

4 Diskussion

4.1 Mono- und polygenetisch determinierte Albuminurie

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in einer MWF-SHR-Rückkreuzungspopulation auf RNO 6 eine genetische Kopplung zwischen der früh einsetzenden Albuminurie und einer renalen interstitiellen Fibrose gibt. Eine Albuminurie ist Hinweis und Marker für eine Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere. Diese setzt sich aus drei Bestandteilen zusammen: den Epithelzellen und der Basalmembran des Glomerulums sowie der Schlitzmembran der Podozytenfortsätze. Für das Verständnis dieser glomerulären Filtrationsbarriere war die molekulargenetische Analyse einiger seltener Nephropathien ein großer Fortschritt (Reiser *et al.*, 2002; Pavenstadt *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass das Transmembranprotein Nephrin ein Hauptbestandteil der Schlitzmembran ist (Ruotsalainen *et al.*, 1999; Holzman *et al.*, 1999). Eine Mutation im Nephrin-Gen, *NPHS1*, konnte als ursächlicher Defekt beim kongenitalen nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ identifiziert werden (Kestila *et al.*, 1998). Bei dieser Erkrankung führt eine rezessive Vererbung zweier defekter *NPHS1*-Allele bei betroffenen Kindern kurz nach der Geburt zu einer erhöhten Proteinurie. Kürzlich wurde publiziert, dass eine selektive Deletion eines Nck-Adapter-Proteins in Podozyten transgener Mäuse zu einem nephrotischen Syndrom führt. Als Grund hierfür konnte eine Nck-Nephrin-Interaktion als Voraussetzung für eine Nephrin-abhängige Actin-Reorganisation nachgewiesen werden. Fehlt diese Interaktion in den Podozyten, kommt es zu einer gestörten Funktion des Zytoskeletts dieser Zellen (Jones *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu diesem monogenetischen Defekt hat die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Albuminurie der MWF-Ratte eine polygenetische Determination (Schulz *et al.*, 2002). Eine solche polygenetische Determination wird auch für eine Vielzahl humaner Erkrankungen angenommen. Im oben erwähnten Beispiel führt die Veränderung in *einem* Gen, nämlich im *NPHS1*-Gen, letztendlich zur Proteinurie. Bei einer polygenetischen Determination führen verschiedene, sich gegenseitig beeinflussende Gene zu einer erhöhten Eiweißausscheidung. Hierbei spielt eine Vielzahl von Faktoren eine Rolle. Nicht nur die genetische Veranlagung, sondern auch Umweltfaktoren können die Ausprägung eines Phänotyps beeinflussen. So ist zum Beispiel bekannt, dass bei bestimmten Rattenstämmen (z.B. Dahl-, MWF-Ratten) durch eine erhöhte Salzzufuhr mit der Nahrung der sy-

4 Diskussion

stolische Blutdruck sowie die Proteinurie beeinflusst werden können (Kreutz *et al.*, 2000; Siegel *et al.*, 2004). Der Vorteil eines tierexperimentellen Modells für die Untersuchung solcher polygenetisch determinierten Phänotypen liegt auf der Hand. In einem solchen Modell ist es möglich, durch klar definierte Haltungsbedingungen beeinflussende Umweltfaktoren zu kontrollieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde der hypertensive und nierenkranke MWF-Rattenstamm mit dem hypertensiven SHR-Stamm verpaart. Anschließend wurde diese F₁-Generation mit MWF-Ratten rückgekreuzt und so eine Rückkreuzungspopulation gezüchtet. Dass der genetische Hintergrund des SHR-Stammes, der für eine solche Rückkreuzungspopulation ausgewählt wurde, eine wichtige Rolle für die Ausprägung eines Phänotyps spielt, wird deutlich, wenn Ergebnisse einer älteren Studie der Arbeitsgruppe betrachtet werden. In dieser Studie wurden als kontrastierender Hintergrund für die hypertensive und nierenkranke MWF-Ratte normotensive Lewis-Ratten mit normaler Albuminurie (<1mg/24h) eingesetzt. Es wurden drei QTL mit signifikanter Kopplung zu einer Albuminurie identifiziert. Diese lagen auf RNO 1, RNO 12 und RNO 17. Ein vierter QTL konnte auf RNO 6 gefunden werden (Schulz *et al.*, 2002). Hier konnte jedoch nur eine wahrscheinliche Kopplung nachgewiesen werden. Insgesamt war der Phänotyp Albuminurie in der damals untersuchten Population schwächer ausgeprägt und die ermittelten Albuminurie-Werte niedriger. Trotzdem deutete sich hier schon an, dass der QTL auf RNO 6 einen Einfluss auf eine früh einsetzende Albuminurie haben könnte (Schulz *et al.*, 2002). Im Experiment der vorliegenden Arbeit wurde die MWF-Ratte vor einem anderen genetischen Hintergrund studiert. Es wurde diesmal die SHR-Ratte als kontrastierender Rattenstamm verwendet. Dieser Stamm entwickelt eine spontane Hypertonie, zeigt jedoch keine Albuminurie. Die drei signifikanten QTL auf RNO 1, RNO 12 und RNO 17 konnten in der neuen Studie nicht ermittelt werden. Hier zeigt sich deutlich, wie wichtig der Hintergrundeffekt bei der polygenetisch bedingten Albuminurie ist. Durch die vorliegende Arbeit konnte jedoch die Bedeutung des QTL auf RNO 6 für die früh einsetzende Albuminurie bestätigt werden. Im Gegensatz zur oben erwähnten Studie zeigte der im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelte QTL auf RNO 6 schon in einem Alter von 8 Wochen einen starken phänotypischen Effekt mit signifikanten LOD-Werten. Noch höhere LOD-Werte konnten für die Albuminurie im Alter von 14 und 24 Wochen ermittelt werden. Der QTL auf RNO 6 bei der MWF-Ratte zeigt zudem eine mögliche Ko-Lokalisation mit Albuminurie- und Proteinurie-QTL, die in anderen Studien mit salzsensitiven Dahl-Ratten identifiziert wurden (Poyan *et al.*, 2003; Garret *et al.*, 2003). Die salzsensitiven Dahl-Ratten zeigen, wie auch die MWF-Ratten, eine früh einsetzende Albuminurie, die unabhängig von der Salzaufnahme der Tiere ist. Die Ko-Lokalisation der QTL, die bei salzsensitiven Dahl- und MWF-Ratten ermittelt wurden, zeigen, dass es mögli-

cherweise bei beiden Rattenmodellen mit Albuminurie einen partiellen gemeinsamen genetischen Hintergrund gibt, der zu diesem Phänotyp führt.

Männliche und weibliche MWF-Tiere zeigen einen signifikanten Unterschied in der Albuminexkretion sowie in der Entwicklung einer progressiven renalen Insuffizienz (Kreutz *et al.*, 2000; Fassi *et al.*, 1998). Sowohl männliche als auch weibliche MWF-Tiere besitzen gleichermaßen eine reduzierte Anzahl Glomeruli pro Niere auf Grund eines angeborenen Nephrondefizits im Vergleich zur normalen Wistar-Ratte (Fassi *et al.*, 1998). Allerdings sind nur die männlichen Tiere dazu veranlagt, eine progressive Nierenerkrankung zu entwickeln. Es konnte gezeigt werden, dass die geringere Albuminurie der weiblichen Tiere durch eine hohe alimentäre Salzbelastung gesteigert werden kann. Außerdem erhöht eine Salzbelastung den systolischen Blutdruck, weibliche MWF-Tiere sind also salzsensitiv (Kreutz *et al.*, 2000). Ob möglicherweise ein Y-chromosomaler Effekt zu diesem geschlechtsabhängigen Unterschied führt, konnte in dieser Studie nicht untersucht werden. Der Grund hierfür liegt im Vorgehen der Züchtung der Rückkreuzungspopulation: es wurde keine reziproke Kreuzung durchgeführt, in der beide Parentaltier-Stämme ihr Y-Chromosom weitergeben können. In Abb. 1.1 auf Seite 12 wurde veranschaulicht, dass weibliche F₁-Tiere mit männlichen MFW-Tieren rückgekreuzt wurden. Es wurden somit nur MWF-Männchen verpaart, so dass jedes Rückkreuzungstier das Y-Chromosom nur vom MWF-Tier erhalten konnte. Der Grund für dieses Vorgehen war, dass eine möglichst starke phänotypische Ausprägung hinsichtlich Hypertonie und Albuminurie erreicht werden sollte, weshalb in dieser Studie nur die männlichen Tiere untersucht wurden. In einer Studie mit SHR-Ratten konnte jedoch schon ein blutdruckregulierender genetischer Effekt des Y-Chromosoms gezeigt werden (Kreutz *et al.*, 1996). Es ist also durchaus denkbar, dass u.a. ein Y-chromosomaler Effekt bei den männlichen MWF-Tieren zu den geschlechtsabhängigen Unterschieden führt.

4.2 Kandidatengene im QTL-Intervall auf Chromosom 6 der Ratte

Mögliche Ursachen einer fortschreitenden glomerulären Zerstörung mit nachfolgender Albuminurie sind an MWF-Ratten bereits auf physiologischer und histologischer Ebene untersucht worden. Es zeigte sich, dass eine erhöhte glomeruläre Permeabilität bei normalem glomerulären Kapillardruck zu einer erhöhten glomerulären Filtration von Makromolekülen führt, die die Proteinurie bei den MWF-Tieren erklärt (Remuzzi *et al.*, 1988, 1990, 1994). Die mögliche Ursache für die Proteinurie könnte durch molekulare Strukturveränderungen der Filtrationsbarriere mit ihren Komponenten Endothel, Basalmembran und Podozyten hervorgerufen werden (Iordache *et al.*, 1994).

4 Diskussion

Die homologe Region im menschlichen Genom für den Albuminurie-QTL auf RNO 6 liegt auf Chromosom 14q24 (<http://www.rgd.m-cw.edu/VCMAP/> und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die Diskussion einer Ko-Lokalisation von möglichen Kandidatengenen in einem QTL-Intervall ist schwierig. Die Größe eines QTL umfasst ca. 40–60 Millionen Basenpaare. Auf einem DNA-Fragment dieser Größe können sich zwischen 800 und 1200 Gene befinden (Lander & Kruglyak, 1995). So liegen in einem solchen Abschnitt einerseits viele Kandidatengene, deren Funktion bekannt ist. Andererseits jedoch gibt es auf einem solchen Abschnitt auch in Funktion und Relevanz für renale Erkrankungen völlig unbekannte Gene. Eine Suche in der Genomdatenbank (<http://www.rgd.m-cw.edu/>) nach in dieser Region lokalisierten Genen mit bekannter Funktion führte zur Identifikation dreier Kandidatengene: das Zytoskelett-Protein α -Actinin 1 (Actn1), den Wachstumsfactor TGF- β 3 (*transforming growth factor*- β 3) sowie das Enzym Arginase 2 (Arg2). Diese Kandidatengene könnten entweder die Entwicklung der Glomeruli (TGF- β 3) oder die Permeabilität der glomerulären Filtrationsbarriere durch eine veränderte Podozytenfunktion (Actn1) stören. Im Metabolismus der glomerulären NO-Synthese (Arg2) könnte über eine gestörte Synthese des Vasodilatators NO ein veränderter Filtrationsdruck resultieren und somit eine Fehlfunktion der Filtrationsbarriere hervorrufen.

Die Ursache, die zu einer gestörten Funktion dieser Kandidatengene und somit zur Proteinurie führen könnte, kann nun auf mehreren Ebenen der Proteinbiosynthese liegen. Einerseits denkbar ist eine veränderte Basensequenz in den für die Proteine kodierenden Genen. Deswegen wurden zunächst die Gene von Actn1, TGF- β 3 und Arg2 der MWF-Ratte sequenziert. Es konnten hierbei keine Mutationen festgestellt werden. Auch eine veränderte mRNA-Expression, die sich in einer verminderten oder erhöhten mRNA-Konzentration äußert, wurde als mögliche Ursache untersucht. Mit Hilfe einer Real-Time-PCR haben wir eine quantitative mRNA-Bestimmung aller drei Kandidatengene der MWF-Tiere im Vergleich zu zwei Referenzstämmen, SHR- und Lewis-Ratten, vorgenommen. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten mRNA-Expressionsunterschiede.

4.3 Ausblick: Identifizierung von genetischen Faktoren im QTL-Intervall durch kongene Stämme

Ein Ziel zukünftiger Arbeiten ist es, mit Hilfe von kongenen Stämmen die Rolle von Actn1, TGF- β 3 und Arg2 sowie anderer Gene des QTL-Fragments auf RNO 6 zu untersuchen (Kreutz & Hübner, 2002; Rapp, 2000). In Abb. 4.1 ist die Züchtung eines kongenen Stammes schematisch dargestellt.

4 Diskussion

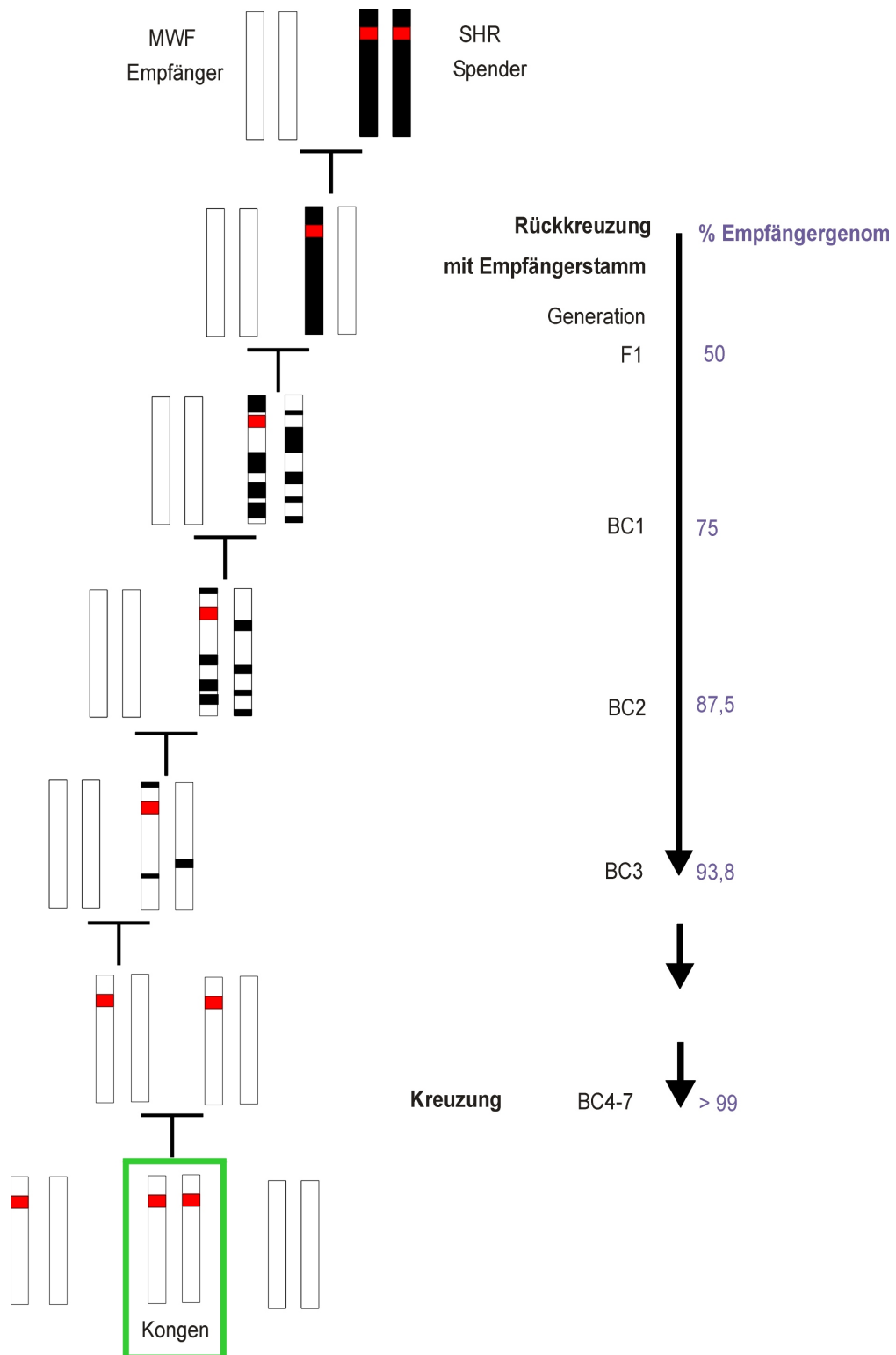


Abbildung 4.1: Züchtung eines kongenen Rattenstammes (Details siehe Text).

Hierbei wird das entsprechende genomische Fragment (rot) des SHR-Stammes (Spender) in einen kontrastierenden genetischen Hintergrund eines Rattenstammes mit Albuminurie (Empfänger, MWF-Stamm) durch serielles Rückkreuzen übertragen. Da die Parentaltiere als Inzuchtstämme an allen Genorten homozygot sind, besteht die erste Generation (F_1) ausschließlich aus heterozygoten Tieren mit jeweils 50 % Genomanteil jedes Parentalstamms. Durch Rückkreuzung mit dem Empfängerstamm (MWF) entsteht die erste Generation der Rückkreuzungspopulation („back-cross“, BC1), die 75 % Empfängergenom besitzt. Durch Genotypisierung werden die Tiere selektiert, die das QTL-Fragment (rot) tragen. Nur diese werden im Folgenden mit dem Empfängerstamm verpaart, so dass in den nächsten Rückkreuzungsgenerationen (BC2 bis BC7) in einem Zeitraum von 2–3 Jahren das Spendergenom mit Ausnahme des QTL-Fragments herausgezüchtet wird. In BC4–7 haben die Tiere mehr als 99 % Empfängergenomanteil, wobei durch Genotypisierung jeder Rückkreuzungs-Generation sichergestellt wird, dass das QTL-Fragment erhalten bleibt. Die letzte Generation wird untereinander verpaart, so dass ein homozygoter, kongener Rattenstamm (grüner Kasten) entsteht.

Nach Etablierung des kongenen Stamms wird erwartet, dass der Empfängerstamm mit dem QTL-Fragment des Spenders eine geringere Albuminurie zeigt. Mit Hilfe des kongenen Stamms könnte somit die Existenz eines oder mehrerer zur Albuminurie führender Gene in dem ursprünglich identifizierten QTL bestätigt werden. Des Weiteren kann durch Züchtung kongener Sublinien mit immer kleineren Chromosomenabschnitten eine Einengung des identifizierten Intervalls auf bis zu 0,5 cM erreicht werden. In einem Intervall dieser Größe liegen dann ca. 20 Gene (Rapp, 2000). Mittels Sequenzierung, differentieller Genexpressions- und Proteinanalysen könnte anschließend das zur Albuminurie führende Gen identifiziert werden.

4.4 Identifizierung einer genetischen Ko-Lokalisation von Albuminurie und renaler interstitieller Fibrose

Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Analyse der genetischen Beziehung zwischen einer Albuminurie und einer renalen interstitiellen Fibrose. Die Züchtung einer Rückkreuzungspopulation mit dem SHR-Stamm als Referenz machte es möglich, zwei hypertensive Stämme nicht nur hinsichtlich niedriger (SHR) und hoher (MWF) Albuminexkretion zu untersuchen. Ein weiterer Phänotyp, in dem sich beide Stämme unterschieden, ist die renale interstitielle Fibrose mit geringen Werten bei den SHR-Tieren versus annähernd 3-fach höheren bei den MWF-Tieren bei wohlgeartet ähnlich hohem systolischem Blutdruck. Es gibt experimentelle Daten, die nahelegen, dass die vermehrte Fibrose der MWF-Tiere durch die Albuminurie bedingt sein könnte. Es

4 Diskussion

konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Albuminresorption der Epithelzellen des proximalen Tubulus ein Trigger für eine interstitielle Entzündungsreaktion ist, die letztendlich zu einer renalen interstitiellen Fibrose führen könnte (Remuzzi, 2000; Hsu & Couser, 2003).

Um diese mögliche Verbindung zwischen Albuminurie und renaler interstitieller Fibrose zu untersuchen, wurde in der Rückkreuzungspopulation eine Kopplungsanalyse für beide Parameter durchgeführt. Es zeigte sich eine moderate Korrelation zwischen Albuminurie und renaler interstitieller Fibrose in der gesamten Rückkreuzungspopulation ($r = 0,21$), wobei 4,4 % der Gesamtveränderung der Fibrose durch eine erhöhte Albuminurie erklärt werden können. Interessanterweise war der QTL auf RNO 6, der schon im Alter von 8 Wochen eine Kopplung mit einer Albuminurie zeigt, ebenfalls mit der renalen interstitiellen Fibrose gekoppelt. Homozygotie für das MWF-Allel an den Genloci der Peak-Marker D6Mit8 und D6Rat12 (s. Abb. 3.9, Seite 33) führt bei jungen Rückkreuzungstieren zu einer früh einsetzenden Albuminurie und bei älteren Tieren zu einer stärkeren Albuminurie und renalen interstitiellen Fibrose. Vom pathophysiologischen Standpunkt aus gesehen erscheint die Kopplung des QTL auf RNO 6 zu beiden Phänotypen logisch, weil die Fibrose ein Langzeit-Folgeschaden einer erhöhten glomerulären Albuminfiltration sein könnte (Remuzzi, 2000; Hsu & Couser, 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Einfluss des QTL auf RNO 6 auf die früh einsetzende Albuminurie ausreichend ist, um eine genetische Kopplung zur renalen interstitiellen Fibrose in erwachsenen Tieren zu etablieren. Hier wird deutlich, wie wichtig genetische Kopplungsanalysen und Intervallkartierungen für die Analyse der pathophysiologischen Ursachen einer progressiven Nierenerkrankung sein können. Außerdem verbindet die vorliegende Arbeit erstmals einen QTL für eine früh einsetzende Albuminurie mit dem einer renalen interstitiellen Fibrose.

Des Weiteren ist anzumerken, dass der QTL auf RNO 6 eine Kopplung zur Anzahl der subkapsulären Glomeruli sowie der Glomeruli mit Kapselkontakt zeigt, zwei weitere Merkmale, die bei der MWF-Ratte eine typische, genetisch determinierte Ausprägung besitzen (Hackbarth *et al.*, 1980). Man kann derzeit die Möglichkeit nicht ausschließen, dass eine gemeinsame genetische Veränderung auf RNO 6 für die Überlappung der QTL für Albuminurie, renale interstitielle Fibrose, subkapsuläre Glomeruli und Glomeruli mit Kapselkontakt verantwortlich ist. Eine solche könnte einerseits zu strukturellen und andererseits zu funktionellen Veränderungen führen. Auch um diesen Aspekt näher zu beleuchten, ist die Etablierung kongener Rattenstämme ein sinnvoller Schritt.

Interessanterweise konnte sowohl in der älteren (Schulz *et al.*, 2002) als auch in dieser Studie gezeigt werden, dass es an Peak-Markern, die mit der Anzahl subkapsulärer Glomeruli gekoppelt

waren, mehr homozygote als heterozygote Tiere gab. Dies widerspricht der erwarteten Genotypverteilung, die in einer Rückkreuzungspopulation ein Verhältnis von 1:1 aufweisen sollte (s. Abb. 1.1, Seite 12). Ein Fehler in der Genotypisierung ist wegen übereinstimmender Daten bei beiden unabhängig voneinander durchgeführten Analysen unwahrscheinlich. Eine mögliche biologische Erklärung wäre, dass Homozygotie an diesem Locus einen Selektionsvorteil während der Entwicklung darstellen könnte. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass diese Beobachtungen nur rein zufälliger Natur sind.

Es ist derzeit nicht bekannt, ob genetische Veränderungen im Nephtrin-Gen ebenfalls eine Rolle bei der Manifestation und dem Progress einer Proteinurie bei anderen Formen des nephrotischen Syndroms spielen. Bisher konnte gezeigt werden, dass bei einer terminalen Niereninsuffizienz in Folge einer diabetischen Nephropathie keine Kopplung mit diesem Kandidatengen vorliegt (Iyengar *et al.*, 2003). Auch in der vorliegenden Arbeit fand sich keine Kopplung zu dem Nephtrin-Gen.

4.5 Ausblick am Beispiel des Genlokus *Rf-1*

Dass die MWF-Ratte ein wertvolles Tiermodell ist, um den genetischen Hintergrund von Proteinurie-bedingten Nephropathien zu untersuchen bzw. aufzuklären, hat sich in vielen Studien gezeigt (Macconi *et al.*, 2000; Kreutz *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2002). Ausgehend vom Tiermodell, in dem Suszeptibilitätsfaktoren wie zum Beispiel Albuminurie-beeinflussende Gene identifiziert werden, können vergleichende Genomstudien erfolgen. Die Erkenntnisse, die im Tiermodell gewonnen werden, können so in die humanen Genomstudien einfließen (Stoll *et al.*, 2000; Bihoreau *et al.*, 2002). Solche Suszeptibilitätsfaktoren könnten als Zielregion dienen, die in Assoziationsstudien beim Menschen weiter untersucht werden (Risch & Merikangas, 1996; Barton *et al.*, 2001; Freedman, 2003).

Ein Beispiel hierfür ist die „Fawn-Hooded“-Ratte, ein Inzuchtstamm, der früh eine fokale und segmentale Glomerulosklerose und eine Hypertonie entwickelt: bei diesem Stamm konnte ein bedeutender QTL auf RNO 1 identifiziert werden, der eine Kopplung mit Albuminurie und Proteinurie zeigt und ein Suszeptibilitäts-Faktor für eine chronische Nierenerkrankung ist (Shiozawa *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 1996). Der Genlocus auf Chromosom 1 dieses Rattenstammes wurde *Rf-1*-Lokus (*Rf* für *renal failure*) genannt. In einer vergleichenden Genomstudie konnte der *Rf-1*-Lokus beim Menschen auf Chromosom 10q identifiziert werden (Broeckel *et al.*, 1999). Es folgten weitere Studien an menschlichen Populationen, nämlich bei Amerikanern afrikanischer Abstammung und Amerikanern kaukasischer Abstammung in Utah. Es konnte gezeigt werden, dass *Rf-1* in diesen voneinander genetisch entfernten menschlichen Populationen ebenfalls ein

4 Diskussion

Suszeptibilitäts-Faktor für eine renale Dysfunktion oder ein Nierenversagen ist (Iyengar *et al.*, 2003; Hunt *et al.*, 2002; Freedman *et al.*, 2002). Eine Identifikation des entsprechenden Lokus bei noch gesunden, jedoch suszeptiblen Patienten könnte bei der Bestimmung der Prognose einer fortschreitenden Nierenerkrankung helfen.

Dieses Beispiel lässt hoffen, dass die weitere Charakterisierung des QTL auf RNO 6, der eine Kopplung einer früh einsetzenden Albuminurie zu einer renalen interstitiellen Fibrose sowie zu einer erhöhten Anzahl subkapsulärer Glomeruli und Glomeruli mit Kapselkontakt aufweist, in nachfolgenden Untersuchungen zu einer Identifikation neuer genetischer Zielregionen führen kann. Dies könnte weiterhin zur Identifizierung neuer Suszeptibilitätsfaktoren führen, die mehr Aufschluss über Manifestation und Progress einer chronischen, proteinurischen Nephropathie beim Menschen geben.