

3 Ergebnisse

3.1 Parentalstamm-Charakterisierung

Um Tierverwechslungen zwischen den Parentalstämmen zu vermeiden, wurde der Inzuchtgrad über eine systematische Genom-Analyse überprüft. Es konnte nachgewiesen werden, dass nach der Genotypisierung alle Tiere innerhalb eines Stammes das gleiche homozygote Bandenmuster hatten und somit an den jeweils untersuchten Loci eine genetische Homogenität existiert.

3.1.1 Phänotypisierung der Parentalstämme SHR/Mol, SHRSP und Dahl/SS/Jr

3.1.1.1 Phänotypische Charakterisierung und Untersuchung auf Salzsensitivität

Um zu überprüfen, ob die Salzsensitivität zu einer Hypertonie mit Nierenschädigung führt, wurden mit Beginn der 7. Woche jeweils 6 bis 10 Tiere der Parentalstämme SHR/Mol, SHRSP und Dahl/SS/Jr mit einer Salzdiät (4 % NaCl) oder einer Normaldiät gefüttert. Die Phänotypisierung der männlichen Ratten erfolgte in der 14. Woche durch biochemische Analysen, Messungen des SBD sowie nach Tötung und Organentnahme in der 15. Woche die morphometrische Beurteilung der rechten Niere. Die wesentlichen Befunde sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Bei den SHR/Mol-Tieren blieben nach Salzdiät die systolischen Blutdruckwerte im Vergleich zur Normaldiät unverändert (Tab. 1). Im Gegensatz dazu kam es bei Dahl/SS/Jr und SHRSP zu einem signifikanten Anstieg des systolischen Blutdrucks nach Salzbelastung, so dass der Blutdruck im Vergleich zur Normaldiät und im Vergleich zu den SHR/Mol-Ratten signifikant erhöht war. Die mit der Nierenschädigung einhergehende Albuminurie zeigte bei SHR/Mol und SHRSP unter Normaldiät Normalwerte und war bei Dahl/SS/Jr im Vergleich zu SHR/Mol und SHRSP signifikant erhöht ($p < 0,001$). Unter Salzbelastung blieb die Albuminausscheidung bei SHR/Mol unter $1\text{mg}/24\text{h}$, wobei bei SHRSP und Dahl/SS/Jr im Vergleich zur Normaldiät signifikant höhere Albuminwerte gemessen wurden. Auffallend ist, dass die Albuminexkretion (UAE) unter Salzbelastung bei den Dahl/SS/Jr-Tieren im Vergleich zu SHRSP ebenfalls signifikant höher war ($p = 0,001$). Zusätzlich wurden die Körpergewichte und rechten Nierengewichte bestimmt.

Tab. 1: SBD und UAE in der 14. Woche sowie Körpergewicht (KG) und rechtes Nierengewicht (NG) bei den Parentalstämmen SHR/Mol, SHRSP und Dahl/SS/Jr nach Tötung in der 15. Woche.

		SBD [mmHg]	UAE [mg/24h]	KG [g]	NG re. [g]
SHR/Mol (n=7)	Normaldiät	161,6±12,7	0,5±0,2	261,4±19,1	0,8±0,2
SHR/Mol (n=11)	Salzdiät	168,9±17,6	0,9±0,7	267,9±13,2	0,9±0,1
SHRSP (n=8)	Normaldiät	172,0±13,2	0,7±0,5	230,6±29,5	1,0±0,1
SHRSP (n=6)	Salzdiät	262,1±22,8	122,3±77,2	199,2±23,3	1,0±0,1
Dahl/SS/Jr (n=9)	Normaldiät	171,4±6,2	100,9±38,9	340,6±32,1	1,1±0,1
Dahl/SS/Jr (n=10)	Salzdiät	243,3±12,5	260,4±57,9	270,0±36,2	1,4±0,2
Statistik					
ANOVA Salzdiät SHR/Mol vs. SHRSP		p<0,001	p=0,002	p<0,001	p=0,17
ANOVA Salzdiät SHR/Mol vs. Dahl/SS/Jr		p<0,001	p<0,001	p=0,88	p<0,001

Bei der morphometrischen Beurteilung der rechten Nieren wurden die Veränderungen mittels semiquantitativer Bewertung anhand des GSI sowie durch die halbautomatische computer-gestützte Analyse, die RIF ermittelt. Die SHR/Mol-Tiere zeigten unter Normaldiät sowie der Salzdiät eine geringe Glomerulosklerose sowie eine kaum vorhandene RIF. Es gibt bei diesen Ratten keinen signifikanten Unterschied zwischen Normal- und Salzdiät ($p=0,075$; $p=0,953$). Bei den SHRSP-Tieren konnte eine signifikante Zunahme der Glomerulosklerose unter Salzbelastung im Vergleich zur Normaldiät morphometrisch festgestellt werden ($p<0,003$). Die SHRSP-Tiere zeigten aber bereits unter Normaldiät eine signifikant höhere Glomerulosklerose im Vergleich zu SHR/Mol und Dahl/SS/Jr unter Normaldiät ($p<0,001$ jeweils) und unter Salzdiät im Vergleich zu SHR/Mol ($p=0,016$). Bei der RIF zeigten die SHRSP-Tiere eine signifikante Zunahme unter Salzbelastung im Vergleich zur Normaldiät ($p=0,003$) sowie unter Salzdiät im Vergleich zu den SHR/Mol-Tieren. Die Dahl/SS/Jr-Tiere hatten im Vergleich zur Normaldiät eine signifikant höhere Glomerulosklerose ($p<0,001$) sowie unter Salzdiät im Vergleich zu den SHR/Mol-Tieren. Bei der RIF hatten die Dahl/SS/Jr-Tiere unter Normaldiät im Vergleich zur Salzdiät signifikant höhere Werte, wobei bereits

unter Normaldiät im Vergleich zwischen SHR/Mol und SHRSP eine signifikant höhere RIF gemessen wurde ($p < 0,001$, jeweils), die dem Niveau der RIF von SHRSP unter Salzdiät entspricht. Unter Salzdiät zeigten die Dahl/SS/Jr-Tiere im Vergleich zu SHRSP ($p < 0,001$) und SHR/Mol ebenfalls eine signifikant höhere RIF. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: GSI und RIF bei den Parentalstämmen SHR/Mol, SHRSP und Dahl/SS/Jr nach Tötung in der 15. Woche.

		GSI	RIF [%]
SHR/Mol (n=6)	Normaldiät	0,9±0,2	2,4±0,4
SHR/Mol (n=6)	Salzdiät	1,2±0,3	2,4±0,6
SHRSP (n=6)	Normaldiät	1,8±0,3	2,2±0,8
SHRSP (n=6)	Salzdiät	2,4±0,2	4,5±1,2
Dahl/SS/Jr (n=9)	Normaldiät	0,9±0,3	4,6±1,0
Dahl/SS/Jr (n=10)	Salzdiät	2,3±0,3	14,1±4,0
Statistik			
ANOVA Salzdiät SHR/Mol vs. SHRSP		$p < 0,001$	$p = 0,003$
ANOVA Salzdiät SHR/Mol vs. Dahl/SS/Jr		$p < 0,001$	$p < 0,001$

Die morphometrische Charakterisierung der SHR/Mol-Tiere anhand der Glomerulosklerosebewertung ergibt eine geringfügige Zunahme unter Salzdiät, bedingt durch vermehrt PAS-positiven Materials (Abb. 6). Bei der Betrachtung der mit Sirius-Rot gefärbten Präparate sieht man bei diesen Tieren sowohl bei Normaldiät als auch unter Salzdiät eine geringe interstitielle Fibrose im Übergang von Nierenrinde und Mark unter Einschluß des S3-Segmentes, was durch die computergestützte Auswertung bestätigt wurde. (Abb. 7).

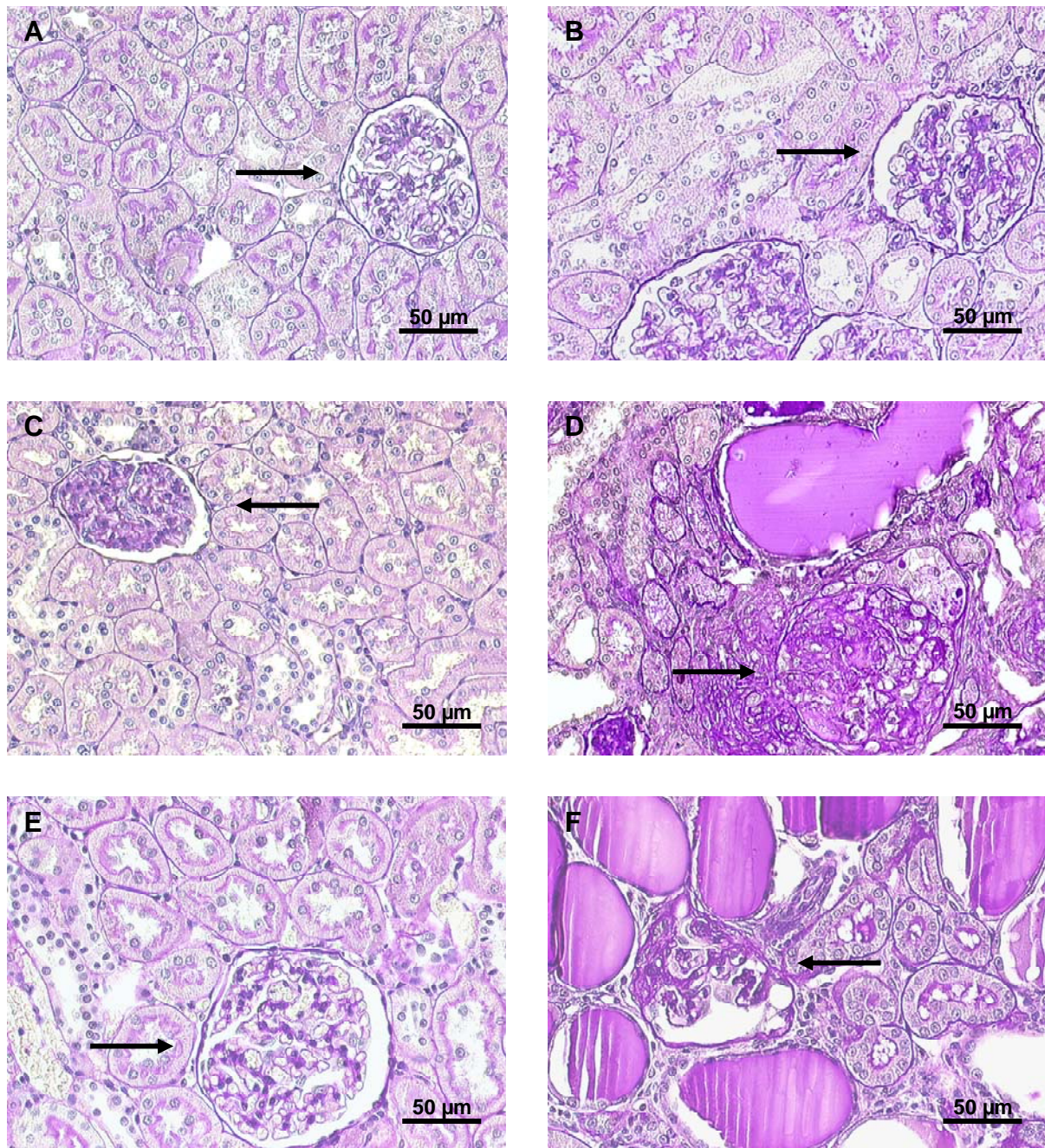


Abb. 6: Histologische Nierenschnitte der Parentalstämme SHR/Mol, SHRSP und Dahl/SS/Jr mit Normaldiät und Salzdiät in der 15. Woche. A und B: SHR/Mol-Normaldiät sowie SHR/Mol- Salzdiät; C und D: SHRSP-Normaldiät sowie SHRSP-Salzdiät; E und F: Dahl/SS/Jr-Normaldiät sowie Dahl/SS/Jr-Salzdiät. Die Pfeile zeigen jeweils ein Glomerulus, PAS-Färbung.

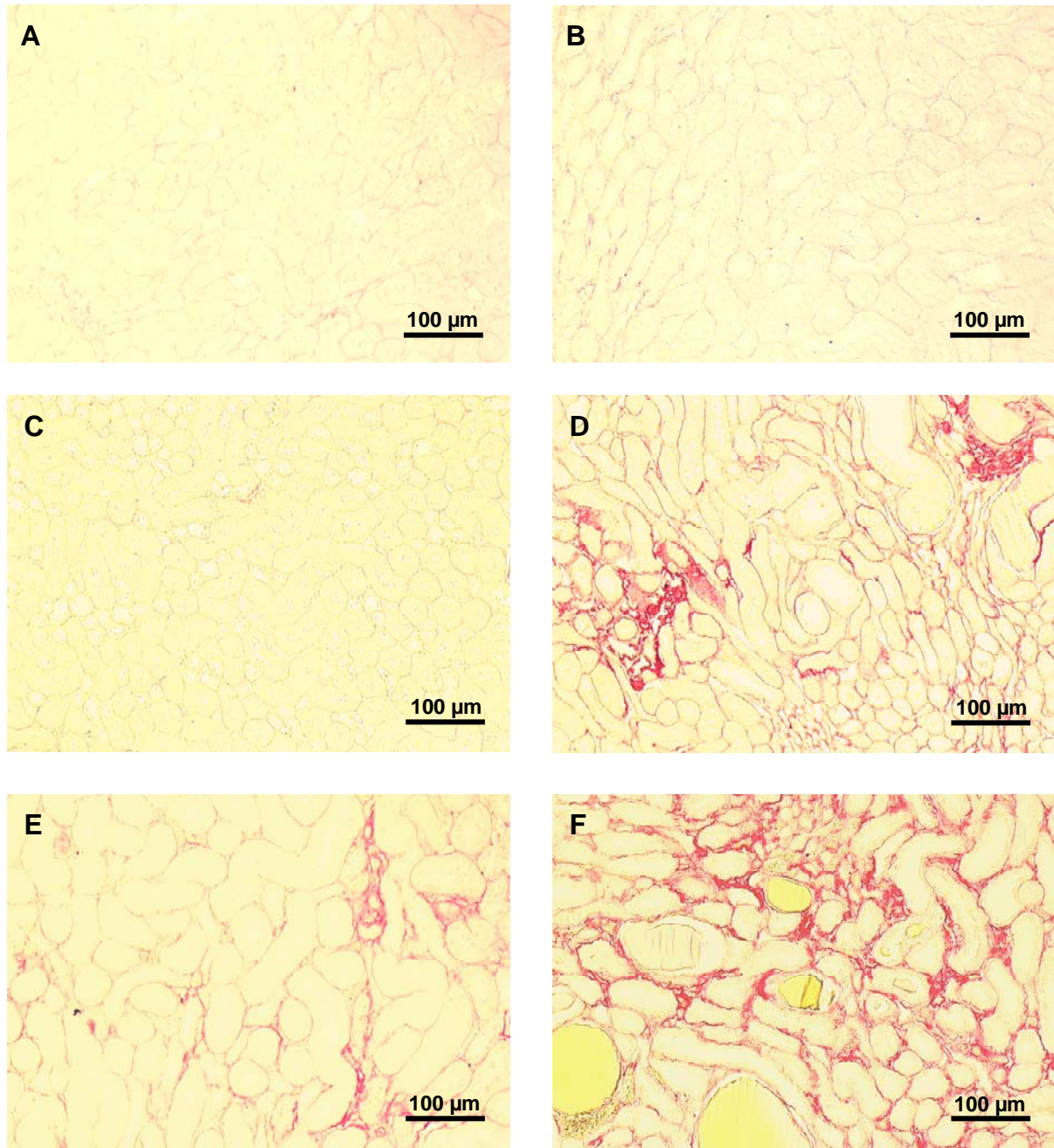


Abb. 7: Histologische Nierenschnitte der Parentalstämme SHR/Mol, SHRSP und Dahl/SS/Jr mit Normaldiät und Salzdiät in der 15. Woche. A und B SHR/Mol-Normaldiät sowie SHR/Mol- Salzdiät; C und D SHRSP-Normaldiät sowie SHRSP-Salzdiät; E und F Dahl/SS/Jr-Normaldiät sowie Dahl/SS/Jr-Salzdiät, Sirius-Rot-Färbung.

Die Salzbelastung bei den Parentalstämmen SHRSP und Dahl/SS/Jr führt zu ausgeprägten Veränderungen in der Architektur der Glomeruli. Histopathologisch zeigen sich bei den

Tieren in der Niere fokale sowie generalisierte Schädigungsareale. Es kommt zu einer charakteristischen Hyalinisierung der Glomeruli mit einer segmentalen oder diffusen Ablagerung von PAS-positivem Material im Mesangium und um die Kapillarschlinge. Diese histopathologischen Veränderungen verdrängen mit zunehmender Schädigung den extrakapillären Raum. Zusätzlich zeigt sich eine Hyperzellularität. Bei diesem Prozess wird letztlich das gesamte Gefäßknäuel zerstört. Darüber hinaus findet man eine verdickte Bowman-Kapsel. Die verschiedenen Stadien der glomerulären Schädigung zeigen erst eine Zunahme des Glomerulusvolumens, die dann in eine narbige Schrumpfung übergeht, wobei hierdurch eine semiquantitative Bewertung der Glomerula nicht mehr möglich ist. Unter der Salzdiät kommt es bei diesen Tieren auch zu einem eindeutigen Anstieg der RIF. Die computergestützte Auswertung im Übergang von Nierenrinde und Mark unter Einschluss des S3-Segmentes ergibt hierbei eine 2-3fache Erhöhung der RIF.

3.2 Kosegregationsanalyse

Tab. 3: SBD, UAE, GSI und RIF bei den F2-Populationen SHR/Mol x SHRSP sowie SHR/Mol x Dahl/SS/Jr mit Salzdiät.

	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum
F2: SHR/Mol x SHRSP (n=200)				
SBD [mmHg]	230,5	25,2	176,5	310,8
UAE [mg/24h]	25,8	42,0	0,2	272,7
GSI	1,6	0,3	0,7	2,6
RIF [%]	3,0	1,5	0,9	9,9
F2: SHR/Mol x Dahl/SS/Jr (n=230)				
SBD [mmHg]	193,8	23,5	149,5	267,7
UAE [mg/24h]	19,5	45,7	0,3	288,0
GSI	1,6	0,4	0,7	2,6
RIF [%]	6,5	2,2	2,7	15,4

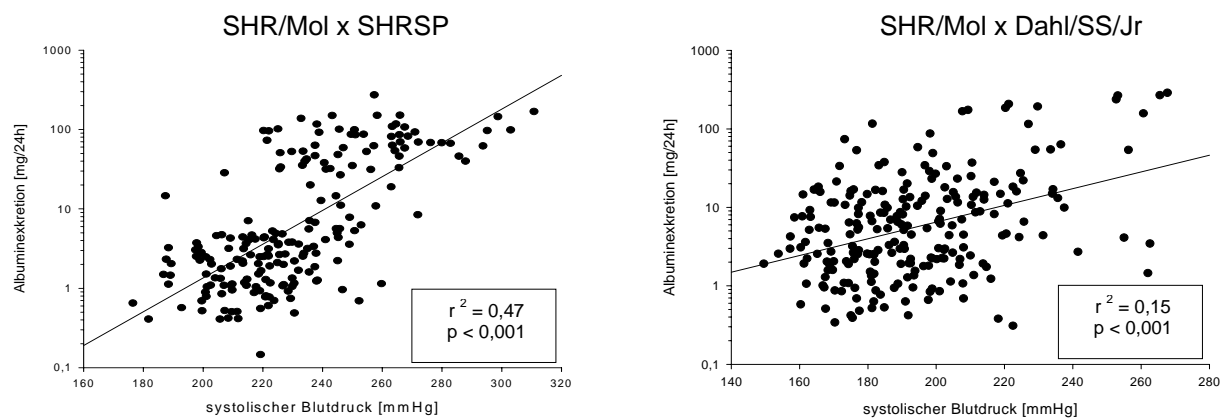


Abb. 8: Korrelationsanalysen zwischen SBD und UAE in der 14. Woche bei den F2- Populationen SHR/Mol x SHRSP, (n=200) und SHR/Mol x Dahl/SS/Jr, (n=230).

Bei den F2- Populationen SHR/Mol x SHRSP und SHR/Mol x Dahl/SS/Jr fand sich eine signifikante Korrelation zwischen SBD und UAE, wobei die SHR/Mol x SHRSP- Population eine stärkere Korrelation aufweist. Aus dem Bestimmtheitsmaß r^2 -Wert der Korrelations- analyse ergibt sich, dass in der SHR/Mol x SHRSP- Population 47 % der UAE und in der SHR/Mol x Dahl/SS/Jr- Population 15 % der UAE durch den SBD erklärt werden.

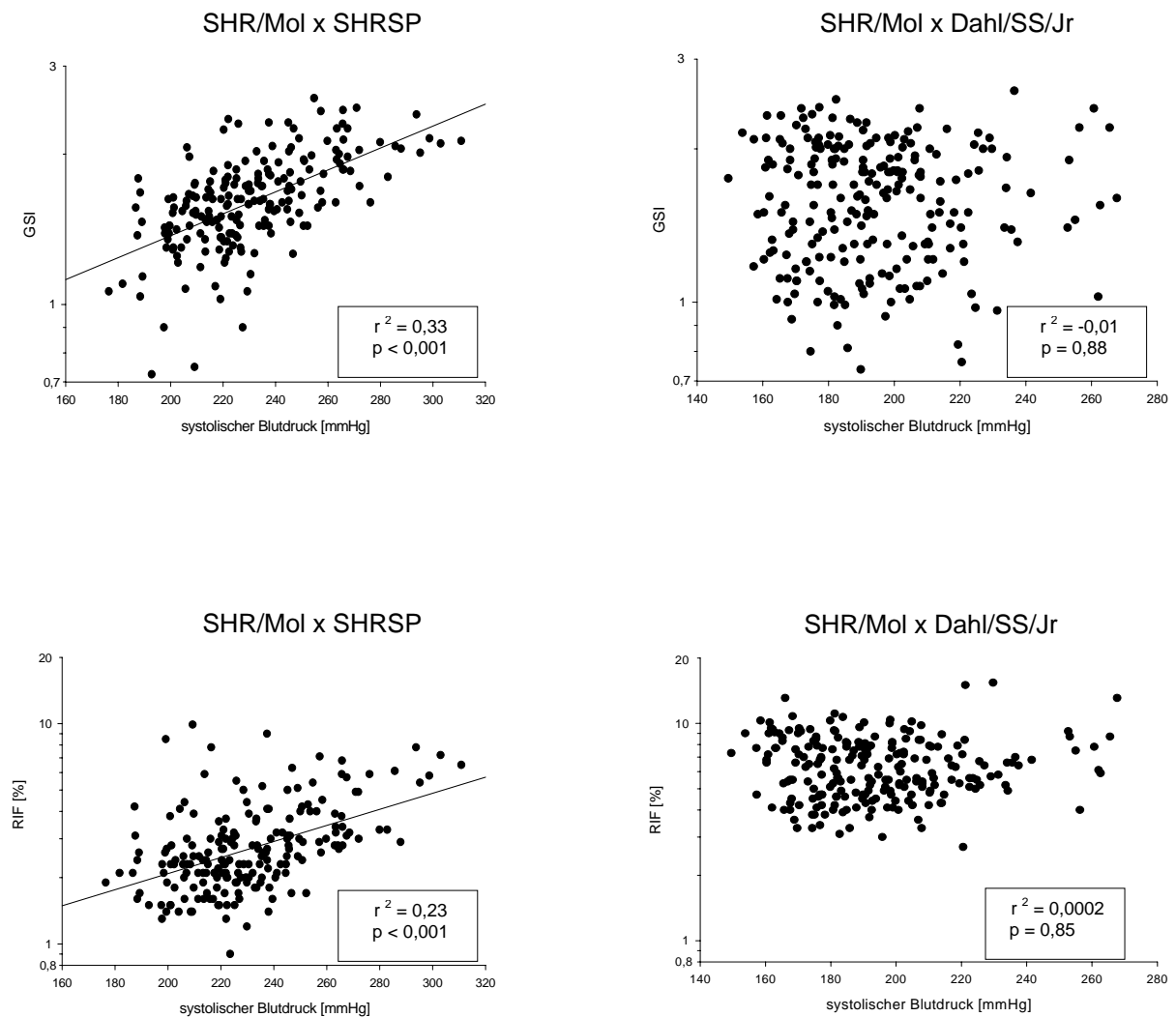


Abb. 9: Korrelationsanalysen zwischen SBD und GSI sowie SBD und RIF bei den F2-Populationen SHR/Mol x SHRSP, (n=200) und SHR/Mol x Dahl/SS/Jr, (n=230).

Die in Abbildung 9 dargestellten Korrelationsanalysen zeigen, dass der Blutdruck bei der F2-Population SHR/Mol x SHRSP signifikant mit dem GSI und der RIF korreliert. Aus dem Bestimmtheitsmaß r^2 ergibt sich, dass 33 % der Glomerulosklerose und 23 % der RIF durch den Blutdruck erklärt werden. Die Regressionsanalysen dieser Population beschreiben ebenfalls, dass mit zunehmendem SBD sowohl die Glomerulosklerose als auch die RIF zunimmt. Bei der SHR/Mol x Dahl/SS/Jr F2-Population lässt sich jedoch anhand der Korrelationsanalysen kein Zusammenhang bzw. keine Abhängigkeit darstellen.

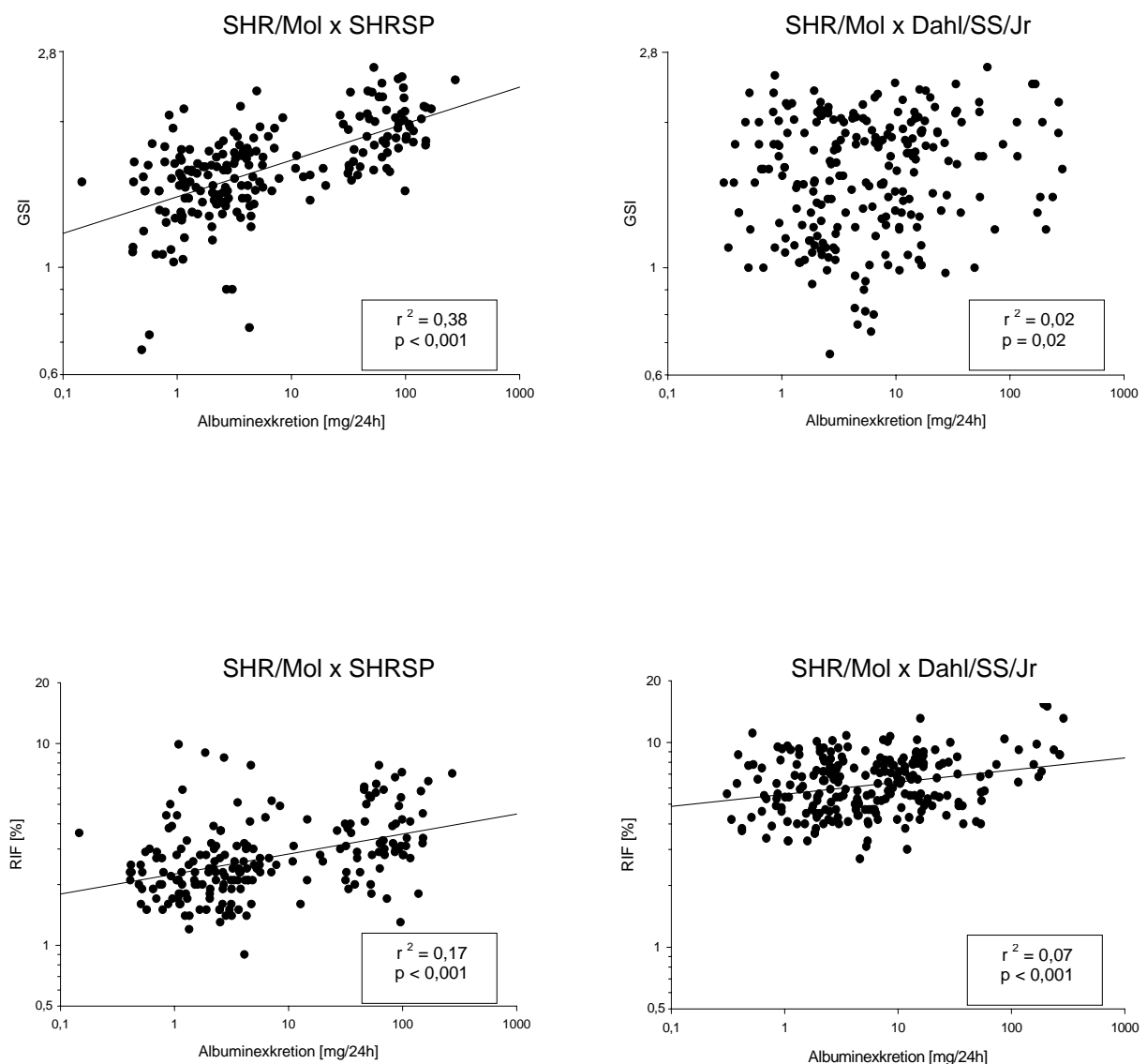


Abb. 10: Korrelationsanalysen zwischen UAE und GSI sowie UAE und RIF bei den F2-Populationen SHR/Mol x SHRSP, (n=200) und SHR/Mol x Dahl/SS/Jr, (n=230).

Die Korrelationsanalyse zeigt weiterhin einen Zusammenhang zwischen UAE und der Glomerulosklerose bei der F2-Population SHR/Mol x SHRSP (Abb. 10). Gleiches gilt bei dieser F2-Population für die Korrelationsanalyse zwischen UAE und RIF in abgeschwächter Form. Aus dem Bestimmtheitsmaß r^2 geht hervor, dass 38 % der Glomerulosklerose und 17 % der RIF durch die UAE erklärt werden. Die SHR/Mol x Dahl/SS/Jr F2-Population zeigt in den Korrelationsanalysen zwischen UAE und Glomerulosklerose keinen sowie zwischen UAE und RIF einen schwachen Zusammenhang.

3.3 Die Geno- und Phänotypen-Effekte

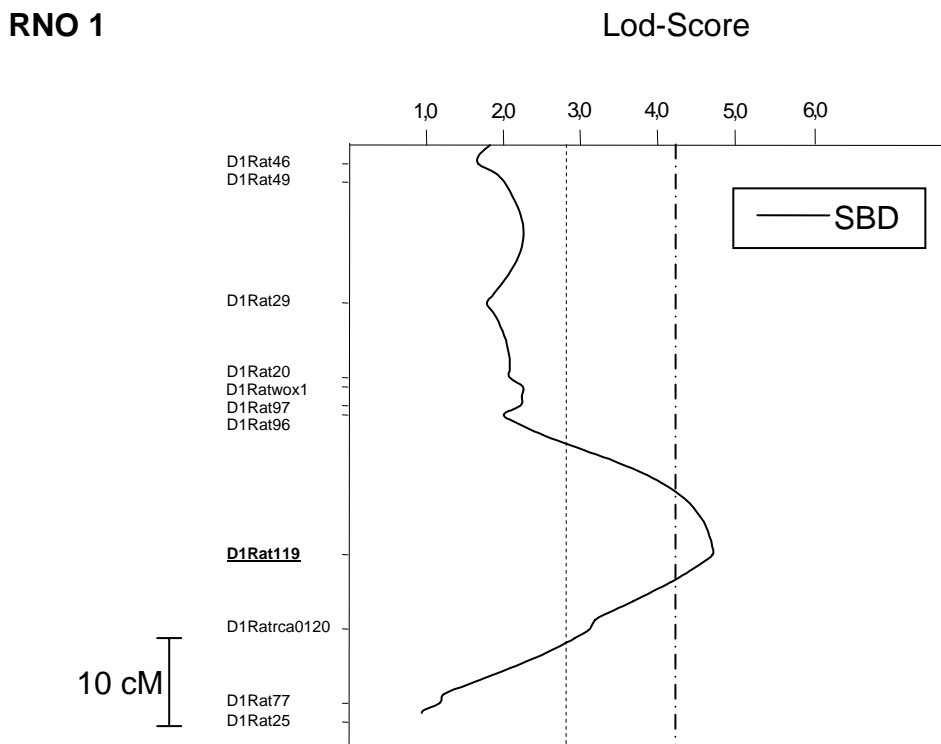


Abb. 11: LOD-Score Plots von RNO 1 für den SBD. Maximale LOD-Scores: 4,72 für den SBD

- · - : entspricht einem LOD-Score von 4,3 → **signifikante Kopplung**
- - - : entspricht einem LOD-Score von 2,8 → **wahrscheinlich Kopplung**

Die genomweite Kopplungsanalyse in der SHR x SHRSP F2-Population detektierte einen signifikanten QTL für die salzsensitive Hypertonie auf Chromosom 1 (Abb. 11). Der maximale LOD-Score für den SBD beträgt 4,72. Das Vorhandensein des SHRSP-Alleles am Marker R119 bewirkte erwartungsgemäß einen Anstieg des SBD (Abb. 12). Die Beziehung zwischen Blutdruck und Genotyp am Marker R119 ist in Abbildung 12 graphisch veranschaulicht. Der kontinuierliche Anstieg des Blutdruckes lässt einen ko-dominanten Vererbungsgang vermuten. Die weitere statistische Analyse zwischen den drei Genotypen belegte diesen Eindruck. Die weitere Genotyp-Phänotyp-Analyse an diesem Markerlocus für die Parameter der Nierenschädigung zeigte, dass das SHRSP-Allel ebenfalls mit einer Zunahme der Nierenschädigung assoziiert ist. So zeigte sich eine wahrscheinlich Kopplung zwischen R119 und Albuminurie (Abb. 13), GSI (Abb. 14) sowie RIF (Abb. 15). Insgesamt

deuten diese Befunde ebenfalls auf eine ko-dominante Beeinflussung der Nierenschädigung durch das SHRSP-Allel hin.

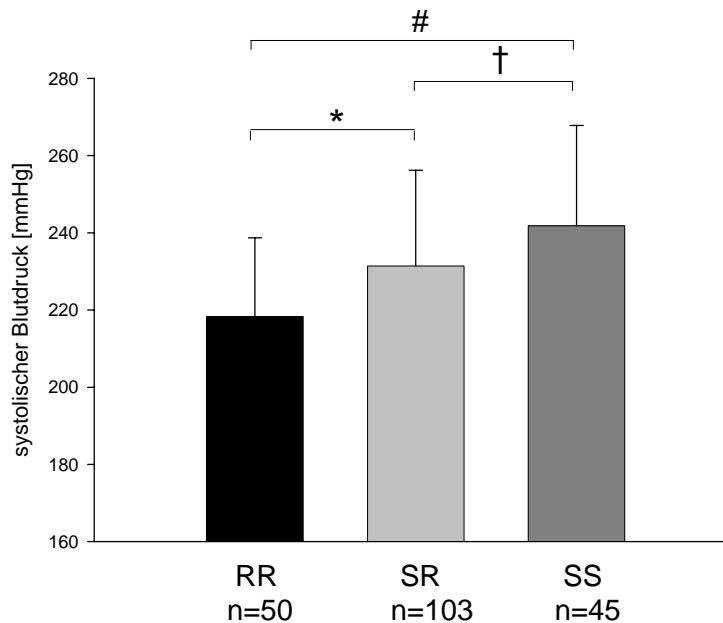


Abb. 12: SBD in der 14. Woche in Abhängigkeit vom Genotyp am Peakmarker R119 auf Chromosom 1. RR = homozygot SHR/Mol; SR = heterozygot; SS = homozygot SHRSP. *p=0,002; † p=0,022 und # p<0,001

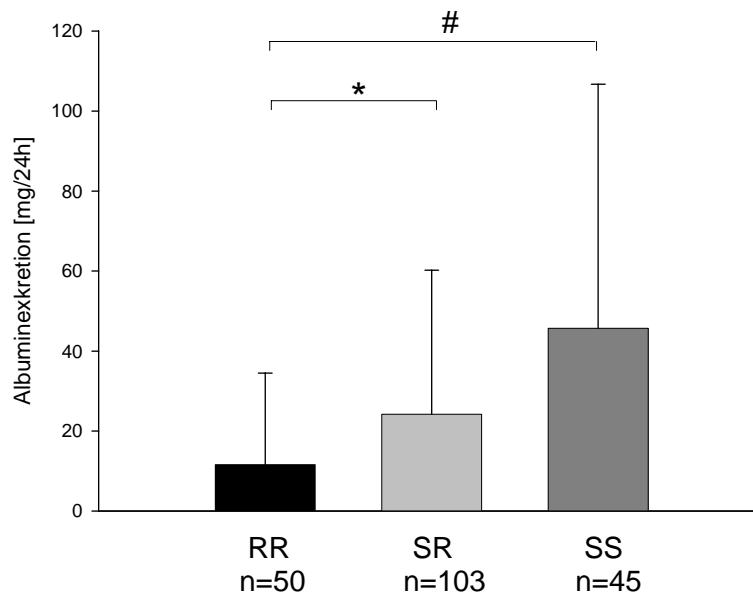


Abb. 13: UAE in der 14. Woche in Abhängigkeit vom Genotyp am Peakmarker R119 auf Chromosom 1. RR = homozygot SHR/Mol; SR = heterozygot; SS = homozygot SHRSP. *p=0,004; # p=0,001.

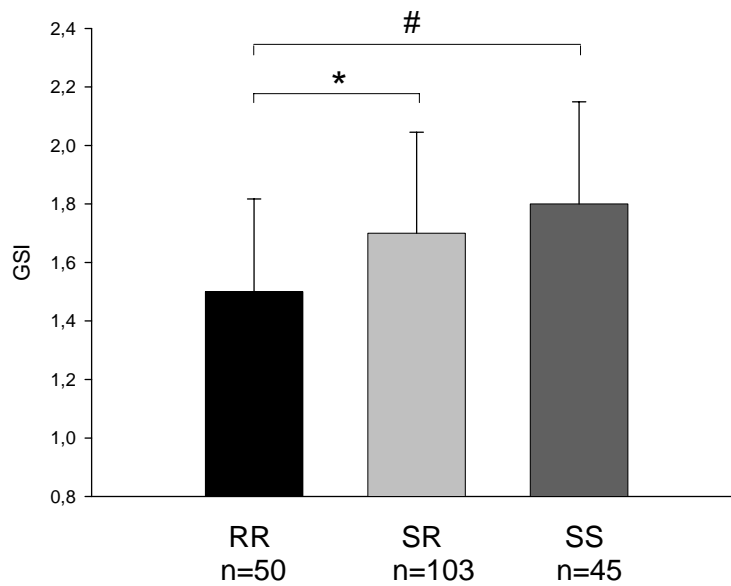


Abb. 14: GSI nach Tötung in der 15. Woche in Abhängigkeit vom Genotyp am Peakmarker R119 auf Chromosom 1. RR = homozygot SHR/Mol; SR = heterozygot; SS = homozygot SHRSP. * $p=0,029$; # $p=0,001$.

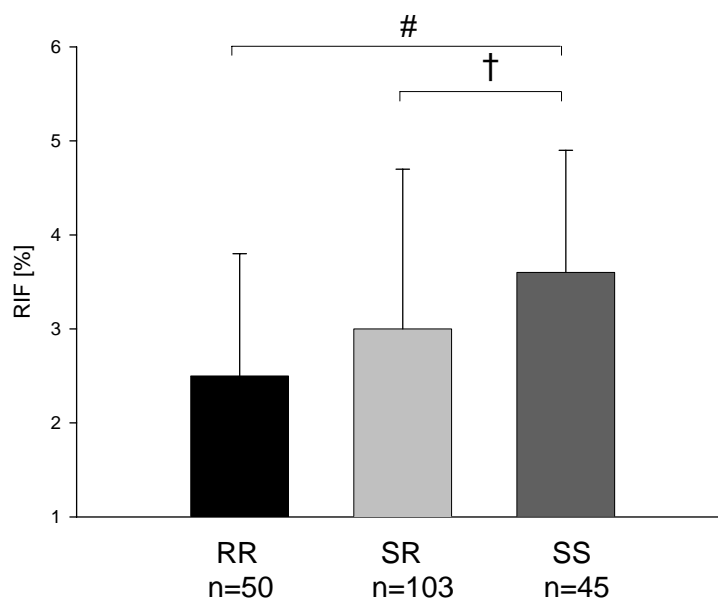


Abb. 15: RIF nach Tötung in der 15. Woche in Abhängigkeit vom Genotyp am Peakmarker R119 auf Chromosom 1. RR = homozygot SHR/Mol; SR = heterozygot; SS = homozygot SHRSP. † $p=0,001$ und # $p<0,001$.

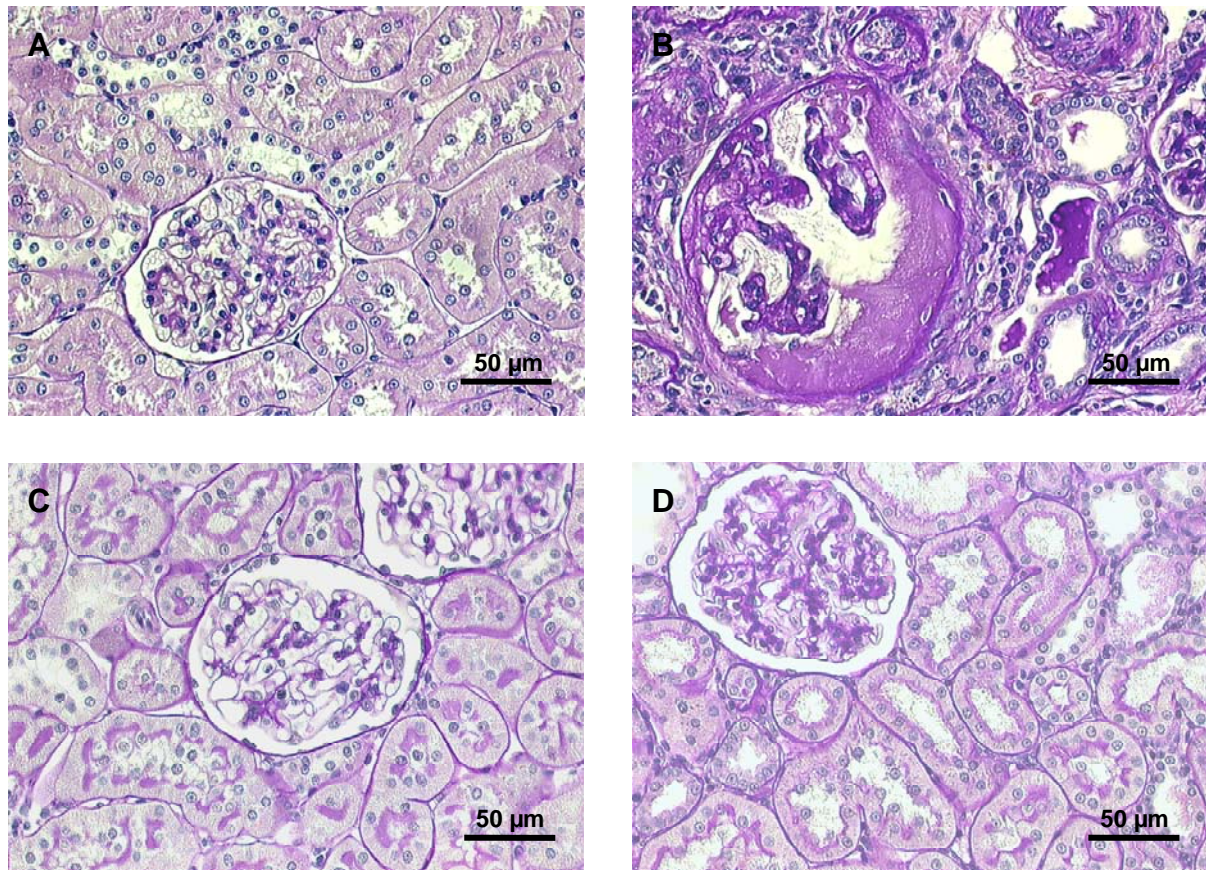


Abb. 16: Histologische Nierenschnitte der F2- Populationen SHR/Mol x SHRSP (A und B) und SHR/Mol x Dahl/SS/Jr (C und D) in der 15. Woche. A: F2-Tier mit niedrigem SBD und einer normalen UAE; B: F2-Tier mit hohem SBD und einer hohen UAE; C: F2-Tier mit niedrigem SBD und einer normalen UAE; D: F2-Tier mit hohem SBD und einer hohen UAE, PAS-Färbung.

Die Abbildung B zeigt ein charakteristisches Beispiel aus der F2- Population SHR/Mol x SHRSP mit einem stark erhöhten SBD sowie mit einer massiven Albuminexkretion. Bei der morphometrischen Beurteilung findet man die gleichen ausgeprägten Schäden an den Glomeruli wie bei den salzsensitiven Parentalstämmen SHRSP und Dahl/SS/Jr mit Salzdiät. Die F2-Population SHR/Mol x Dahl/SS/Jr, Abbildung D, zeigt jedoch bei der morphometrischen Beurteilung der Glomeruli wie auch bei den tubulointerstitiellen Veränderungen in der Nierenrinde keine so starken Schäden. Die Abbildungen A, F2-Population SHR/Mol x SHRSP, und C, F2-Population SHR/Mol x Dahl/SS/Jr, mit einem niedrigen SBD und einer normalen UAE, sind in der morphometrischen Bewertung mit den Parentalstämmen SHR/Mol mit Normaldiät und Salzdiät sowie Dahl/SS/Jr mit Normaldiät vergleichbar.

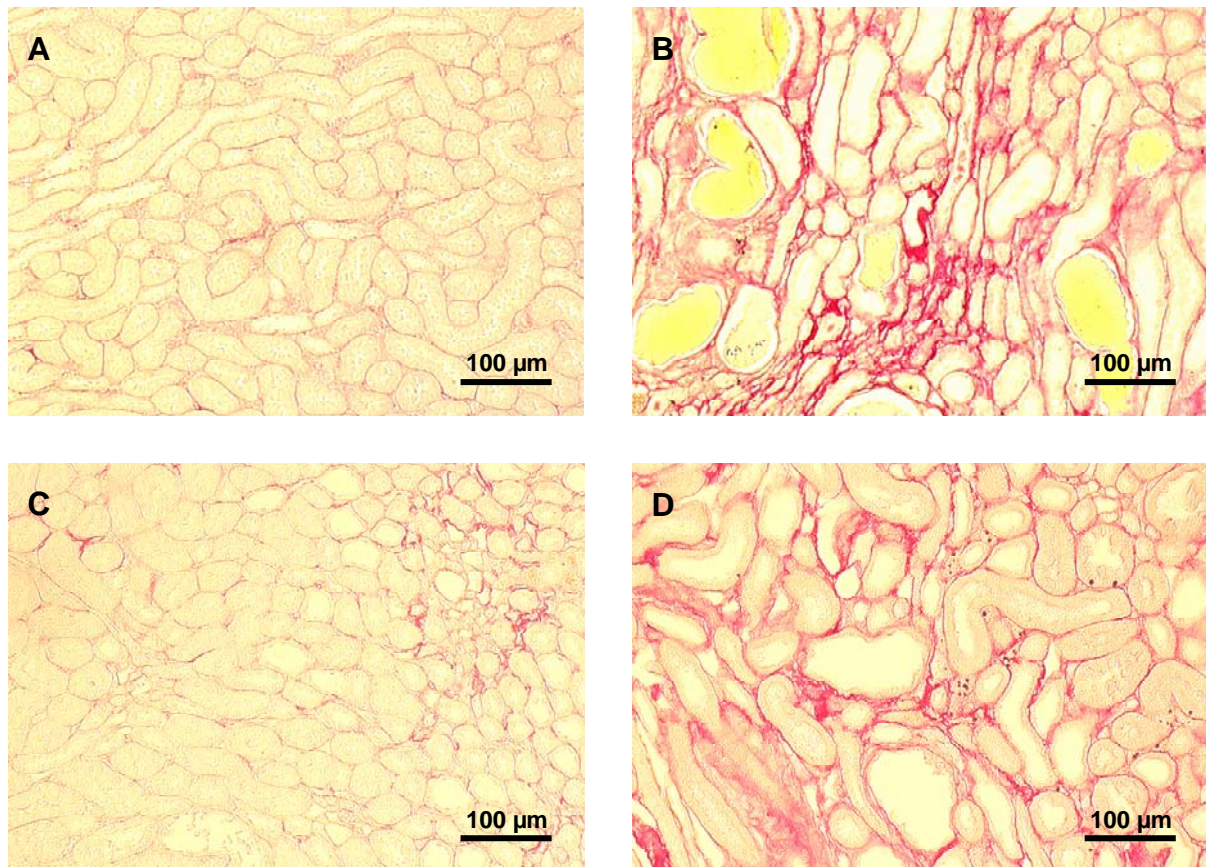


Abb. 17: Histologische Nierenschnitte der F2-Populationen SHR/Mol x SHRSP (A und B) und SHR/Mol x Dahl/SS/Jr (C und D) in der 15. Woche. A: F2-Tier mit niedrigem SBD und einer normalen UAE; B: F2-Tier mit hohem SBD und einer hohen UAE; C: F2-Tier mit niedrigem SBD und einer normalen UAE; D: F2-Tier mit hohem SBD und einer hohen UAE, Sirius-Rot-Färbung.

Die Abbildungen B und D zeigen ebenfalls ein charakteristisches Beispiel aus den F2-Populationen SHR/Mol x SHRSP und SHR/Mol x Dahl/SS/Jr mit einem stark erhöhten SBD sowie mit einer hohen UAE. Die RIF ist bei beiden F2-Populationen, wie in den histologischen Schnitten sichtbar, eindeutig erhöht. Bei der Abbildung A, F2-Population SHR/Mol x SHRSP mit niedrigem SBD und einer normalen UAE, ist eine leicht vermehrte interstitielle Fibrose nachweisbar, hingegen sieht man bei Abbildung C, F2-Population SHR/Mol x Dahl/SS/Jr mit niedrigem SBD und einer normalen UAE, im Vergleich zu der F2-Population SHR/Mol x SHRSP eine geringe Zunahme der interstitiellen Fibrose.