

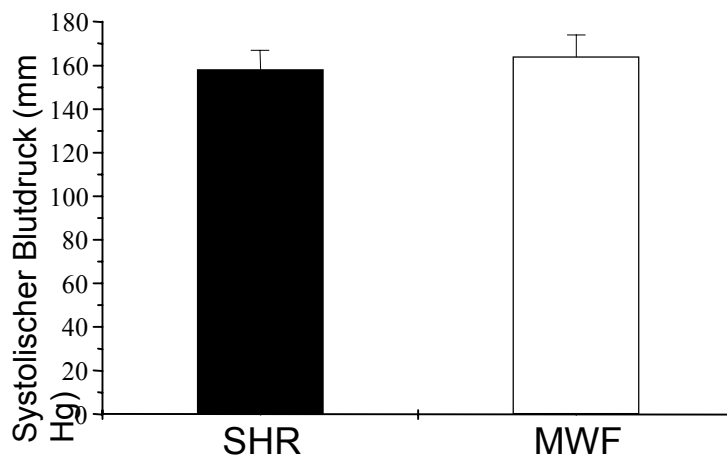
## 3. Ergebnis

### 3.1 Charakterisierung der Parentalstämme

Normotensive Ratten haben einen mittleren systolischen Blutdruck von ca. 120 mm Hg, der in der Größenordnung eines gesunden Menschen liegt.

Der Blutdruck der Parentalstämme SHR und MWF war miteinander vergleichbar, lag jedoch deutlich im hypertensiven Bereich.

So hatten die männlichen MWF-Ratten (n=8) einen mittleren Blutdruck von 166 +/- 4 mm Hg, die weiblichen SHR-Tieren (n=8) lagen geringfügig niedriger mit 158 +/- 9 mm Hg.

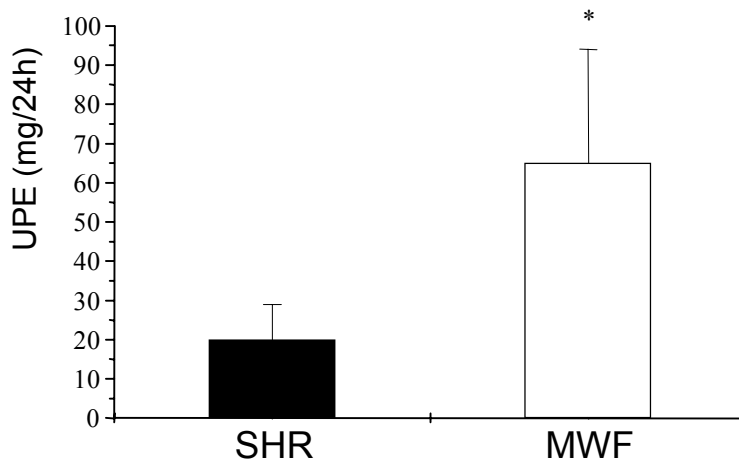


**Abbildung 3: Systolischer Blutdruck der Parentaltiere im Vergleich**

in mm Hg, Parentaltiere SHR und MWF in der 24. Lebenswoche.

Die Proteinurie und Albuminuriewerte hingegen unterschieden sich deutlich bei den Parentaltieren.

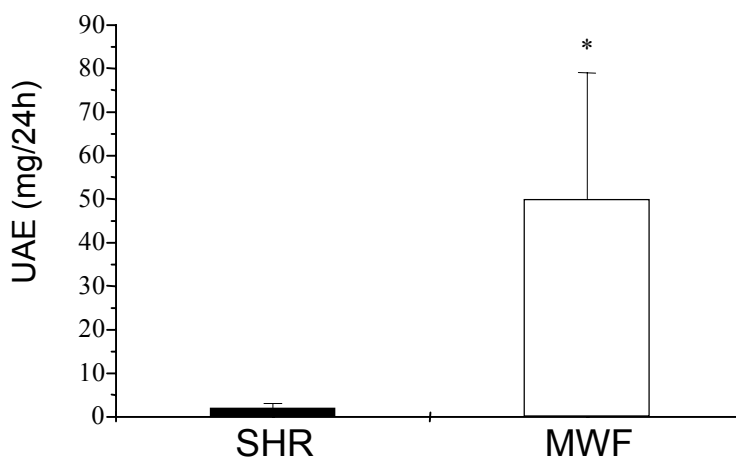
So hatten die SHR-Tiere eine Gesamtproteinurie (UPE, Urin-Protein-Exkretion, Abbildung 4) von im Mittelwert 23 mg / 24h, während die UPE der MWF-Tiere bei 66 mg/ 24h lag.



**Abbildung 4 : Gesamtproteinurie der Parentaltiere im Vergleich**

in mg/24h, Parentaltiere SHR und MWF in der 24. Lebenswoche, \*  $p < 0,01$  im Vergleich zu SHR.

Die Albuminausscheidung im Urin über 24 Stunden (UAE, Urin-Albumin-Exkretion, Abbildung 5) der SHR-Tiere tendierte gegen Null mit einem Mittelwert von 2 mg/ 24h. Die UAE der MWF-Tiere war hingegen wie erwartet deutlich erhöht bei 51 mg/ 24h. Beide Unterschiede waren statistisch signifikant.



**Abbildung 5: Albuminurie der Parentaltiere**

in mg/24h, Parentaltiere SHR und MWF in der 24. Lebenswoche, \* $p < 0,0001$  im Vergleich zu SHR

Die absoluten Nierengewichte und das Verhältnis Niere/ Körpergewicht waren im MWF-Stamm signifikant niedriger als im SHR-Stamm ( $p < 0.05$ , Tabelle 1), hinsichtlich der Plasmaglukose und der Serumkreatininwerte bestand kein signifikanter Unterschied.

	MWF	SHR	<i>p</i> -Wert
Körpergewicht KG (g)	333,1±19,6	391,3±23,7	<0,05
Nierengewicht NG (g)	1,67±0,37	2,21±0,15	<0,05
NG/KG (mg/g)	5,01±1,02	5,64±0,45	<0,05
Plasma Glukose (mmol/L)	8,62±0,88	8,97±2,40	0,70
Serum Kreatinin (µmol/L)	51±18	68±39	0,27

**Tabelle 2:** Phänotypen Parentaltiere

### 3.2. Charakterisierung der Backcrosspopulation

Der nach beschriebenen Kreuzungsschema generierte Backcross umfasste nach Abzug aller Tiere, die die 24. Lebenswoche nicht erreichten, oder Tieren, bei denen keine vollständigen Datensätze erhoben wurden, 215 Tiere.

Alle Tiere wurden in der achten, achtzehnten, und vierundzwanzigsten Lebenswoche in einem Stoffwechselkäfig für 24 Stunden gehalten. Hierbei wurden die Urinmessungen durchgeführt.

Nach der Tötung der Tiere in der 25. Lebenswoche wurden Organe entnommen und präpariert, außerdem wurden DNA-Extraktionen vorgenommen. Die DNA wurde für die Genotypisierung des gesamten Genoms aller Extremtiere, sowie für ausgesuchte Chromosomen aller Tiere verwendet.

### 3.3 Phänotypisierung aller Tiere

Der Mittelwert des systolischen Blutdruckes der Backcrosspopulation lag mit durchschnittlich 155 mm Hg und einem maximalen Wert von 189 mm Hg und einem minimalen Wert von 101 mm Hg etwas niedriger als bei den Parentaltieren.

Die Phänotypen der Parameter UAE und UPE sind in Tabelle 2 zusammengefasst:

	Mittelwert	±SD	Minimum	Maximum
<b>UPE (mg/ 24h)</b>				
8. Woche	16,6	6,2	3,3	68,5
14. Woche	23,9	14,5	2,0	97,9
24. Woche	30,2	26,3	3,7	190,1
<b>UAE (mg/ 24h)</b>				
8. Woche	1,7	3,3	0,1	33,3
14. Woche	7,3	12,8	0,2	91,3
24. Woche	15,6	23,7	0,3	144,1

**Tabelle 2:** Phänotypen UAE und UPE der Backcross-Tiere jeweils Woche 8, 14, 24

### **3.4 Genotypisierung der Extremtiere**

Als erstes wurde eine komplette Genotypisierung der Extremtiere vorgenommen, also von jeweils 23 Tieren mit dem höchsten Blutdruck und der deutlichsten Albuminurie sowie den 23 Tieren mit dem niedrigsten Blutdruck und der geringsten Albuminurie. Hierbei wurde folgendermaßen gewertet: Tiere mit der stärksten Albuminurie wurden zuerst ausgesucht, bei gleicher Albuminexkretion wurden die Tiere mit dem höheren Blutdruck gewählt. Genauso wurde mit den Tieren mit der schwächsten Albuminurie verfahren.

Es wurde für diese 46 Extremtiere eine über das gesamte Genom reichende Kopplungsanalyse durchgeführt, mit polymorphen Markern im Abstand von ungefähr 10 cM. Damit wurde eine Chromosomenkarte mit wahrscheinlichen und signifikanten Kopplungen erstellt.

Diese ergaben mögliche Kopplungen auf folgenden Chromosomen (siehe Tabelle 3):

Chromosom	Alter Wochen	LOD-Score	
		UAE	UPE
<b>RNO1</b>	8	-	-
	14	2,4	-
	24	3,2	-
<b>RNO6</b>	8	6,5	-
	14	10,4	6,3
	24	25,8	10,2
<b>RNO8</b>	8	-	-
	14	2,9	2,2
	24	3,4	2,3
<b>RNO9</b>	8	2,1	-
	14	2,9	-
	24	2,2	-
<b>RNO14</b>	8	-	-
	14	5,9	-
	24	2,1	6,9
<b>RNO15</b>	8	-	-
	14	-	2,2
	24	-	-

**Tabelle 3:** Ergebnisse der Kopplungsanalyse für Extremtiere, UAE Urinalalbuminexkretion, UPE Urinproteinexkretion. Es sind nur LOD-Werte > 2,0 angezeigt

Anhand der Tabelle 3 lässt sich deutlich der vorläufige Charakter der Extremtierkopplung erkennen; manche LOD-Werte sind deutlich höher oder niedriger als bei der Kopplungsanalyse für alle Tiere, andere Werte sind nur in bestimmten Altersabschnitten darstellbar.

Aufgrund dieser vorläufigen Ergebnisse wurde eine Kopplungsanalyse für alle 215 Tiere auf mehreren Chromosomen durchgeführt.

Für das Chromosom RNO8, welches Inhalt dieser Arbeit sein soll, ergaben sich QTL mit statistisch wahrscheinlicher und signifikanter Kopplung.

### **3.5 Kopplung zum systolischen Blutdruck**

Es hat sich in keiner Altersgruppe den Blutdruck betreffend eine Kopplung gezeigt, die statistisch signifikant war. Die höchste Kopplung war auf Chromosom RNO7 mit einem LOD-score von 1,7;  $p < 0,0057$ . Bei für dieses Allel homozygoten Tieren war der mittlere SBP im Vergleich zu heterozygoten Allelträgern um 6 mm höher. Diese Region liegt außerhalb eines QTL, der in einer vorherigen Kreuzung mit einer wahrscheinlichen Kopplung zum Blutdruck gefunden wurde (Schulz et al. 2001)

Allerdings befand sich am gleichen Locus ein schwach ausgeprägter QTL für UAE, dessen LOD knapp unter der Grenze für eine wahrscheinliche Kopplung ( $\text{LOD} > 1,9$ ) lag. Es könnte sich hierbei um eine mögliche Kopplung zwischen SBP und UAE handeln ohne statistische Signifikanz, die jedoch detektierbar ist.

Auf dem Chromosom RNO8 war keine den Blutdruck betreffende Kopplung zu detektieren, weder bei den Extremtieren, noch bei allen anderen Tieren des Backcross.

### **3.6 Kartierung des Chromosom RNO8 für Albuminurie**

Auf Chromosom RNO8 zeigt sich eine statistisch signifikante Kopplung im Alter von 14 und 24 Wochen mit einem LOD-Wert von 4,4 (18 w) und 6,4 (24 w).

Diese stärkste Kopplung dieses QTL liegt im Bereich des Markers D8Rat35.

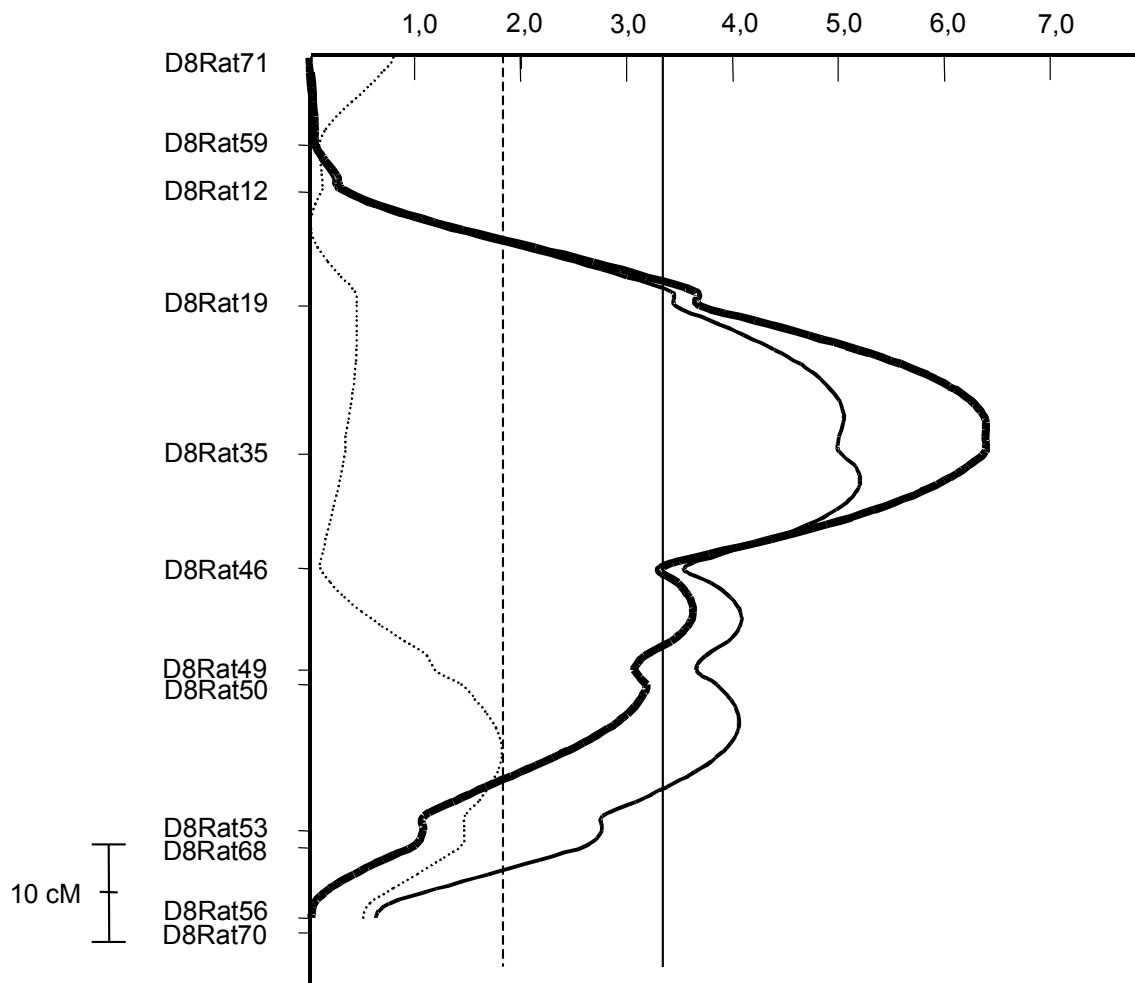
Im Lebensalter von 8 Wochen zeigt sich in dieser Chromosomenregion überhaupt keine Kopplung.

Im Endbereich des Chromosoms RNO8 ist eine mögliche Kopplung zur Albuminurie sichtbar, die nur an die statistisch wahrscheinliche LOD-Grenze von 1,9 heranreicht, diese jedoch nicht überschreitet. Der LOD-Wert beträgt hier 1,9 zwischen den Markern D8Rat50 und D8Rat53.

Im Hinblick auf die räumliche Platzierung des möglichen QTL für UAE im Alter von 8 Wochen besteht kein Zusammenhang zum deutlich stärker ausgeprägten QTL bei D8Rat35 im Alter von 24 Wochen.

Allerdings ist zwischen D8Rat50 und D8Rat53 die UAE betreffend im Alter von 14 und 24 Wochen ein Plateau ausgebildet, welches für die Tiere im Alter von 14 Wochen eine stärkere Kopplung ergibt als im Alter von 24 Wochen.

Siehe hierzu auch Abbildung 6



**Abbildung 6: LOD-Werte UAE Chromosom 8**

Erläuterung: LOD-Score für den Phänotyp Urinalbuminexkretion auf Chromosom 8, gepunktete Linie zum Zeitpunkt 8 Wochen, durchgezogene Linie zum Zeitpunkt 14 Wochen, fette Linie zum Zeitpunkt 24 Wochen



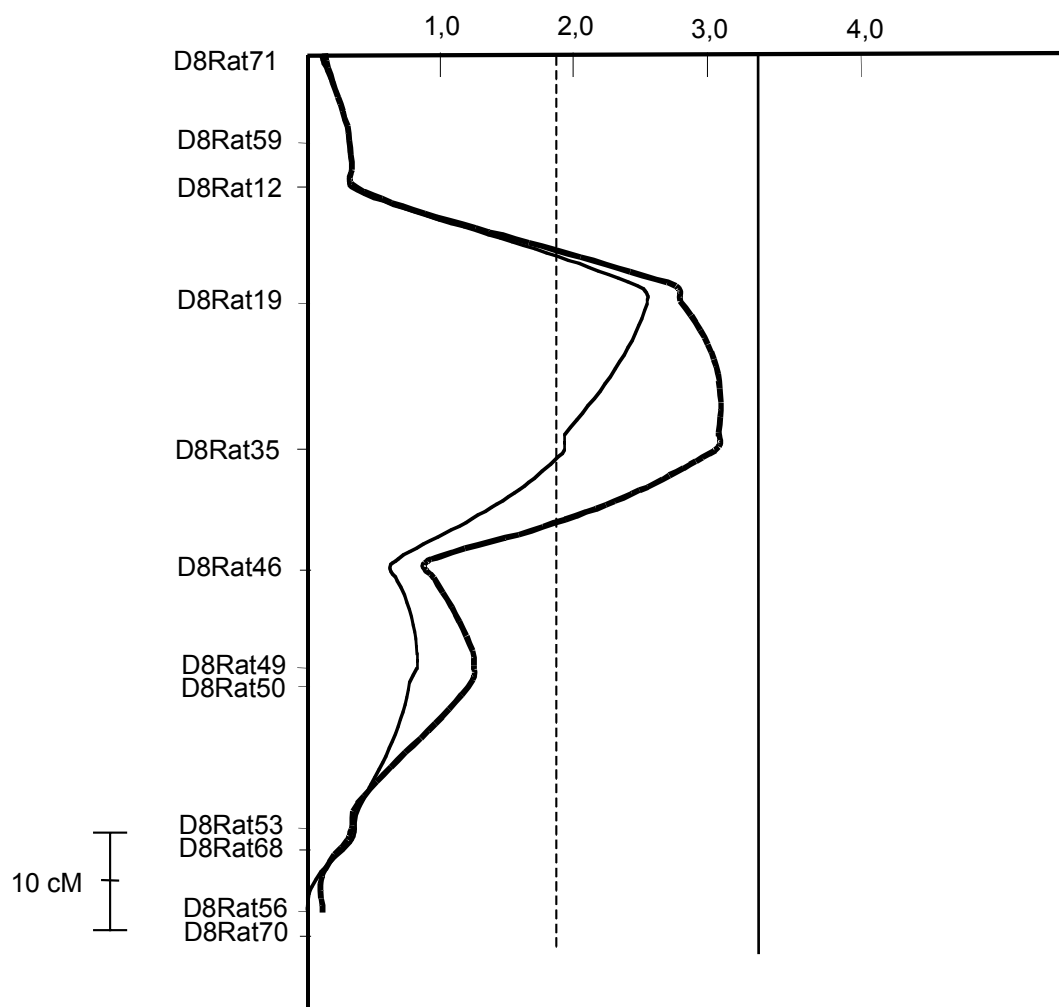
### 3.7 Kartierung des Chromosom RNO8 für Proteinurie

QTL für UPE waren ähnlich verteilt wie die für UAE, jedoch nicht so stark ausgeprägt wie diese.

Die auf RNO8 im Alter von 8 Wochen aufgetretene mögliche Kopplung zur Albuminurie zwischen Marker D8Rat50 und D8Rat53 mit einem nahe der wahrscheinlichen Kopplung liegenden LOD-Wert von 1,9 konnte für die Proteinurie gar nicht nachgewiesen werden.

Der QTL der Urinalbuminexkretion bei D8Rat35 zeigt sich auch für die Urinproteinexkretion, allerdings in schwächerer Ausprägung. Die LOD-Werte für 14 w alte Tiere betragen 2,2, für 24 w alte Tiere 3,1. Damit handelt es sich um statistisch wahrscheinliche, jedoch nicht signifikante Kopplungen für UPE auf Chromosom RNO8.

Die Ergebnisse für UPE sind in Abbildung 7 zusammengefasst.



**Abbildung 7: LOD-Werte UPE Chromosom 8**

Erläuterung: LOD-Score für den Phänotyp Urin-Protein-Exkretion auf Chromosom 8, durchgezogene Linie zum Zeitpunkt 14 Wochen, fette Linie zum Zeitpunkt 24 Wochen

In der folgenden Tabelle 4 sind auf Chromosom RNO8 alle für die Phänotypen SBD (Systolischer Blutdruck), UAE (Urinalbuminexkretion) und UPE (Urinproteinexkretion) relevanten Marker mit den jeweiligen maximalen LOD-Werten zu unterschiedlichen Altersstufen abgebildet.

So lässt sich ein Überblick über die altersabhängige Entwicklung sowie den Einfluss der Homo-, oder Heterozygotie für dieses Allel gewinnen. Die p-Werte geben jeweils die statistische Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Ergebnisses an.

Phänotyp	Marker	Alter Wochen	Phänotyp MM* (n)	MS* (n)	p-Wert (ANOVA)	LOD-Score
<b>SBD</b> mmHg	D8Rat35	24	157±17,1(114)	153±15,8(99)	0,358	0,9
<b>UAE</b> mg/24h	D8Rat35	8	2,05±4,26(112)	1,24±1,19(80)	0,098	0,3
	D8Rat35	14	9,48±14,73(123)	3,64±5,32(88)	2x10 <sup>-5</sup>	<b><u>4,4</u></b>
	D8Rat35	24	19,98±26,14(125)	8,53±14,42(89)	3x10 <sup>-7</sup>	<b><u>6,4</u></b>
<b>UPE</b> mg/24h	D8Rat35	8	16,60±7,3(115)	16,5±4,2(80)	0,548	0,4
	D8Rat35	14	25,91±16,56(123)	20,39±8,41(88)	0,0052	<u>2,2</u>
	D8Rat35	24	35,04±30,28(125)	22,23±15,16(88)	3x10 <sup>-3</sup>	<u>3,1</u>
<b>SBD</b> mmHg	D8Rat50	24	155±16,3(114)	156±16,6 (99)	0,75	0,8
<b>UAE</b> mg/24h	D8Rat50	8	2,08±4,23(106)	1,26±1,68 (84)	0,094	1,7
	D8Rat50	14	9,46±14,94(118)	4,51±8,56 (91)	0,0054	<b><u>3,8</u></b>
	D8Rat50	24	19,28±24,75(120)	11,32±21,95 (97)	0,0156	<u>3,1</u>
<b>UPE</b> mg/24h	D8Rat50	8	16,76±7,28(108)	16,36±4,46 (85)	0,6807	0,2
	D8Rat50	14	25,56±16,51(118)	21,56±10,17 (91)	0,0484	0,9
	D8Rat50	24	33,73±27,32(120)	25,61±24,67(91)	0,027	1,2
<b>SBD</b> mmHg	D8Rat53	24	154±16,3(114)	157±16,8 (99)	0,2151	0,1
<b>UAE</b> mg/24h	D8Rat53	8	2,16±4,37(99)	1,28±1,64(92)	0,072	1,6
	D8Rat53	14	9,02±14,67(112)	5,53±9,78(98)	0,0496	<u>2,9</u>
	D8Rat53	24	17,49±24,27(114)	13,87±23,22(99)	0,2692	1,1
<b>UPE</b> mg/24h	D8Rat53	8	16,84±7,57(101)	16,43±4,32(93)	0,652	0,1
	D8Rat53	14	25,14±16,13(112)	22,61±12,41(98)	0,2088	0,3
	D8Rat53	24	31,88±26,26(114)	28,18±26,57(98)	0,3113	0,3

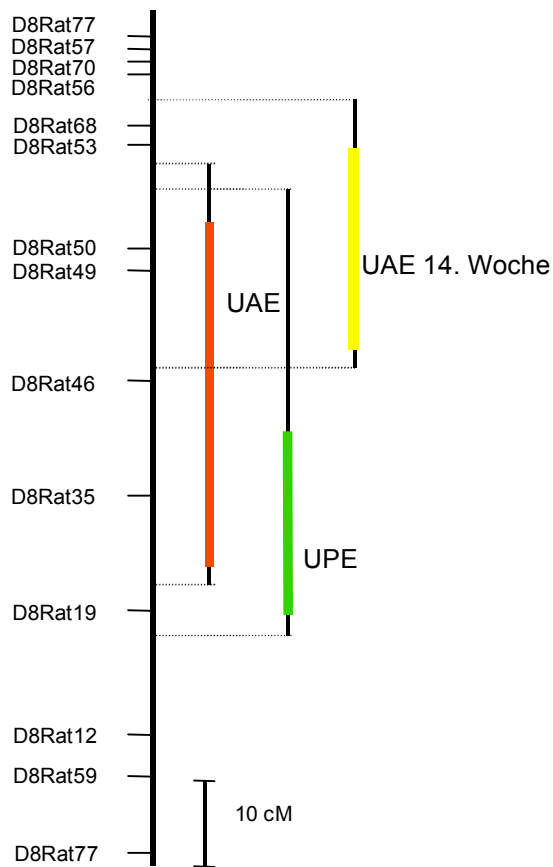
**Tabelle 4: LOD-Werte aller UAE, UPE und SBD auf RNO 8**

Die Tabelle zeigt die Kopplungsergebnisse für 3 QTL auf Chromosom RNO 8 im Alter von 8, 14 und 24 Wochen.

Phänotypen sind nach den Genotypen sortiert, wobei MM für Homozygotie, MS für Heterozygotie für das MWF-Allel steht.

Wahrscheinliche Kopplung (LOD 1,9-3,3) ist unterstrichen, signifikante Kopplung (LOD>3,3) fett und unterstrichen

Die folgende Graphik veranschaulicht die Lage der QTL im Hinblick auf die Gesamtgröße des Chromosoms 8, sowie die räumliche Platzierung der Marker:



### Abbildung 8: Chromosomenkarte RNO8

QTL Positionen in der 24 Lebenswoche, UAE Urinalalbuminexkretion (rot), UPE Urinproteinexkretion (grün).

Ausnahme: UAE 14 Lebenswoche gelb markiert.

Die farbigen Balken demonstrieren das 1-LOD-Intervall, die schwarzen Balken das 2-LOD-Intervall.