp, 9.407 mit 379 bp und 435 bp und 9.420 mit 435 bp in einer Agarosegel-Analyse die erwarteten Produktgrößen erkennen. Die Authentizität aller cDNA-Primeramplifikate wurden über eine Sequenzierung überprüft. Die BLAST-Analysen der Genprodukte wiesen 100%ige Homologien zwischen den cDNA-Amplifikaten und der jeweiligen Ausgangssequenz auf.

Das Genprodukt 9.71 wurde auf Ratten-Chromosom 4, Genprodukt 9.407 auf Chromosom 7 und Genprodukt 9.420 auf Chromosom 1 kartiert.

### 3.3.3.2 Radiation Hybrid-Mapping

Die aus der cDNA-Subtraktion isolierten Genprodukte 9.139, 9.333, 9.352, 9.383 und 9.420 wurden über ein RH-Mapping bei der Ratte chromosomal lokalisiert. Die PCR-Produkte wiesen bei den Klonen 9.139 mit 480 bp, 9.352 mit 101 bp, 9.333 mit 177 bp und 9.420 mit 435 bp die erwarteten Amplifikatlängen auf und konnten über eine Sequenzierung zweifelsfrei den jeweiligen Ausgangssequenzen zugeordnet werden. Die Ergebnisse der Zwei-Punkt-Linkage-Analyse aus dem RH-Mapping sind in Tab. 16 aufgeführt.

**Tab. 16: Ergebnisse der Zwei-Punkt-Linkage-Analyse aus dem RH-Mapping.**

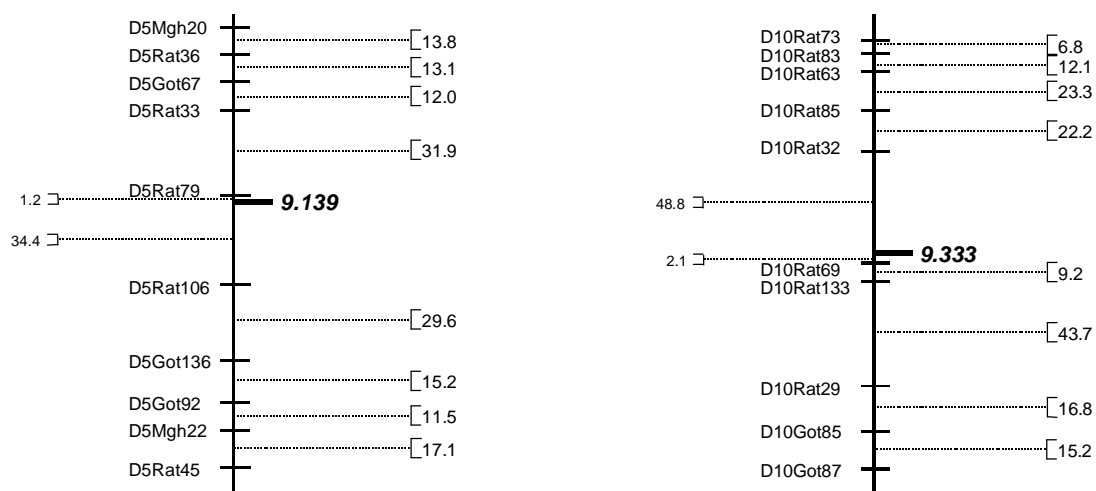
Genprodukt	Datenprofil und Markerposition der Zwei-Punkt-Linkage-Analyse		
9.139	20001 00000 20002 00002 00000 02000 00002 20200 01000 10001 20022 00012 20000 00001 00000 01000 01000 00102 01012 00021 00000 0		
	<b>RGD RHMAPSERVER</b>	<b>curatools.curagen</b>	<a href="http://www.ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html">http://www.ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html</a>
	D5Rat79 (lod>10,0)	D5Rat79 (lod=30,46)	D5Wox17 (lod=13,526)
9.333	20001 20000 21002 01102 00001 00011 00002 10200 00001 10100 20020 01112 10000 00000 00000 00000 01000 01012 00000 00000 00000 0		
	<b>RGD RHMAPSERVER</b>	<b>curatools.curagen</b>	<a href="http://www.ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html">http://www.ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html</a>
	D10Rat69 (lod>10,0)	D10Rat69 (lod=25,30)	D10Wox15 (lod=14,613)
9.352	21001 01010 00000 00002 01101 11010 01012 10210 00001 01011 01001 01012 01110 01111 11101 00001 00011 10102 00110 01001 22222 2		
	<b>RGD RHMAPSERVER</b>	<b>curatools.curagen</b>	<a href="http://www.ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html">http://www.ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html</a>
	D16Got31 (lod>10,0)	D16Rat43 (lod=13,14)	D16Rat52 (lod=8,322)
9.420	20001 00010 20002 00012 00101 00000 00102 10200 02000 10020 21021 01012 00000 01000 10100 00000 00011 10102 00001 00001 01001 1		
	<b>RGD RHMAPSERVER</b>	<b>curatools.curagen</b>	<a href="http://www.ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html">http://www.ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html</a>
	D1Rat208 (lod>10,0)	D1Rat208 (lod=27,97)	D1Got179 (lod=12,175)

Das Genprodukt 9.139 wurde auf Ratten-Chromosom 5 kartiert (Abb. 49) und befand sich 1,2 cR und 29,6 cR von den flankierenden Markern D5Rat79 und D5Rat106 entfernt (lod>10,0; RGD RHMAPSERVER).

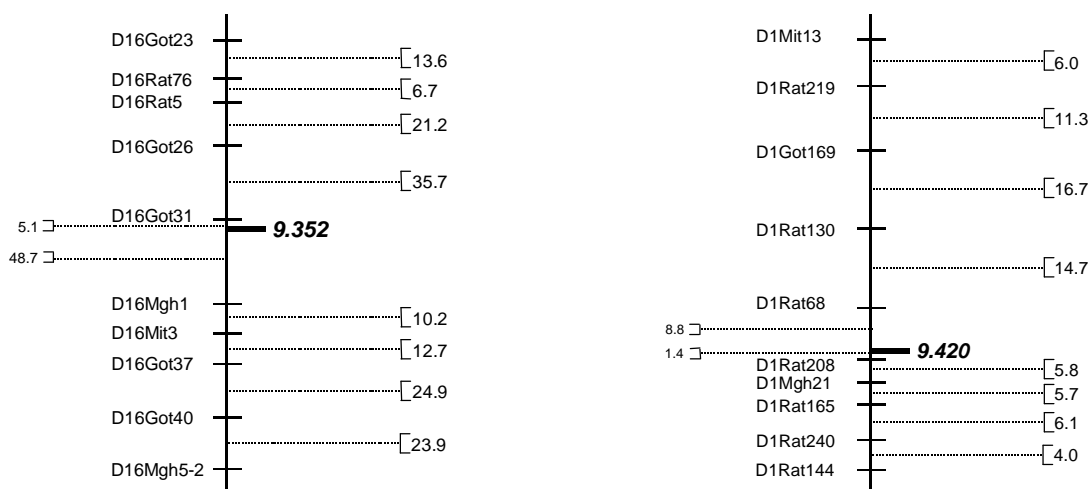
Der Klon 9.333 wurde auf Chromosom 10 lokalisiert (Abb. 49) und war 48,8 cR und 2,1 cR von den flankierenden Markern D10Rat32 und D10Rat69 plaziert (lod>10,0; RGD RHMAPSERVER).

Das Genprodukt 9.352 wurde auf Chromosom 16 kartiert (Abb. 50) und stand 5,1 cR und 10,2 cR in Distanz zu den flankierenden Markern D16Got31 und D16Mgh1 (lod>10,0; RGD RHMAPSERVER).

Der Klon 9.420 wurde auf Chromosom 1 lokalisiert (Abb. 50) und lag 8,8 cR und 5,8 cR von den flankierenden Markern D1Rat68 und D1Rat208 entfernt (lod>10,0; RGD RHMAPSERVER).



**Abb. 49: RH-Mapping der Klone 9.139 auf Ratten-Chromosom 5 und 9.333 auf Ratten-Chromosom 10. Distanzen in cR.**



**Abb. 50: RH-Mapping der Klone 9.352 auf Ratten-Chromosom 16 und 9.420 auf Ratten-Chromosom 1. Distanzen in cR.**

### 3.4. Auswertung der Mikroarray-Analyse

Über die Mikroarray-Analyse von Nieren-RNA aus 9 Tage alten MWF- und Lew-Ratten wurden 301 differentiell exprimierte Genprodukte mit einem p-Wert  $p < 0,001$  detektiert.

Die differentielle Expression des Genprodukts Decorin (Klon 9.407, Tab. 14; Dermatan-sulfat-Proteoglycan-II, *Dcn*, Accession-Nr. Z12298 S46094) aus der cDNA-Subtraktion wurde über die Mikroarray-Analyse bestätigt ( $p = 0,00004$ ). Mittels der Northern Blot- und der Chip-Analyse konnte bei der MWF-Ratte eine ca. zweifach höhere Expression nachgewiesen werden.

*Dcn* kartiert auf Ratten-Chromosom 7 (D7Rat76; Datenbankanalyse, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) und weist daher keine Ko-Lokalisation zu QTL der Kopplungsanalyse auf.

Mit Ausnahme der Genprodukte 9.40, 9.71, 9.315 und 9.330, die nicht auf den verwendeten Mikroarray-Chips enthalten sind, wurden die übrigen differentiell exprimierten Transkripte der cDNA-Subtraktion nicht über die Mikroarray-Analyse bestätigt.

Von den 297 identifizierten differentiell exprimierten Genprodukten waren 46 Transkripte auf Chromosomen lokalisiert, die in der Kopplungsanalyse für die untersuchten Phänotypen Albuminurie, systolischer Blutdruck, Proteinurie und Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt relevante QTL aufwiesen. Ko-Lokalisationen zwischen diesen QTL und den erhaltenen Transkripten wurden für 30 Genprodukte ermittelt.

Die Ergebnisse sind in Tab. 17 aufgelistet. (Genprodukte ohne Ko-Lokalisationen zu QTL der Kopplungsanalyse s. Tab. 21, Anhang).

Bei 183 differentiell exprimierten Genen liegen noch keine Kartierungen vor, so daß eine Aussage über bestehende Ko-Lokalisationen zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich ist (Daten werden nicht präsentiert).

**Tab. 17: Differentiell exprimierte Genprodukte der Mikroarray-Analyse, die Ko-Lokalisationen zu QTL der Kopplungsanalyse aufzeigen.**

Genprodukt	Accession-Nr.	Signifikanz differentielle Expression	Chromosom und Marker- position	QTL der Kopplungs- analyse
cDNA, 3' end /clone=ui-r-e0-ca-h-07-0-ui /clone_end=3' /gb=aa859980 /gi=2949500 /ug=rn.855 /len=482, ui-r-e0-ca-h-07-0-ui.s1 rattus norv.	rc_AA859980_at	p=0,00034 Lew>MWF	1, D1Rat91	Systolischer Blutdruck 14. Woche
Apolipoprotein e precursor (apo-e), p02650 rattus norv., 12/1998	X04979_at	p=0,00036 Lew>MWF	1, D1Rat23	Systolischer Blutdruck 14. Woche
best hit: y09010 m.musculus mRNA for serine/threonine kinase. 10/1996 e=1.0e-141 i=91%	rc_AA891302_g_at	p=0,00008 MWF>Lew	1, D86641	Systolischer Blutdruck 14. Woche, Albuminurie 14./24. Woche?
cDNA, 3' end /clone=rpcbd78 /clone_end=3' /gb=h31964 /gi=977381 /ug=rn.14605 /len=219, est106549 rattus norv.	rc_H31964_at	p=0,0003 MWF>Lew	1, D1Rat189	Systolischer Blutdruck 14. Woche, Albuminurie 14./24. Woche?
cDNA, 3' end /clone=ui-r-e0-cn-h-07-0-ui /clone_end=3' /gb=aa875665 /gi=2980613 /ug=rn.2997 /len=346, ui-r-e0-cn-h-07-0-ui.s1 rattus norv.	rc_AA875665_g_at	p=0,0005 MWF>Lew	1, D1Rat27	Systolischer Blutdruck 14. Woche, Albuminurie 14./24. Woche?
creatine kinase, m chain (ec 2.7.3.2) (m-ck), p00564 rattus norv., 5/2000	M10140_at	p=0,00059 Lew>MWF	4, D4Rat77	Systolischer Blutdruck 14. Woche
sh3 domain binding protein (cr16) mRNA, alternatively spliced, mu31159 rattus norv.	U31159_s_at	p=0,00098 Lew>MWF	4, D4Rat108	Systolischer Blutdruck 14. Woche
catechol o-methyltransferase, membrane-bound form (mb-comt), p22734 rattus norv., 12/1998	M60753	p=0 Lew>MWF	5, D5Rat50	Systolischer Blutdruck 14. Woche
Hydroxymethylglutaryl-coa lyase, mitochondrial precursor (ec 4.1.3.4) (hmg-coa lyase) (hl) (3-hydroxy-3-methylglutarate-coa lyase), p97519 rattus norv., 7/1999	rc_A1171090_g_at	p=0,00007 MWF>Lew	5, D5Rat79	Systolischer Blutdruck 14. Woche
tubulin beta chain (t beta-15), p04691 rattus norv., 7/1999	X03369_s_at	p=0,00033 MWF>Lew	5, D5Got77	Systolischer Blutdruck 14. Woche
sodium/glucose cotransporter 2 (na+)/glucose cotransporter 2, p53792 rattus norv., 7/1998	U29881	p=0,00001 Lew>MWF	1, D1Rat219	Albuminurie 14. Woche?
acyl-coa dehydrogenase, short/branched chain specific precursor (ec 1.3.99.-) (sbcad) (2-methyl branched chain acyl-coa dehydrogenase) (2-mebcad), p70584 rattus norv., 7/1999	U64451_at	p=0,00001 MWF>Lew	1, D1Got169	Albuminurie 14./24. Woche?



## Fortsetzung Tab. 17

Genprodukt	Accession-Nr.	Signifikanz	Chromosom und Markerposition	QTL der Kopplungsanalyse
		differentielle Expression		
best hit: m96760 mouse rod outer segment membrane protein 1 (rom1) gene exons 1-3, 3/2000 e=2.0e-75 i=91%	rc_AA892855_at	p=0,00003 MWF>Lew	1, D1Rat115	Albuminurie 14./24. Woche?
mRNA for b1 bradykinin receptor, rno132230 rattus norv.	AJ132230_g_at	p=0,0002 Lew>MWF	6, D6Rat10	Albuminurie 24. Woche?
Dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial precursor (ec 2.3.1.61) (e2) (e2k), q01205 rattus norv., 5/2000	D90401_g_at	p=0,00028 Lew>MWF	6, D90401	Albuminurie 24. Woche?
cDNA, 3' end /clone=ui-r-c0-ig-h-06-0-ui /clone_end=3' /gb=aa998683 /ug=rn.3841 /len=436, ui-r-c0-ig-h-06-0-ui.s1, rattus norv.	rc_AA998683_g_at	p=0,00003 MWF>Lew	12, D12Mit2	Albuminurie 14./24. Woche
claudin-3 (ventral prostate.1 protein) (rvp1), q63400 rattus norv., 5/2000	AJ011656cnds_s_at	p=0,00004 MWF>Lew	12, D12Got46	Albuminurie 14./24. Woche
Phosphotriesterase related protein (parathion hydrolase-related protein) (resiniferotoxin-binding phosphotriesterase-related protein). q63530 rattus norv., 7/1999	X99477	p=0,00005 Lew>MWF	17, D17Rat52	Albuminurie 14./24. Woche
Cytochrome p450 2c23 (ec 1.14.14.1) (cyp11c23) (arachidonic acid epoxygenase), p24470 rattus norv., 7/1999	U04733_s_at	p=0,00032 Lew>MWF	1, D86086	Subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt 24. Woche
aspartate aminotransferase, cytoplasmic (ec 2.6.1.1) (transaminase a) (glutamate oxaloacetate transaminase-1), p13221 rattus norv., 7/1998	J04171_at	p=0,00048 Lew>MWF	1, D1Rat80	Subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt 24. Woche
ui-r-e0-bu-f-02-0-ui.s2 rattus norvegicus cdna, 3' end /clone=ui-r-e0-bu-f-02-0-ui /clone_end=3' /gb=aa875136 /gi=2980084 /ug=rn.2804 /len=581	rc_AA875136_at	p=0,00011 MWF>Lew	1, D00634	Subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt 24. Woche
annexin i (lipocortin i) (calpactin ii) (chromobindin 9) (p35) (phospholipase a2 inhibitory protein), p07150 rattus norv., 5/2000	rc_AI171962_s_at	p=0,00013 MWF>Lew	1, D1Rat300	Subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt 24. Woche?
gdnf receptor alpha precursor (gdnfr-alpha) (tgf-beta related neurotrophic factor receptor 1) (ret ligand 1), q62997 rattus norv., 7/1998	U97142_at	p=0,00056 MWF>Lew	1, D00634	Subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt 24. Woche
Kynurenine 3-hydroxylase mRNA, rattus norv.	AF056031_at	p=0,00023 Lew>MWF	13, D13Rat86	Subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt 24. Woche
cDNA, 3' end /clone=atcc-2000580 /clone_end=3' /gb=h31456 /gi=976873 /ug=rn.23057 /len=356, est105500 rattus norv.	rc_H31456_at	p=0,00056 Lew>MWF	13, D13Rat33	Subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt 24. Woche

## Fortsetzung Tab. 17

Genprodukt	Accession-Nr.	Signifikanz	Chromosom und Markerposition	QTL der Kopplungsanalyse
		differentielle Expression		
Macrophage migration inhibitory factor (mif) (glutathione-binding 13 kda protein), p30904 rattus norv., 11/1997	rc_A1009801_at	p=0,00058 MWF>Lew	13, D13Rat76	Subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt 24. Woche
poly [adp-ribose] polymerase (ec 2.4.2.30) (parp) (adprt) (nad(+)-adp-ribosyltransferase) (poly[adp-ribose] synthetase), p27008 rattus norv., 7/1998	U94340_at	p=0,00012 MWF>Lew	13, D13Rat54	Subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt 24. Woche
high affinity immunoglobulin epsilon receptor alpha-subunit precursor (fceri) (ige fc receptor, alpha-subunit) (fc-epsilon ri-alpha), p12371 rattus norv., 7/1999	M21622_at	p=0,00068 Lew>MWF	13, D13Mgh17	Subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt 24. Woche
c-x-c chemokine receptor type 4 (cxc-r4) (cxcr-4) (sdf-1 receptor) (stromal cell-derived factor 1 receptor) (fusin) (leukocyte-derived seven transmembrane domain receptor) (lestr), o08565 rattus norv., 7/1998	U90610_at	p=0,00075 MWF>Lew	13, D13Mgh3	Subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt 24. Woche
histone acetyltransferase type b subunit 2 (retinoblastoma binding protein p46) (retinoblastoma-binding protein 7), q16576 homo sap., 12/1998	AF090306_s_at	p=0,00045 Lew>MWF	X, DXRat67	Subkapsuläre Glomeruli ohne Kapselkontakt 24. Woche

### 3.5 Ko-Lokalisationen zwischen differentiell exprimierten Genprodukten der cDNA-Subtraktion und QTL der Kosegregationsanalyse

Im Verlauf der Arbeit wurden die differentiell exprimierten Genprodukte aus der cDNA-Subtraktion mit den QTL der Kosegregationsanalyse auf potentielle Ko-Lokalisationen untersucht. Das differentiell exprimierte Transkript 9.139 (*Luzp1*) kartierte ca. 2 cM vom Marker D5Rat41 auf Ratten-Chromosom 5 und zeigte eine Ko-Lokalisation mit dem aus der Kosegregationsanalyse stammenden QTL systolischer Blutdruck der 14. Woche der gleichen Markerposition (Abb. 23).

Das differentiell exprimierte Genprodukt 9.107 (*AldoA*) kartierte ca. 6 cM vom Marker D1Rat59 entfernt auf Ratten-Chromosom 1 und wies eine potentielle Ko-Lokalisation mit dem QTL Albuminurie der 14. Woche an der Markerposition D1Rat38 auf (Abb. 24).

Bei den über die somatischen Zellhybride kartierten Genprodukte 9.71 auf Ratten-Chromosom 4, 9.407 auf Chromosom 7, und 9.420 auf Chromosom 1 war eine Aussage

bezüglich potentieller Ko-Lokalisationen nicht möglich, da die somatische Zellhybrid-Analyse keine Zuordnung der Produkte zu einzelnen Markerpositionen erlaubte.

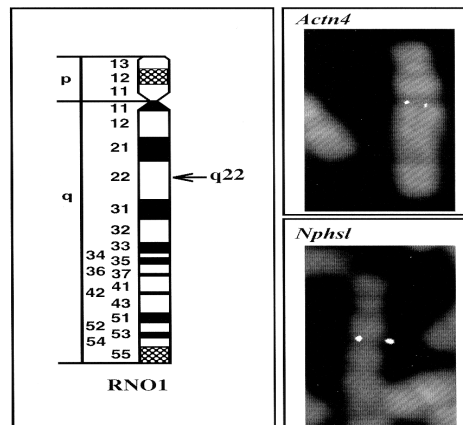
### **3.6 Ermittlung von Ko-Lokalisationen zwischen krankheitsrelevanten Kandidatengen und QTL aus der Kosegregationsanalyse**

Zusätzlich zur Kosegregationsanalyse und zur differentiellen Genexpressionsanalyse wurden die literaturbekannten Kandidatengene Nephtrin,  $\alpha$ -Aktinin-4 und Zonula occludens-1 chromosomal bei der Ratte lokalisiert. Es wurden Nephtrin,  $\alpha$ -Aktinin-4, Zonula occludens-1, Kallikrein 1, die Komponenten des Endothelinsystems, das bekannte Kandidatengen Renin, die differentiell exprimierten Genprodukte der cDNA-Subtraktion und die aus der Kosegregationsanalyse stammenden QTL auf eventuell existierende Ko-Lokalisationen untersucht.

#### **3.6.1 Nephtrin, $\alpha$ -Aktinin-4 und Zonula occludens-1**

Nephtrin (*Nphs1*) und  $\alpha$ -Aktinin-4 (*Actn4*) wurden über eine FISH-Analyse bei der Ratte chromosomal lokalisiert.

Für die FISH-Analyse wurden für *Nphs1* ein 583 bp großes Fragment und für *Actn4* ein 713 bp großes Fragment verwendet, deren Identität jeweils über eine Agarosegel-Elektrophorese bestätigt wurden. Die cDNA-Amplifikate beider Genprodukte wurden einer Sequenz- und BLAST-Analyse unterzogen. *Nphs1* und *Actn4* zeigten 100%ige Homologien zwischen den cDNA-Amplifikaten und der jeweiligen Ausgangssequenz. Bei der FISH-Analyse lag die Anzahl der Zellen mit spezifischen Signalen bei *Nphs1* bei 1(0), 2(14), 3(0) und 4(4) Chromatiden/Zelle und bei *Actn4* bei 1(0), 2(9), 3(0) und 4(1) Chromatiden/Zelle. *Nphs1* wurde bei 1q22 und *Actn4* ebenfalls bei 1q22 der Ratte lokalisiert (Abb. 51; Schulz et al., 2000).



**Abb. 51: Lokalisierung von *Actn4* und *Nphs1* auf Ratten-Chromosom 1: Ausschnitt einer Zellmetaphase bei der Ratte. Signale bei 1q22. DAPI-Färbung.**

Zur Konfirmierung der FISH-Ergebnisse von *Nphs1* und *Actn4* und zur chromosomalen Lokalisation von *Zo-1* wurde ein RH-Mapping durchgeführt. Die Agarosegel-Elektrophorese zeigte für *Nphs1* ein 233 bp, für *Actn4* ein 189 bp und für *Zo-1* ein 299 bp großes Amplifikat. Die Produkte entsprachen jeweils den erwarteten Fragmentgrößen.

Über eine Sequenzierung ließen sich für die Amplifikate 100%ige Homologien mit den jeweiligen Ausgangssequenzen nachweisen. Die Ergebnisse der Zwei-Punkt-Linkage-Analyse aus dem RH-Mapping sind in Tab. 18 zusammengefaßt.

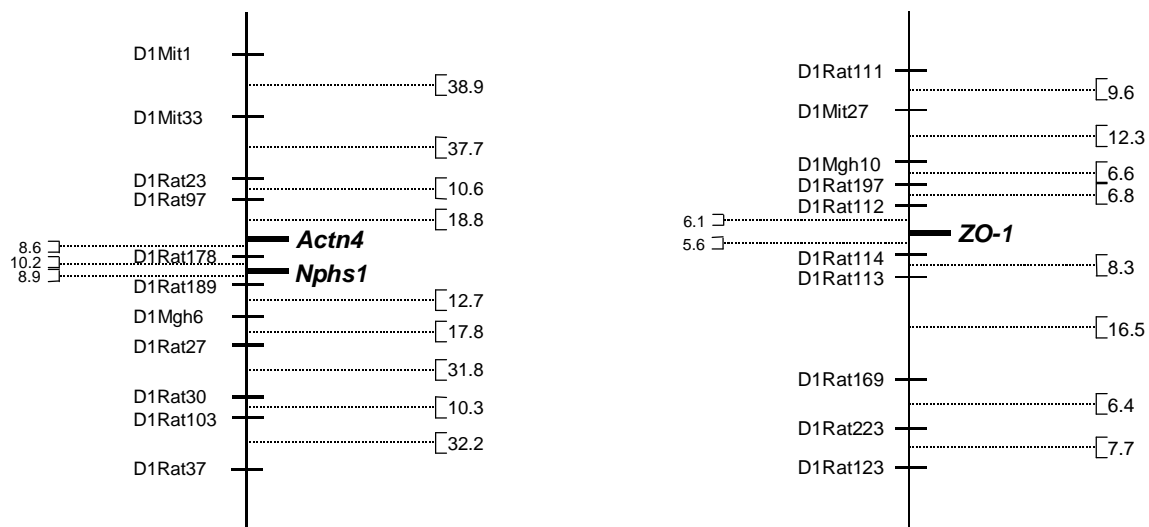
**Tab. 18: Ergebnisse der Zwei-Punkt-Linkage-Analyse aus dem RH-Mapping.**

Genprodukt	Datenprofil und Markerposition der Zwei-Punkt-Linkage-Analyse		
<i>Nphs1</i>	20010 00100 00000 00002 01110 01010 00002 00200 00002 00000 01001 00002 01101 00011 01000 00000 11010 02102 02010 10010 22222 2		
	RGD RMAPSERVER	curatools.curagen	<a href="http://www.ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html">http://www.ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html</a>
	D1Rat189 (lod>10,0)	D1Rat178 (lod=26,57)	D1Rat98 (lod=15,291)
<i>Actn4</i>	20020 00100 00000 00002 01100 01020 00002 00200 00000 00000 02001 00002 00000 00001 01000 10000 11000 00102 00001 10010 22222 2		
	RGD RMAPSERVER	curatools.curagen	<a href="http://www.ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html">http://www.ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html</a>
	D1Rat178 (lod>10,0)	D1Rat97 (lod=22,35)	D1Got82 (lod=6,127)
<i>Zo-1</i>	20101 00120 20002 10002 00000 00000 00102 20200 00001 10010 20021 01022 01100 00012 00001 02000 01000 00102 01001 11001 00000 0		
	RGD RMAPSERVER	curatools.curagen	<a href="http://www.ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html">http://www.ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html</a>
	-	D1Rat112 (lod=16,58)	D1Rat71 (lod=5,358)

*Nphs1* wurde auf Ratten-Chromosom 1 kartiert (Abb. 52) und befand sich 10,2 cR und 8,9 cR von den flankierenden Markern D1Rat178 und D1Rat189 entfernt (lod>10,0; RGD RHMAPSERVER; Schulz et al., 2000).

*Actn4* wurde auf Chromosom 1 lokalisiert (Abb. 52) und war 8,6 cR und 18,8 cR von den flankierenden Markern D1Rat178 und D1Rat97 plaziert (lod>10,0; RGD RHMAPSERVER; Schulz et al., 2000).

*Zo-1* wurde auf Chromosom 1 kartiert (Abb. 52) und stand 6,1 cR und 5,6 cR in Distanz zu den flankierenden Markern D1Rat112 und D1Rat114 (lod=16,58; curatools.curagen).



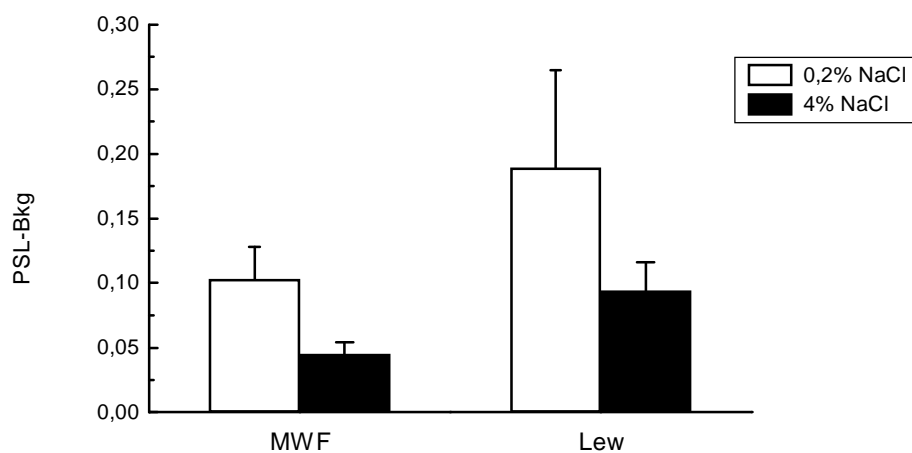
**Abb. 52: RH-Mapping von *Nphs1* und *Actn4* auf Ratten-Chromosom 1 und *Zo-1* auf Ratten-Chromosom 1. Distanzen in cR.**

Mit Hilfe der FISH-Analyse und des RH-Mappings konnte gezeigt werden, daß *Nphs1* und *Actn4* eine mögliche Ko-Lokalisation mit dem aus der Kosegregationsanalyse erhaltenen QTL systolischer Blutdruck in der 14. Woche in der Markerregion D1Rat136 aufwiesen. *Nphs1* und *Actn4* kartierten ca. 21 cM entfernt von dieser Markerposition und befanden sich damit innerhalb des Signifikanzbereiches (Abb. 21). Der zweite QTL Albuminurie in der 14. und 24. Woche der Markerregion D1Rat51 lag ca. 18 cM von den Loci der beiden Kandidatengene *Nphs1* und *Actn4* entfernt. Diese wiesen allerdings für den QTL Albuminurie keine signifikanten p-Werte auf (Abb. 24-25).

Für *Zo-1* wurden keine Ko-Lokalisationen mit den in der Kosegregationsanalyse gefundenen QTL beobachtet.

### 3.6.2 Renin, antinatriuretisches Peptid und Kallikrein 1

Weiterhin wurde das Expressionsmuster des literaturbekannten Kandidatengens Renin (Ren) in einer Northern Blot-Analyse bei den Parentaltieren MWF und Lew untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß Ren bei der MWF-Ratte im Vergleich zur Lew-Ratte unter basalen Bedingungen niedrig supprimiert war (Abb. 53). Nach Hochsalzdiät wies Ren im MWF- und Lew-Stamm eine geringere Expression auf.



**Abb. 53: Northern Blot-Hybridisierung mit Renin.**

Das Kandidatengens *Ren* wurde von Fukamizu et al. (1988) auf Chromosom 13q13 der Ratte lokalisiert. Es befindet sich in der Markerposition D13Wox5 bzw. D13Arb7 und lag ca. 8 cM von dem in der Kosegregationsanalyse für den Phänotyp subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt gefundenen Marker D13Rat62 entfernt. Damit befindet sich *Ren* im Signifikanzbereich (Abb. 35).

Als weiteres potentielles Kandidatengens wurde das bereits in der Literatur beschriebene antinatriuretische Peptid (*Anf*) hinzugezogen. Szpirer et al. lokalisierten 1989 *Anf* auf Ratten-Chromosom 5 in der Markerregion D5Wox10 und D5Mit15. *Anf* zeigte damit nach eigenen Untersuchungen eine Ko-Lokalisation mit dem QTL systolischer Blutdruck in der 14. Woche an der Markerposition D5Rat99 (Abb. 23).

Kallikrein 1 (*Klk1*) wurde von Chen et al. (1988) in der Markerregion D1Wox18, D1Mco28 und D1Arb51 auf Ratten-Chromosom 1 kartiert. *Klk1* befand sich im Markerintervall D1Rat27 in der QTL-Region für systolischen Blutdruck der 14. Woche (Abb. 21).

### 3.6.3 Gene des Endothelinsystems

Das Endothelin 1-Gen (*Edn1*) des Endothelinsystems kartiert auf Ratten-Chromosom 17 an der Markerposition D17Mco5 (Dracheva et al., 2000) und lag ca. 7 cM von dem in der Kopplungsanalyse verwendeten Marker D17Rat58 entfernt. D17Rat58 ergab eine Ko-Lokalisation mit dem QTL Albuminurie in der 14. und 24. Woche (Abb. 30-31).

Das Endothelin-Converting-Enzym-1-Gen (*ECE-1*) befindet sich auf Ratten-Chromosom 5 an der Markerposition D5Mco18 (Deng et al., 1995) und kartierte ca. 7 cM von dem aus der Kopplungsanalyse stammenden Marker D5Mgh16 entfernt, so daß eine Ko-Lokalisation mit dem QTL systolischer Blutdruck in der 14. Woche an der Hauptmarkerposition D5Rat41 nachgewiesen werden konnte (Abb. 23).

Das Endothelin 2-Gen (*Edn2*) ist auf Chromosom 5 der Markerposition D5Mco19 (Deng et al., 1994) und das Endothelin 3-Gen (*Edn3*) auf Chromosom 3 in der Markerregion D3Mco3, D3Mco4 und D3Mgh10 (Deng et al., 1994) lokalisiert. Beide Loci ließen keine Ko-Lokalisationen mit QTL der Kosegregationsanalyse erkennen.

Für den ET<sub>A</sub>-Rezeptor (*ET<sub>A</sub>*), der auf Ratten-Chromosom 19 an der Markerposition D19Mco2 (Deng et al., 1994), und für den ET<sub>B</sub>-Rezeptor (*ET<sub>B</sub>*), der auf Ratten-Chromosom 15 an den Markerpositionen D15Mco2 und D15Mco3 (Deng et al., 1994) kartiert, konnten keine Ko-Lokalisationen zu relevanten Loci aus der Kosegregationsanalyse gefunden werden.

### 3.7 Zusammenfassende Präsentation der experimentell nachgewiesenen Ko-Lokalisationen

Die in der vorliegenden Arbeit detektierten Ko-Lokalisationen zwischen den QTL der Kosegregationsanalyse, den differentiell exprimierten Genprodukten aus der differentiellen Genexpressionsanalyse und den untersuchten Kandidatengen werden in Tab. 19 dargestellt.

Ko-Lokalisationen zwischen den differentiell exprimierten Genprodukten der Mikroarray-Analyse und der Kopplungsanalyse sind in Tab. 17 aufgelistet.

**Tab. 19: Ko-Lokalisationen zwischen Kandidatengenregionen aus der Kopplungsanalyse, der differentiellen Genexpressionsanalyse und der Kandidatengen-Analyse.**

QTL bzw. Kandidatengen	Ratten-Chromosom	Markerposition	QTL der Kopplungsanalyse
<b>9.107 (<i>AldoA</i>)</b>	1	D1Mco16, D1Arb19	Albuminurie 14. Woche
<b>9.139 (<i>Luzp1</i>)</b>	5	D5Rat79	Systolischer Blutdruck 14. Woche
<b><i>Nphs1</i></b>	1	D1Rat178	Systolischer Blutdruck 14. Woche
<b><i>Actn4</i></b>	1	D1Rat178	Systolischer Blutdruck 14. Woche
<b><i>Ren</i></b>	13	D13Wox5, D13Arb7	Subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt 24. Woche
<b><i>Anf</i></b>	5	D5Wox10, D5Mit15	Systolischer Blutdruck 14. Woche
<b><i>Klk1</i></b>	1	D1Wox18, D1Mco28, D1Arb51	Systolischer Blutdruck 14. Woche
<b><i>Edn1</i></b>	17	D17Mco5	Albuminurie 14. und 24. Woche
<b><i>ECE-1</i></b>	5	D5Mco18	Systolischer Blutdruck 14. Woche