3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Parentalstämme MWF und SHR

In einer vorangehenden Studie unserer Arbeitsgruppe erfolgten Untersuchungen an einer Rückkreuzungspopulation zwischen den Parentaltierstämmen MWF und Lewis (Schulz *et al.*, 2002). Hier fanden sich erste Hinweise für einen QTL einer früh einsetzenden Albuminurie unter anderem auf dem Rattenchromosom RNO 6[1]. Um die beiden phänotypischen Effekte Hypertonie und Nephropathie zu verstärken, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Rückkreuzungspopulation gezüchtet, wobei der normotensive und nierengesunde Lewis-Stamm gegen den SHR-Stamm ausgetauscht wurde. Dieser entwickelt, wie auch der MWF-Stamm, eine spontane arterielle Hypertonie, zeigt jedoch im Vergleich zu diesem eine nur sehr geringe Albuminurie.

In den verwendeten Inzuchtlinien MWF und SHR liegt die genetische Homogenität gleichgeschlechtlicher Tiere bei über 99 % (Ganten & de Jong, 1994). Zunächst wurde in der Arbeitsgruppe mit einer systematischen Genomanalyse der Inzuchtgrad der MWF-Tiere überprüft, wodurch diese genetische Homogenität bestätigt werden konnte.

3.1.1 Körpergewicht, Nierengewicht, Plasmaglukose und Serumkreatinin

Die Daten für Körpergewicht, Nierengewicht, Plasmaglukose und Serumkreatinin der Parentaltiere sind in Tab. 3.1 dargestellt. Bei MWF-Ratten war das Körpergewicht, das Nierengesamtgewicht und der Quotient aus Nierengewicht und Körpergewicht signifikant geringer als bei SHR-Ratten ($p < 0{,}05$). Die Werte von Plasmaglukose und Serumkreatinin zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Stämmen.

3.1.2 Sysolischer Blutdruck und Albuminurie

Der systolische Blutdruck und die Albuminurie wurden bei den Parentaltierstämmen im Alter von 14 Wochen gemessen. Beide Stämme entwickeln bekannterweise einen spontanen systolischen Bluthochdruck. Wie auch unsere Messungen bestätigten, hatten MWF-Ratten einen vergleichbar

[1] Die Chromosomen der Ratte (*Rattus norwegicus*) werden üblicherweise als RNO *N* abgekürzt, wobei *N* für die Nummer des Chromosoms steht.

Tabelle 3.1: Phänotypisierung der Parentaltierstämme MWF und SHR in der 24. Woche hinsichtlich Körper- und Nierengewicht, Plasmaglukose und Serumkreatinin

	MWF	SHR	*p*
Körpergewicht (g)	333,1 ± 19,6	391,3 ± 23,7	<0,05
Nierengewicht (g)	1,67 ± 0,37	2,21 ± 0,15	<0,05
Nierengewicht / Körpergewicht (mg/g)	5,01 ± 1,02	5,64 ± 0,45	<0,05
Plasmaglukose (mmol/l)	8,62 ± 0,88	8,97 ± 2,40	0,70
Serumkreatinin (µmol/l)	51 ± 18	68 ± 39	0,27

hohen systolischen Blutdruck wie SHR-Ratten, wie in Abb. 3.1 A veranschaulicht wird (166 ± 4,3 mm Hg vs. 157 ± 8,5 mm Hg für SHR).

Bei der Albuminurie gab es deutliche Unterschiede zwischen den beiden Stämmen, wie Abb. 3.1 B zeigt. Die Albuminurie in der 14. Lebenswoche war bei den MWF-Ratten ungefähr 80 mal höher als bei SHR-Tieren (49,9 ± 24,8 mg/24 h vs. 0,6 ± 0,2 mg/24 h, $p < 0{,}0001$).

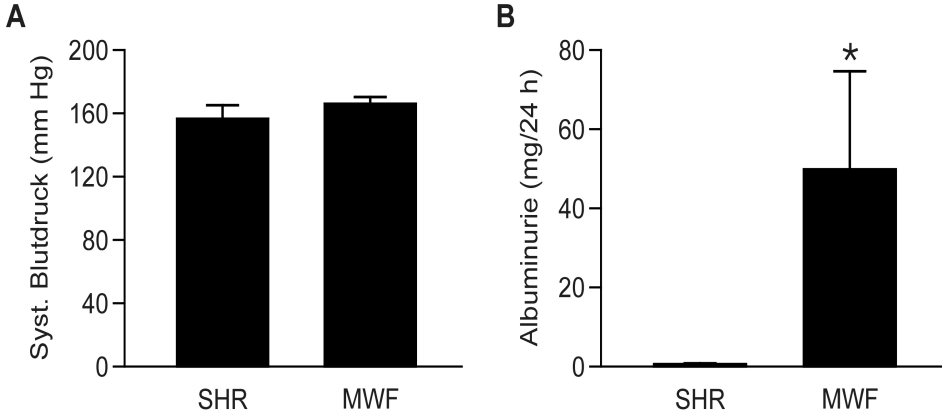

Abbildung 3.1: Systolischer Blutdruck und Albuminurie der Parentaltiere MWF und SHR in der 14. Woche. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Mehrfachmessungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen (jeweils $n = 8$), (* $p < 0{,}0001$).

3.1.3 Histologische Phänotypisierung

Die Parentaltierstämme wurden hinsichtlich der Anzahl subkapsulärer Glomeruli, dem Grad der Glomerulosklerose und der renalen interstitiellen Fibrose histologisch phänotypisiert. Die Auswertung dieser Phänotypen ist in Tab. 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.2: Histologische Phänotypen der Parentaltiere MWF und SHR in der 24. Woche

	MWF	SHR	p
Subkapsuläre Glomeruli (n)	19,4 ± 4,0	0,1 ± 0,3	<0,0001
Glomeruli mit Kapselkontakt (n)	2,9 ± 1,6	0,0 ± 0,0	<0,0001
Glomeruloskleroseindex	1,5 ±0,3	0,9 ± 0,2	<0,05
Renale interstitielle Fibrose (%)	6,4 ± 0,8	2,4 ± 0,3	<0,05

Die Anzahl subkapsulär gelegener Glomeruli pro Nierenschnitt war bei MWF-Ratten im Vergleich zu SHR-Ratten signifikant erhöht ($p < 0{,}0001$). Glomeruli mit Kapselkontakt fanden sich ausschließlich bei MWF-Ratten.

Bei dem Glomeruloskleroseindex (GSI) zeigten sich geringe Unterschiede: im Vergleich zu SHR hatten MWF-Ratten einen leicht erhöhten GSI ($p < 0{,}05$).

Dagegen konnte bei der renalen interstitiellen Fibrose ein deutlicherer Unterschied zwischen den beiden Stämmen festgestellt werden: in den Sirius-Rot gefärbten Schitten in Abb. 3.2 zeigt sich bei einem typischen MWF-Tier (Abb. 3.2 A) eine vermehrte Anfärbbarkeit des interstitiellen Bindegewebes im Vergleich zu einem typischen SHR-Tier (Abb. 3.2 B). Insgesamt war die renale interstitielle Fibrose bei MWF-Ratten 2,7-fach höher als bei SHR-Tieren (siehe Tab. 3.2).

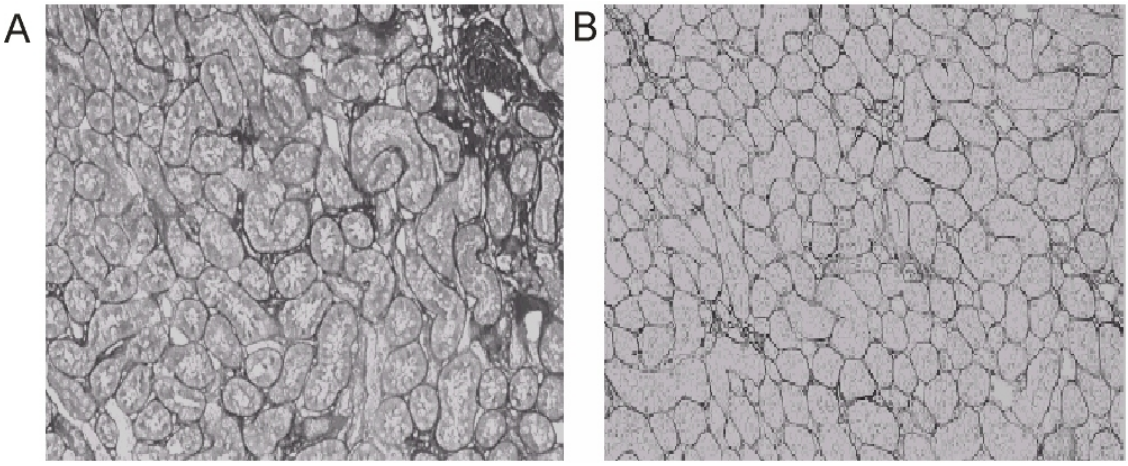

Abbildung 3.2: Renale interstitielle Fibrose (RIF) anhand von zwei Sirius-Rot gefärbten repräsentativen Nierenschnitten der Parentaltiere MWF (A, RIF = 5,2 %) und SHR (B, RIF = 1,9 %) in der 24. Woche.

3.2 Charakterisierung der Rückkreuzungspopulation

Für die Rückkreuzungspopulation wurde ein MWF-Männchen (homozygot MM) mit SHR-Weibchen (homozygot SS) verpaart. Anschließend wurden die weiblichen F_1-Tiere (heterozygot MS)

mit männlichen MWF-Tieren rückgekreuzt. In Abb. 1.1 auf Seite 12 ist das Design dieses MWF-SHR-Rückkreuzungsexperiments schematisch dargestellt. Es wurden in dieser Rückkreuzungspopulation insgesamt 215 männliche Tiere geboren, die in der vorliegenden Arbeit charakterisiert wurden.

3.2.1 Systolischer Blutdruck und Albuminurie

Der systolische Blutdruck der Rückkreuzungstiere zeigte eine Streuung der Werte zwischen 109–198 mm Hg, wobei der mittlere systolische Blutdruck bei 155,6 ± 16,66 mm Hg lag. Im Vergleich zu den Parentaltieren zeigten die Rückkreuzungstiere somit im Mittel einen ähnlich hohen Blutduck wie die SHR-Ratten (156,6 ± 8,5 mm Hg) und lagen im Mittel um 10 mm Hg unter dem systolischen Blutdruck der MWF-Parentaltiere (166,0 ± 4,28 mm Hg).

Tabelle 3.3: Albuminurie der Rückkreuzungstiere

	Mittelwert ± SD	Minimum	Maximum
Albuminurie 8. Woche (mg/24 h)	1,75 ± 3,34	0,04	33,29
Albuminurie 14. Woche (mg/24 h)	7,34 ± 12,80	0,17	91,31
Albuminurie 24. Woche (mg/24 h)	15,65 ± 23,67	0,28	144,14

Die deskriptive Statistik der Albuminurie ist in Tab. 3.3 zusammengefasst. Werden die Mittelwerte der Albuminurie von Rückkreuzungstieren mit denen der Parentaltiere verglichen, liegen die Werte der Rückkreuzungstiere in der 14. Woche deutlich unter den Werten der MWF-Parentaltiere. Auffällig war ein besonders früher Anstieg der Albuminurie einiger Rückkreuzungstiere. Diese Tiere wiesen schon im Alter von 8 Wochen eine starke Albuminurie auf, wobei der höchste gemessene Wert bei 33,29 mg/24 h lag.

Im Alter von 14 und 24 Wochen zeigten einige adulte Tiere des Weiteren Albuminurie-Werte, die mit denen von parentalen MWF-Tieren vergleichbar waren. Eine Korrelationsanalyse ergab im Alter von 14 Wochen keine signifikante Korrelation zwischen dem systolischen Blutdruck und der Albuminurie (r = 0,1; p = 0,15), wie Abb. 3.3 veranschaulicht.

3.2.2 Histologische Phänotypisierung

Wie auch bei den Parentaltieren wurde bei den Rückkreuzungstieren eine histologische Phänotypisierung durchgeführt. Auch bei diesen Tieren wurde die Anzahl der subkapsulären Glomeruli und der Glomeruli mit Kapselkontakt bestimmt sowie der Glomeruloskleroseindex und die renale

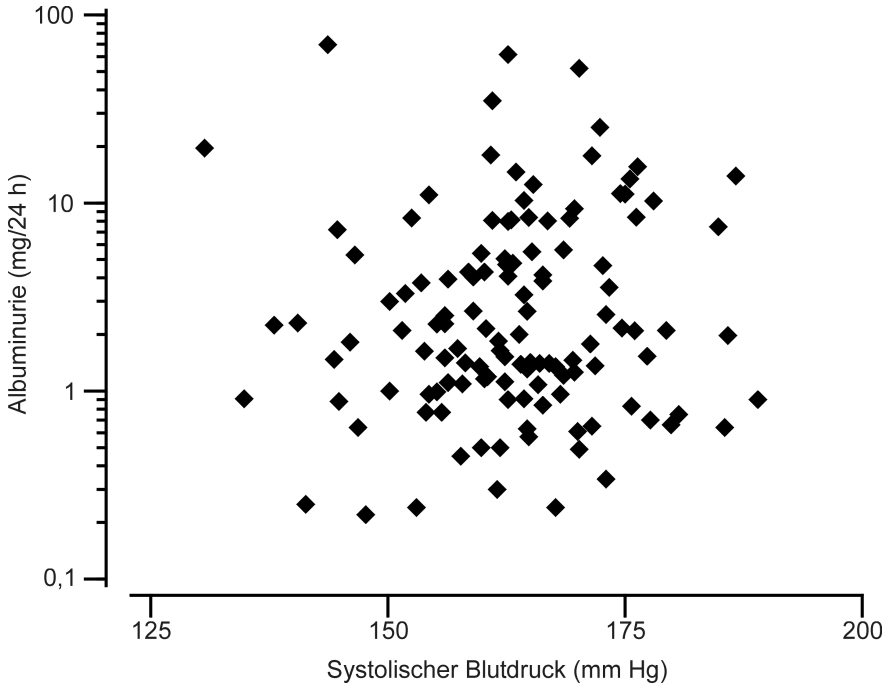

Abbildung 3.3: Korrelation von Albuminurie und systolischem Blutdruck der MWF-SHR-Rückkreuzungstiere in der 14. Woche (r = 0,1; p = 0,15).

interstitielle Fibrose bewertet. Tab. 3.4 zeigt die deskriptive Statistik der histologischen Phänotypisierung der Rückkreuzungstiere. Bei diesen Tieren fanden sich im Vergleich zu den parentalen MWF-Tieren deutlich, nämlich fast 8 mal weniger subkapsuläre Glomeruli. Auch die Anzahl der Gomeruli mit Kapselkontakt war verglichen mit der von MWF-Tieren geringer (0,75 ± 1,0 bei den Rückkreuzungstieren vs 2,6 ± 1,6 bei den MWF-Tieren).

Tabelle 3.4: Deskriptive Statistik der renalen Phänotypen der MWF-SHR-Rückkreuzungstiere

	Mittelwert ± SD	Minimum	Maximum
Subkapsuläre Glomeruli (n)	2,5 ± 1,9	0,0	10
Subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt (n)	0,75 ± 1,0	0,0	6,3
Glomeruloskleroseindex	1,85 ± 0,15	1,11	2,30
Renale interstitielle Fibrose (%)	1,31 ± 0,41	0,640	2,84

Beim Glomeruloskleroseindex (GSI) lagen die Werte eher im Bereich der GSI-Werte der MWF-Tiere und hatten insgesamt auch eine ähnliche Verteilungsbreite.

Wie auch bei den Parentaltieren zeigte sich bei der renalen interstitiellen Fibrose eine größere Verteilungsbreite als bei der Glomerulosklerose. Allerdings waren die Extremwerte, die bei den MWF-SHR-Rückkreuzungstieren gefunden wurden, niedriger als bei den MWF-Tieren. Abb. 3.4

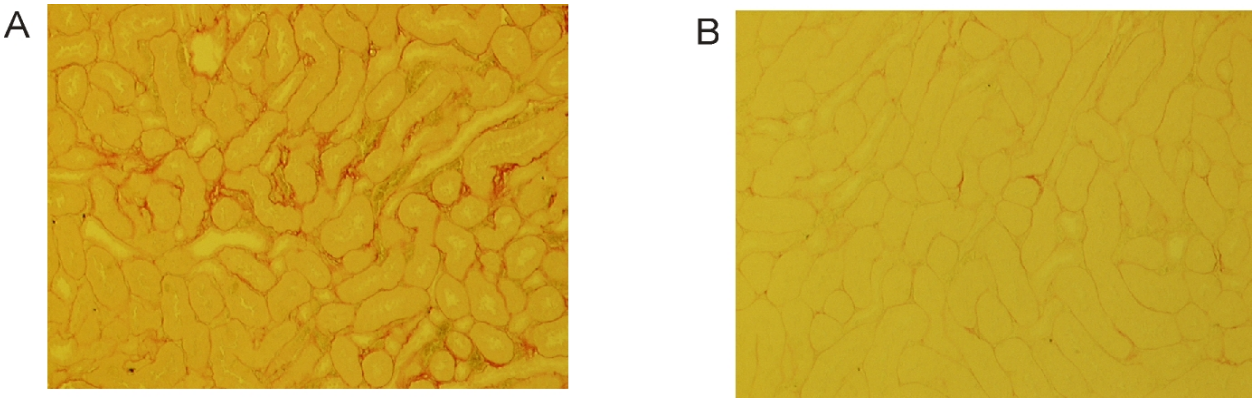

Abbildung 3.4: Renale interstitielle Fibrose (RIF) bei MWF-SHR-Rückkreuzungstieren: dargestellt sind Sirius-rot gefärbte Paraffinschnitte der beiden Rückkreuzungstiere mit der höchsten (A, RIF = 2,84 %) und der niedrigsten (B, RIF = 0,64 %) renalen interstitiellen Fibrose.

zeigt die renale interstitielle Fibrose der Rückkreuzungstiere mit dem höchsten (A) und dem niedrigsten (B) RIF-Wert.

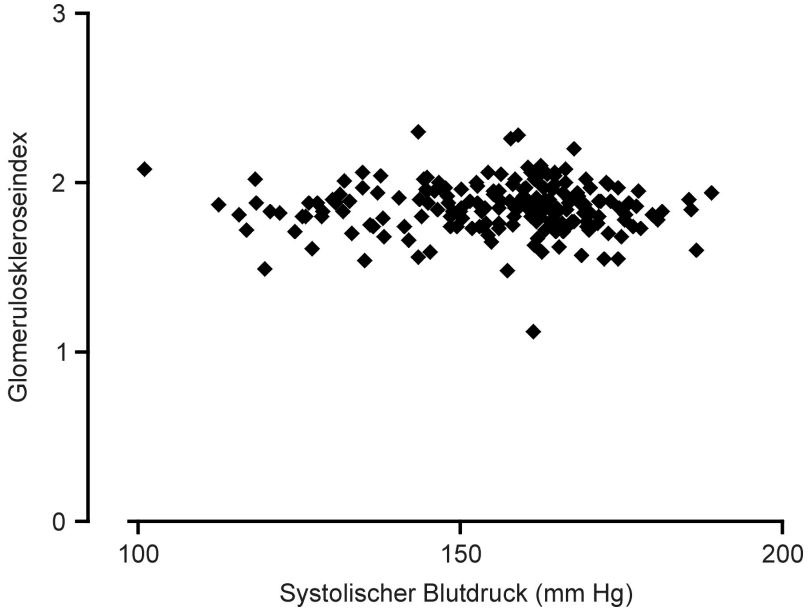

Abbildung 3.5: Korrelation von Glomeruloskleroseindex und systolischem Blutdruck bei MWF-SHR-Rückkreuzungstieren in der 24. Woche (r = -0,01; $p > 0,05$).

Die weitere Analyse der histologischen Parameter ergab, dass der systolische Blutdruck weder mit der Glomerulosklerose (r = -0,01; $p > 0,05$), noch mit der renalen interstitiellen Fibrose (r = -0,05; $p > 0,05$) korrelierte, wie Abb. 3.5 und 3.6 zeigen.

Auch die Albuminurie der Tiere im Alter von 24 Wochen zeigte keine signifikante Korrelation zur Glomerulosklerose (r = -0,09; $p = 0,17$), wie Abb. 3.7 veranschaulicht.

Eine moderate Korrelation zeigte sich allerdings zwischen der Albuminurie und der renalen interstitiellen Fibrose (r = 0,21; $p = 0,0034$). Die Korrelationsanalyse ist in Abb. 3.8 dargestellt.

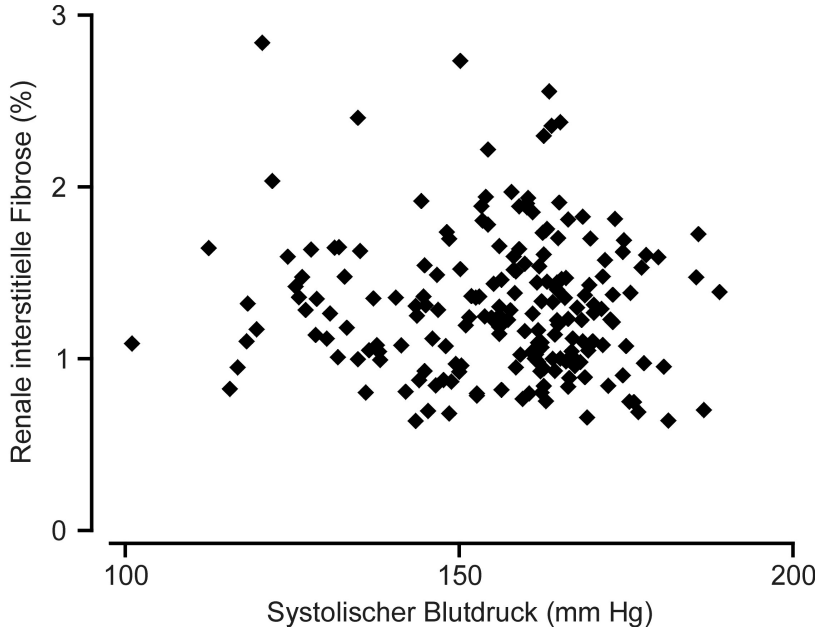

Abbildung 3.6: Korrelation von renaler interstitieller Fibrose und systolischem Blutdruck bei MWF-SHR-Rückkreuzungstieren (r = -0,05; $p > 0,05$).

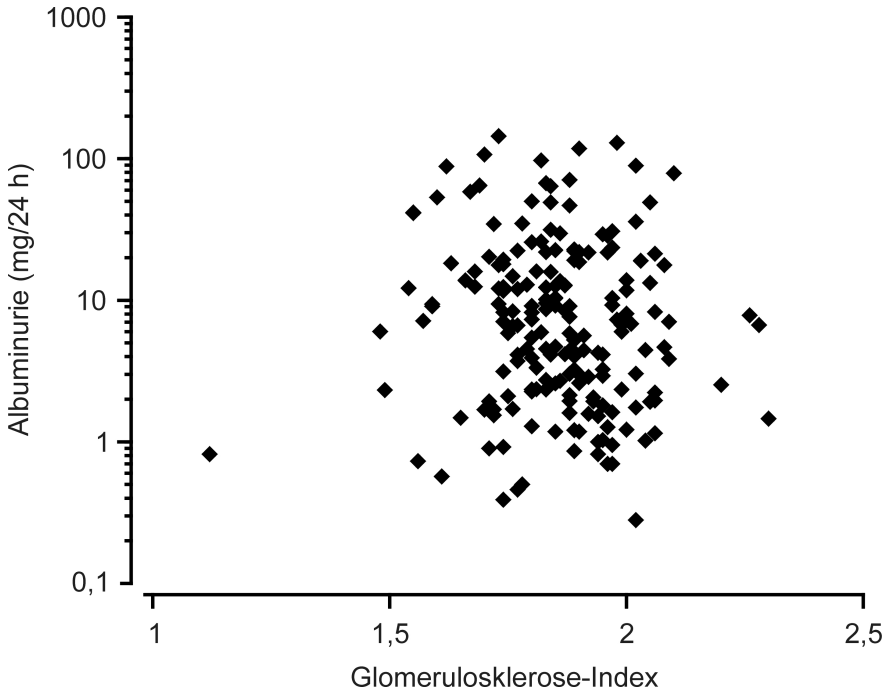

Abbildung 3.7: Korrelationsanalyse von Albuminurie und Glomerulosleroseindex (GSI) bei MWF-SHR-Rückkreuzungstieren im Alter von 24 Wochen (r = -0,09; $p = 0,17$).

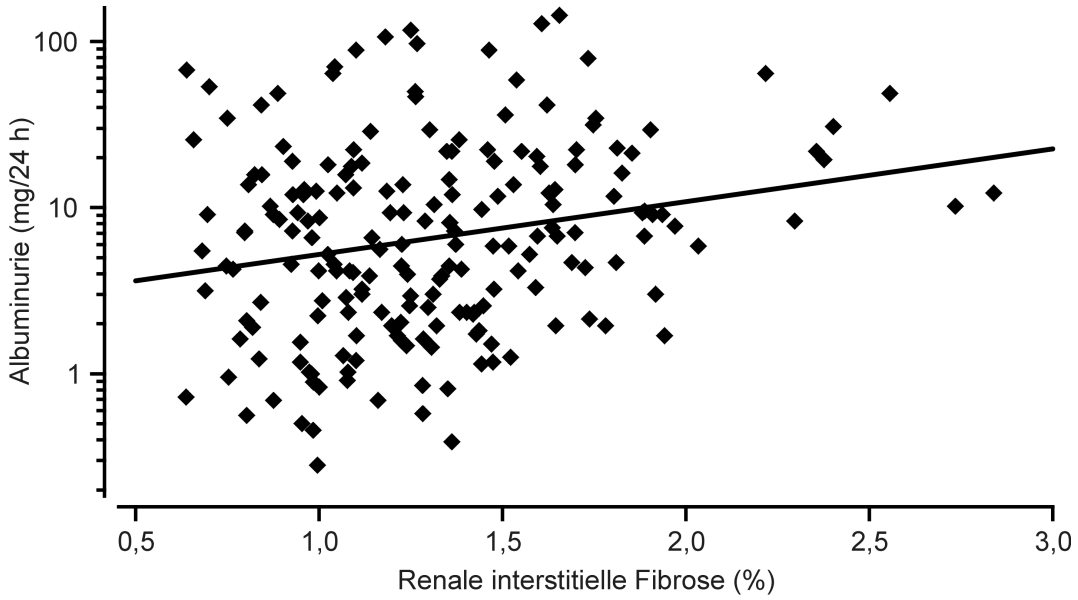

Abbildung 3.8: Korrelationanalyse von Albuminurie und interstitieller Fibrose bei MWF-SHR-Rückkreuzungstieren im Alter von 24 Wochen (r = 0,21; p = 0,0034).

3.3 Kosegregationsanalyse und Intervallkartierung der MWF-SHR-Rückkreuzungstiere

Bei den Rückkreuzungstieren wurde eine komplette Genotypisierung aller Chromosomen mit Ausnahme des Y-Chromosoms unter Verwendung von insgesamt 237 polymorphen SSLP-Markern durchgeführt. Das Intervall zwischen den verwendeten Markern betrug dabei jeweils ca. 10 cM.

3.3.1 Kopplung zum systolischem Blutdruck

Die Kopplungsanalysen ergaben keine wahrscheinliche oder signifikante Kopplung zwischen dem systolischen Blutdruck und den untersuchten Mikrosatellitenmarkern. Der höchste LOD-Score für den systolischen Blutdruck (LOD = 1,7; $p < 0{,}006$) fand sich auf RNO 7 an der Marker-Position D7Rat7. An diesem Genlokus bedingte eine Homozygotie für das MWF-Allel einen Anstieg des systolischen Blutdruckes um 6 mm Hg verglichen mit heterozygoten Tieren.

Obwohl der LOD-Score dieses Markers noch unterhalb des Schwellenwertes für eine wahrscheinliche Kopplung lag, zeigte sich in der gleichen Region ebenfalls eine wahrscheinliche Kopplung zur Albuminurie.

3.3.2 Kopplung zur Albuminurie

Identifzierte QTL für den Phänotyp Albuminurie

Es fanden sich insgesamt acht QTL mit einer wahrscheinlichen oder signifikanten Kopplung mit der gemessenen Albuminurie. Sie waren auf den Rattenchromosomen RNO 1, RNO 4, RNO 6, RNO 7, RNO 8, RNO 9, RNO 15 und RNO X lokalisiert. Im Folgenden soll auf den QTL auf RNO 6 näher eingegangen werden.

QTL auf Chromosom 6

Der höchste LOD-Score für die Albuminurie wurde auf Chromosom 6 im Alter von 24 Wochen identifiziert. Eine graphische Darstellung der Intervallkartierung für Chromosom 6 findet sich in Abb. 3.9.

Am Peak-Marker D6Rat12 konnte schon bei jungen Tieren im Alter von 8 Wochen ein signifikanter QTL (LOD = 4,3) für die Albuminurie identifiziert werden. Ebenfalls an diesem Markerlokus fanden sich signifikante QTL für die Albuminurie im Alter von 14 (LOD = 7,8) und 24 (LOD = 10,1) Wochen.

Eine Homozygotie für das MWF-Allel am Genlokus D6Rat12 zeigte eine besonders starke Auswirkung auf den Phänotyp: Tiere, die an diesem Marker homozygot für das MWF-Allel waren (MM), zeigten eine dreifach höhere Albuminurie verglichen mit heterozygoten (MS) Tieren ($p = 2 \times 10^{-10}$, Abb. 3.10).

3.3.3 Kopplung zum histologischen Phänotyp der Niere

Kopplung zur Anzahl subkapsulärer Glomeruli und Glomeruli mit Kapselkontakt

Für die Anzahl subkapsulärer Glomeruli konnten insgesamt 4 QTL ermittelt werden. Eine wahrscheinliche Kopplung fand sich auf RNO 2 (LOD = 2,4), RNO 7 (LOD = 2,5) und RNO 9 (LOD = 2,8). Eine signifikante Kopplung (LOD = 5,6) konnte hingegen auf RNO 6 identifiziert werden (siehe Tab. 3.5).

Auch für die Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit Kapselkontakt zeigte sich ein signifikanter QTL auf dem RNO 6 (siehe Tab. 3.5). Bei diesen beiden signifikanten QTL für subkapsuläre Glomeruli und Glomeruli mit Kapselkontakt zeigte sich eine Kolokalisation mit den Albuminurie-QTL (s. Abb. 3.9).

Insgesamt sind die Ergebnisse der Intervallkartierung für das RNO 6 in Tab. 3.5 zusammengefasst.

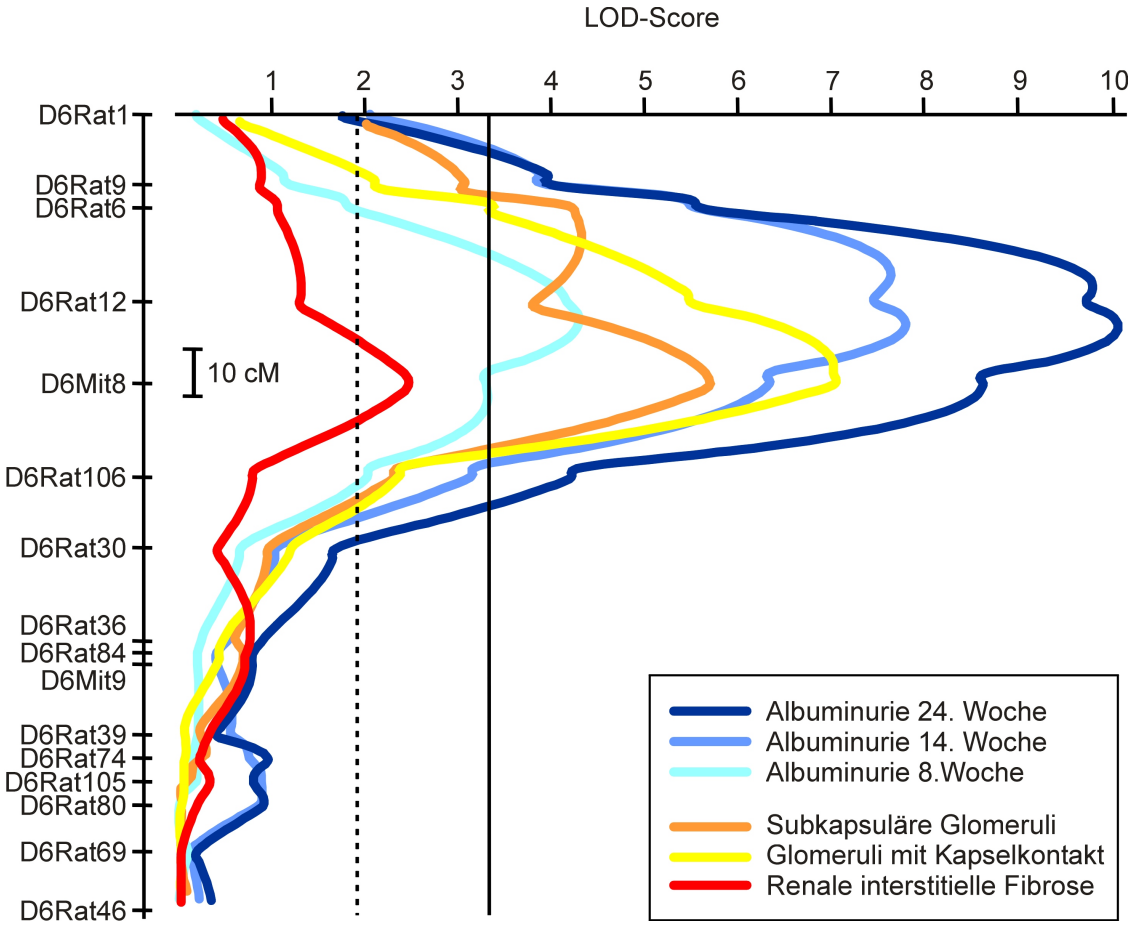

Abbildung 3.9: Intervallkartierung für Rattenchromosom 6. Dargestellt sind die ermittelten LOD-Scores für die Albuminurie der MWF-SHR-Rückkreuzungstiere im Alter von 8, 14 und 24 Wochen sowie für die Anzahl subkapsulärer Glomeruli, der Anzahl der Glomeruli mit Kapselkontakt und der renalen interstitiellen Fibrose. Die unterbrochene Linie bei LOD-Score 1,9 zeigt den Schwellenwert für eine wahrscheinliche Kopplung, während die durchgezogene Linie bei LOD-Wert 3,3 den Schwellenwert einer signifikanten Kopplung darstellt. Die genetische Distanz ist in cM angegeben.

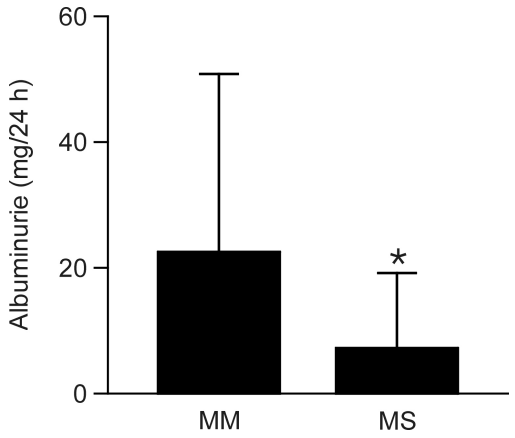

Abbildung 3.10: Albuminurie der MWF-SHR-Rückkreuzungstiere in Abhängigkeit vom Genotyp am Peakmarker D6Rat12. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte der Albuminurie der am Genlokus D6Rat12 für das MWF-Allel homozygoten (MM, n = 119) und heterozygoten (MS, n = 95) Tiere mit den dazugehörigen Standardabweichungen ($p = 2 \times 10^{-10}$) .

Tabelle 3.5: Ergebnisse der Kopplungsanalysen für histologische Phänotypen der MWF-SHR-Rückkreuzungstiere

Phänotyp	Lokus	Genotypen		Statistik	LOD
		MM (n)	MS (n)	ANOVA	
Subkapsuläre Glomeruli (n)	D6Mit8	3,06 ± 2,07 (110)	1,66 ± 1,42 (80)	$p = 2 \times 10^{-7}$	5,6
Glomeruli mit Kapselkontakt (n)	D6Rat12	1,07 ± 1,20 (106)	0,35 ± 0,57 (83)	$p = 1 \times 10^{-9}$	7,0
Renale interstitielle Fibrose	D6Mit8	1,39 ± 0,44 (112)	1,20 ± 0,33 (85)	$p = 0,0009$	2,4

Kopplung zum Glomeruloskleroseindex

Die Kopplungsanalyse ergab keine wahrscheinliche und keine signifikante Kopplung mit dem Glomeruloskleroseindex. Der höchste LOD-Score (LOD = 1,7) wurde auf RNO 4 an der Markerposition D4Rat72 gefunden. Hier fanden sich keine Überschneidungen mit einem wahrscheinlichen QTL für Albuminurie auf diesem Chromosom an der Markerposition D4Rat95.

Albuminurie und Glomerulosklerose zeigten keine Korrelation (r = -0,09; p = 0,17, s. Abb. 3.7). Ebenso korrelierten Albuminurie und GSI nicht, wenn die Abhängigkeit vom Genotyp mit einbezogen wurde und nur Rückkreuzungstiere berücksichtigt wurden, die am Peak-Marker D4Rat72 für das MWF-Allel homozygot waren.

Kopplung mit der renalen interstitiellen Fibrose

Für die renale interstitielle Fibrose konnte ein wahrscheinlicher QTL auf RNO 6 identifiziert werden (s. Tab. 3.5). Dieser QTL (Peak-Marker D6Mit8) zeigt eine Ko-Lokalisation sowohl mit den ermittelten Albuminurie-QTL als auch mit den QTL für subkapsuläre Glomeruli und Glomeruli mit Kapselkontakt (s. Abb. 3.9).

Eine Homozygotie für das MWF-Allel am Peak-Marker D6Mit8 war mit einer Erhöhung der renalen interstitiellen Fibrose um 15,5 % im Vergleich zu an diesem Genlokus heterozygoten Tieren vergesellschaftet (p = 0,0009; s. Abb. 3.11).

Eine Korrelationsanalyse zwischen Albuminurie und renaler interstitieller Fibrose in Abhängigkeit vom Genotyp an der Peak-Markerposition D6Mit8 ist in Abb. 3.12 dargestellt (die gleiche

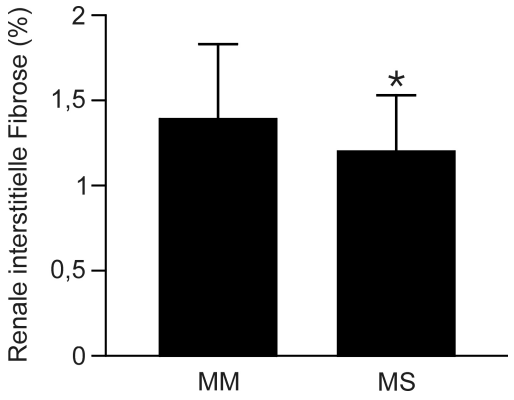

Abbildung 3.11: Renale interstitielle Fibrose in Abbhängigkeit vom Genotyp am Peak-Marker D6Mit8. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte der renalen interstitiellen Fibrose der am Peak-Marker für das MWF-Allel homozygoten (MM, n = 112) und heterozygoten (MS, n = 85) Tiere mit den dazugehörigen Standardabweichungen (p = 0,0009).

Korrelationsanalyse, jedoch ohne Aufteilung zwischen homo- und heterozygoten Tieren ist bereits in Abb. 3.8 gezeigt worden). Deutlich wird, dass Tiere mit heterozygotem Genotyp eine signifikante Korrelation zeigen (r = 0,245, p = 0,023). Tiere mit zwei MWF-Allelen und einer stärkeren renalen Fibrose bieten keine signifikante Korrelation zwischen Albuminurie und renaler interstitieller Fibrose (r = 0,1; p = 0,35).

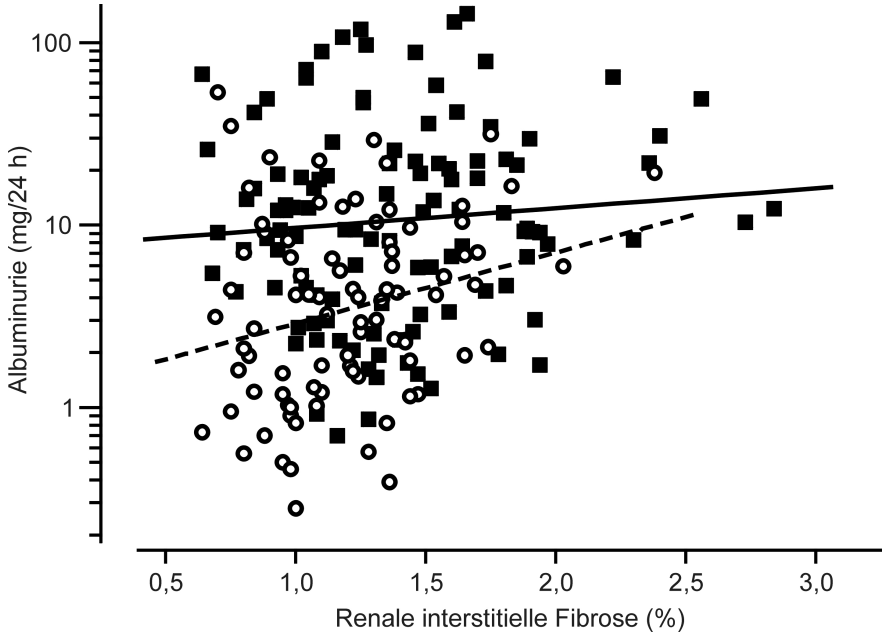

Abbildung 3.12: Korrelationsanalyse von Albuminurie und renaler interstitieller Fibrose in Abhängigkeit vom Genotyp bei MWF-SHR-Rückkreuzungstieren im Alter von 24 Wochen. Dargestellt sind die Werte für Albuminurie und renaler interstitieller Fibrose der am Genlokus D6Mit8 für das MWF-Allel homozygoten (Quadrate, r = 0,1; p = 0,35) und heterozygoten (Kreise, r = 0,245, p = 0,023) Tiere.