

4. Diskussion

Die Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte ist aufgrund ihrer genetischen Konstellation für die spontane Entwicklung einer arteriellen Hypertonie und Albuminurie prädisponiert. Damit repräsentiert der MWF-Stamm aus klinischer Sicht ein interessantes Tiermodell, da die arterielle Hypertonie und Albuminurie wesentliche Risikofaktoren für die Pathogenese von Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen darstellen. Die MWF-Ratte ist durch eine weitere phänotypische Auffälligkeit, der Ausbildung subkapsulärer Glomeruli in der Niere, gekennzeichnet. Weiterhin weist die MWF-Ratte eine reduzierte Nephronanzahl pro Niere und eine Vergrößerung des Bowman'schen Kapseldurchmessers sowie eine altersabhängige Glomerulosklerosemanifestation auf.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die MWF-Ratte im Vergleich mit der Lew-Ratte mit Hilfe einschlägiger und eigens etablierter Untersuchungsmethoden phänotypisch umfassend charakterisiert und an der Ausbildung der arteriellen Hypertonie, Albuminurie und der Entwicklung subkapsulärer Glomeruli beteiligte genetische Faktoren bzw. Genloci identifiziert. Darüber hinaus wurden Analysen zur differentiellen Genexpression durchgeführt.

Die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung bestätigten, daß der systolische Blutdruck und die Albuminurie bei adulten männlichen MWF-Ratten im Vergleich zum normotensiven und nierengesunden Referenzstamm Lew signifikant erhöht waren und sich mit 166,0 mmHg und 49,86 mg/24h im pathologischen Bereich befanden. Die normotensive Ratte zeigte bezüglich des systolischen Blutdrucks Normalwerte von 120 mmHg; sie befanden sich damit im Normbereich des Menschen. Physiologische Albuminausscheidungen liegen bei der Ratte, wie unsere eigenen Untersuchungen zeigen, unter 1 mg/24h, beim Menschen unter 30 mg/24h.

Die Ergebnisse der Blutdruckmessungen und der renalen Albuminausscheidungen korrelierten mit den Resultaten bekannter Studien (Fassi et al., 1998; Hackbarth et al., 1991; Remuzzi et al., 1992), die hiermit bestätigt werden konnten. Der systolische Blutdruck männlicher MWF-Ratten aus der eigenen Kolonie differierte im Vergleich zu MWF-Ratten anderer Kolonien literaturbekannter Untersuchungen unter basalen Bedingungen um bis zu 20 mmHg, die Proteinurie um bis zu 79 mg/24h und die Albuminurie um bis zu 30 mg/24h. Diese Differenzen können auf verschiedene Techniken der Blutdruckmessung und unterschiedliche Nachweisverfahren der Proteinurie- bzw. Albuminurie-Analytik und auf geringfügig veränderte Haltungsbedingungen der Ratten sowie minimale genetische Unterschiede zwischen den einzelnen MWF-Kolonien zurückgeführt werden (Lindpaintner et al., 1992).

In früheren Studien wurde postuliert, daß eine Reduktion der Nephronanzahl eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Bluthochdruckes spielt und mit einer Salzsensitivität der Hypertonie assoziiert ist (Brenner et al., 1988; Skov et al., 1994). Beim MWF-Rattenstamm wurde im Vergleich zu normotensiven Referenzstämmen eine Reduktion der Nephronanzahl von bis zu 50% beobachtet (Kaufmann et al., 1990; Fassi et al., 1998). Andere Rattenstämme mit genetisch bedingter Hypertonie zeigen ebenfalls erniedrigte Glomerulianzahlen pro Niere (Brenner et al., 1988; Skov et al., 1994). Zu diesen Stämmen gehören beispielsweise salzsensitive Dahl-Ratten mit einer um 15% erniedrigten, Milan-hypertensive Ratten mit einer um 17% erniedrigten und spontan hypertensive Ratten mit einer um 14% reduzierten Nephronanzahl (Skov et al., 1994). Als Folge dieser erniedrigten Nephronanzahl liegt eine Reduktion der totalen glomerulären Filtrationsoberfläche vor, die zusätzlich eine Prädisposition für die Entwicklung einer Hypertonie darstellt. Diese pathophysiologischen Veränderungen bewirken u. a. eine Beeinträchtigung der renalen Natriumexkretion, die offensichtlich bei den hypertensiven Ratten eine Salzsensitivität impliziert (Brenner et al., 1988).

In einer Interventionsstudie wurde mittels einer 4%igen Natriumchlorid-Gabe im Futter untersucht, inwieweit die im MWF-Rattenstamm beobachtete Nephronreduktion zu einer salzsensitiven Hypertonie führt.

Die Ergebnisse belegten, daß die spontan entwickelte arterielle Hypertonie und Albuminurie trotz der im MWF-Stamm erniedrigt vorliegenden Nephronanzahl nicht durch eine erhöhte Salzgabe (4% NaCl) beeinflusst werden können. Somit erschien die genetisch bedingte reduzierte Nephronzahl für diese Tiere nicht zwangsläufig mit salzsensitiver Hypertonie assoziiert zu sein (Kreutz et al., 1999; Schulz et al., 1998). Diese Befunde waren für die weitere Planung und Durchführung der Kosegregationsstudie relevant, da aufgrund der erzielten Ergebnisse auf eine zusätzliche diätetische Salzbelastung der Tiere zur verstärkten Ausprägung der Phänotypen Hypertonie und Albuminurie verzichtet werden konnte.

In späteren, von dieser Arbeit unabhängigen Untersuchungen (Kreutz et al., 2000), konnte demonstriert werden, daß bei männlichen als auch weiblichen MWF-Ratten die Gabe einer extremen Hochsalzdiät von 8% Natriumchlorid im Futter zu salzsensitiver Hypertonie und Albuminurie führt. Die angeborene Nephronreduktion scheint daher dennoch ein wichtiger Faktor für die Entwicklung einer salzsensitiven Hypertonie und einer Nierendysfunktion zu sein. Die Ergebnisse der Studie belegten, daß die bei weiblichen MWF-Ratten beobachtete Protektion vor einer Albuminurie-Erkrankung durch einen Hochsalz-induzierten (8% NaCl) Blutdruckanstieg eliminiert wird. Somit könnte bei den MWF-Weibchen ein hereditärer glomerulärer Defekt vorliegen, der durch den Anstieg des glomerulären Kapillardrucks unter Salzbelastung demaskiert wird und auf diese Weise zu einer Manifestation der Albuminurie führt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß MWF-Weibchen eine geringere Hypertonie-Prädisposition aufweisen und unter Normaldiät erst mit steigendem Alter eine merkliche Albuminurie auffällig wird. MWF-Männchen entwickeln dagegen bereits in einem sehr frühen Lebensalter neben der Hypertonie eine deutliche bis massive Albuminurie. Die vor allem bei männlichen MWF-Ratten mit dem Alter drastisch ansteigende Albuminurie ist vermutlich auf einen funktionellen Defekt am Glomerulum zurückzuführen, wie frühere Studien bereits dokumentierten (Remuzzi et al., 1992).

Nach eigenen Untersuchungen konnte das Auftreten subkapsulärer Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt im Cortex Corticis (Hackbarth et al., 1983), einer normalerweise glomerulusfreien Zone der Niere, bei männlichen und weiblichen MWF-Ratten bestätigt werden.

In der Niere erfolgt die Nephrogenese vom tiefer gelegenen zum äußeren Cortex. Die Regulierung der Nephronbildung wird über Transkriptionsfaktoren, Protoonkogene und Polypeptid-Wachstumsfaktoren vorgenommen (Horster et al., 1999). Die Glomeruli werden durch die Ausdehnung tubulärer Schlingen während des Wachstumsprozesses von der Nierenoberfläche verdrängt, so daß sich der Cortex corticis unterhalb der Nierenkapsel ausbildet (Rittinghausen et al., 1987). Subkapsuläre Glomeruli der MWF-Ratte entstehen durch eine zwischen dem 4.-10. Tag auftretende postnatale Verlagerung tiefer liegender Glomeruli in die äußeren Bereiche des Cortex (Hackbarth et al., 1991). Möglicherweise erfolgt die Verlagerung der Glomeruli in der MWF-Ratte aufgrund einer anderen räumlichen Anordnung proximaler Tubuli oder auch aufgrund von Entwicklungsdefekten der Gesamtniere (Hackbarth et al., 1983; Rittinghausen et al., 1987). Auffällig ist, daß neben dem Auftreten der subkapsulären Glomeruli die Glomerulianzahl im äußeren Rindenbereich erhöht ist (Rittinghausen et al., 1987).

Bei verschiedenen Spezies (Elefanten, Rhesusaffen, Menschen) konnte ein vereinzelt Auftreten subkapsulärer Glomeruli beobachtet werden (Zimmermann, 1933). Die Lew-Ratten weisen nach eigenen und bereits vorliegenden (Hackbarth et al., 1983; Rittinghausen et al., 1987) Nierenuntersuchungen ebenfalls nur eine äußerst geringe Anzahl subkapsulärer Glomeruli in der Niere auf. MWF- als auch Lew-Ratten zeigen am 7. Tag mit 3,5-4,0 subkapsulären Glomeruli/Niere die größte Anzahl, wohingegen nur bei den MWF-Ratten am 10. Tag ein dramatischer Anstieg auf 100 subkapsuläre Glomeruli/Niere zu beobachten ist. Bei beiden Stämmen ist die Anzahl nach dem 10. Tag rückläufig (Rittinghausen et al., 1987). Durch das Wachstum der Tubuli wird die Anzahl subkapsulärer Glomeruli offensichtlich wieder reduziert (Hackbarth et al., 1983). Der Entwicklungsdefekt ereignet sich demzufolge vor dem 10. Lebenstag der MWF-Ratte (Merlet-Benichou et al., 1981). Hackbarth et al. postulierten (1983), daß subkapsuläre Glomeruli zu einem speziellen Nephrontyp gehören, der möglicherweise über strukturelle Veränderungen zu definieren ist

und somit nicht von Teilen des proximalen Tubulus umschlungen wird, wie es normalerweise der Fall ist.

Eine sehr wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Durchführung der gesamten Studie war neben der exakten phänotypischen Charakterisierung der Parentaltiere MWF und Lew ein hoher Inzuchtgrad der Rattenstämme, der eine intraspezifische genetische Übereinstimmung der Tiere von $\geq 99\%$ erfordert. Die Genome der beiden Parentalstämme wurden daher systematisch mit Mikrosatellitenmarkern untersucht. Mit Hilfe dieser Methodik wurde nachgewiesen, daß die beiden Parentalstämme jeweils genetisch homogen sind und eine ausreichend hohe Polymorphismusrate zwischen den Stämmen vorliegt.

Die für die Backcrosszucht eingesetzten drei MWF-Männchen wiesen im Alter von 13-18 Monaten hoch pathologische Albuminexkretionen (185,13-756,80 mg/24h) auf, so daß damit eine entscheidende Ausgangsbasis für die Kosegregationsanalyse gegeben war. Die F1-Männchen waren bezüglich des systolischen Blutdrucks und der renalen Albuminausscheidung phänotypisch unauffällig und mit den normotensiven und nierengesunden Lew-Ratten zu vergleichen. Dies deutet insgesamt auf einen rezessiven Vererbungsmodus dieser Phänotypen hin, der bereits in früheren Untersuchungen beschrieben wurde (Hackbarth et al., 1991). Erst ab der 24. Woche zeigte sich bei den F1-Tieren eine leichte, vermutlich altersbedingte pathologische Albuminurie-Progression. Aus diesem Grund wurde für die Kosegregationsstudie der Ansatz einer Backcross-Population gewählt. Dieses Ergebnis befindet sich im Einklang mit den Parentaltier-Befunden, die bei den MWF-Ratten in erster Linie das Vorliegen einer selektiven Proteinurie mit überwiegender Ausscheidung von Albumin demonstrierten.

In der Backcross-Population wurde ein mittlerer Blutdruckwert von 160,4 mmHg in der 14. Woche gemessen, der mit dem der Parentaltiere (166,0 mmHg) korrelierte. Die mittleren Albuminexkretionen dagegen lagen bei den Backcross-Tieren in der 14. Woche mit 3,05 mg/24h wesentlich niedriger als bei den Parentaltieren (49,86 mg/24h). Nur relativ wenige Backcross-Ratten wiesen hoch pathologische Werte von bis zu 65,15 mg/24h auf. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß offensichtlich durch über den Lew-Stamm eingebrachte protektive Allele die Albuminurie der Backcross-Tiere reduziert wurde.

Als weitere entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche Kopplungsanalyse ließ sich in der Backcross-Population eine beträchtliche Dissoziation zwischen den Phänotypen systolischer Blutdruck und Albuminurie als auch eine ausreichend große Varianz der genannten Phänotypen beobachten. Sie variierten in Abhängigkeit von der Allelverteilung an den einzelnen relevanten Loci. Der Einfluß des systolischen Blutdrucks auf die Albuminurie lag bei den Backcross-Tieren in der 14. bzw. 24. Woche zwischen 2%-5%.

Die Ergebnisse zeigten, daß die erhöhte renale Albuminausscheidung der MWF-Ratten entgegen Literaturdaten (Hackbarth et al., 1991) nur zum Teil blutdruckabhängig ist. Die sehr geringe Korrelation zwischen Blutdruck und Albuminurie scheint darauf hinzudeuten, daß unabhängige Gene oder genetische Faktoren existieren, die in die Determination dieser Phänotypen involviert sein müssen. Für diese These sprechen auch die unimodalen Verteilungen dieser Phänotypen, die im Gegensatz zu bimodalen Werteverteilungen mit einem monogenetischen Effekt, in der Regel mit einem polygenetischen Befund einhergehen. In dem vorliegenden pathologischen Krankheitsprozeß bei der MWF-Ratte müßten infolgedessen mehrere Gene mit geringerer Auswirkung auf den jeweiligen Phänotyp involviert sein (Timberlake et al., 2001).

Die Auswertung der Kopplungsanalyse realisierte, daß die Albuminurie durch mindestens 4 QTL auf den Chromosomen 1, 6, 12 und 17 beeinflußt wird. Es handelt sich somit, wie die phänotypische Charakterisierung der Backcross-Population bereits vermuten ließ, um einen polygenetisch determinierten Phänotyp. Aus den Ergebnissen ist abzuleiten, daß Kandidatengene aus relevanten QTL-Regionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten an- oder abgeschaltet werden bzw. Divergenzen in ihrer Genaktivität demonstrieren (age of onset-Effekt). Der Phänotyp Proteinurie wird über mindestens ein QTL auf Chromosom 17 in der 24. Woche auffällig. Seine Lod-Kurve scheint der für den QTL Albuminurie auf Chromosom 17 in der 24. Woche, wenn auch in stark abgeflachter Form zu entsprechen.

Ähnliche Befunde wurden für den systolischen Blutdruck ermittelt. Der Blutdruck wird durch mindestens drei verschiedene QTL auf den Chromosomen 1, 4 und 5 beeinflußt.

Das MWF-Allel für den QTL „systolischer Blutdruck auf Chromosom 5“ ist an diesem Locus mit einem niedrigeren Blutdruck assoziiert als das Lew-Allel. Für den blutdruckerhöhenden Effekt ist interessanterweise nicht die MWF-Ratte verantwortlich, da der Lew-Stamm das entscheidende Allel einzubringen scheint. Es ist davon auszugehen, daß beim Etablieren des Inzuchtstammes Lew blutdruckerhöhende und blutdruckerniedrigende Allele fixiert wurden, jedoch die protektiven (blutdruckerniedrigenden) Allele nur im Parentalstamm zum Tragen kommen. Durch den in die Backcrosszucht eingebrachten genetischen MWF-Hintergrund könnte es die im Lew-Stamm fixierten blutdruckerhöhenden Allele befähigen, entscheidend in das Blutdruckgeschehen einzugreifen und so die protektive Wirkung „gesunder“ Allele zu reduzieren bzw. zu eliminieren. Ein ähnlicher Befund wurde für einen Blutdruck-QTL auf dem X-Chromosom in einer Kreuzung zwischen SHRSP (stroke-prone spontaneously hypertensive rat)- und WKY (Wistar Kyoto)-Ratten beschrieben (Hilbert et al., 1991).

Die Anzahl subkapsulärer Glomeruli ohne Kapselkontakt wird über mindestens ein QTL auf dem X-Chromosom gesteuert, die Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit Kapselkontakt über

mindestens zwei QTL auf den Chromosomen 1 und 13. Subkapsuläre Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt werden somit überraschenderweise durch unterschiedliche genetische Loci determiniert. Warum MWF-Weibchen zwar eine wesentlich höhere Anzahl dieses Nephrontyps mit Kapselkontakt aufweisen als MWF-Männchen, aber nachweislich keine erhöhte Anzahl subkapsulärer Glomeruli ohne Kapselkontakt entwickeln, ist über die Resultate der Kopplungsanalyse nicht definitiv zu klären.

In der Lod-Kurve sich abzeichnende Peaks signalisieren die wahrscheinlichste Lokalisation von QTL auf einem bestimmten Chromosom. Je höher der Peak, desto größer ist die bestehende Signifikanz bzw. der Lod-Score. Am Beispiel des Albuminurie-QTL auf Chromosom 1 in der 14. Woche (Abb. 24) wird ersichtlich, daß die größte Signifikanz durch das 1-Lod-Intervall definiert wird. Hierbei handelt es sich nach Rapp (2000) um ein 95%iges Konfidenzintervall, das diesen QTL mit einer Wahrscheinlichkeit von 60-95% enthält. Bewirkt ein QTL nur eine geringe Veränderung eines Phänotyps, so ist dieses Intervall für die regionale Zuordnung des QTLs zu klein. Die Wahrscheinlichkeit, daß der QTL im Bereich des 2-Lod-Intervalls liegt, ist wesentlich größer. Der Umfang des Konfidenzintervalls wird bestimmt über die Anzahl der in die Kopplungsanalyse eingesetzten Backcross-Tiere und die Einflußnahme des QTL auf den jeweiligen Phänotyp sowie die ausgewählte Markerdichte.

Das Kartieren mehrerer QTL auf einem Chromosom kann sich in multiplen Peaks der Lod-Kurve widerspiegeln (Rapp, 2000). Solche Konstellationen könnten bei den QTL für Albuminurie auf Chromosom 1 in der 14. Woche (Abb. 24), für Albuminurie auf Chromosom 6 in der 24. Woche (Abb. 27) und für Albuminurie auf Chromosom 17 in der 24. Woche (Abb. 31) eine Rolle spielen. Besonders deutlich wird dieser Befund beim QTL für Albuminurie auf Chromosom 17 in der 24. Woche, der sich in vier verschiedene, dicht benachbarte Signifikanzbereiche aufsplittet. Da die einzelnen QTL einen Abstand von ca. 80 cM nicht einhalten, ist es nicht möglich, eindeutig voneinander getrennte Peaks in der Analyse zu detektieren.

Befindet sich zwischen mehreren QTL nur eine geringe cM-Distanz und weisen ihre Allele einen konträren Effekt auf den jeweiligen Phänotyp auf, so können sie sich gegenseitig in ihrer Wirkung aufheben oder sich dergestalt beeinflussen, daß ein nennenswerter Effekt nicht erkennbar wird (Rapp, 2000). Dieser Befund könnte bei dem QTL systolischer Blutdruck auf Chromosom 1 der 14. Woche (Abb. 21) eine Rolle spielen. Die Lod-Kurve dokumentiert an ihrem höchsten Punkt eine signifikante Assoziation mit einem Lod-Score=2,0. Blutdruckregulierende Gene könnten mit agonistischem und antagonistischem Effekt auf den Phänotyp innerhalb des Signifikanzbereiches eng beieinander liegen und auf diese Weise einen oder mehrere Hypertonie-fördernde bzw. -auslösende QTL maskieren. Aus diesem Grund ist die Möglichkeit, weitere für einen Phänotyp relevante QTL zu

übersehen, nicht auszuschließen. QTL mit diesen niedrigen Lod-Scores könnten allerdings auch falsch-positive Ergebnisse dokumentieren, die methodenbedingt nicht zu vermeiden sind.

Allele, die dagegen nicht nur benachbart sind, sondern eine miteinander vergleichbare Wirkung auf die Phänotypen ausüben, stellen sich über die Lod-Kurve mit einem einzelnen Peak oder in Form eines Plateaus dar (Rapp, 2000). Der QTL für subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt auf Chromosom 13 in der 24. Woche (Abb. 35) zeigt über das gesamte Chromosom verteilt drei konvergente Plateaubereiche auf. Dieser Sachverhalt läßt darauf schließen, daß auf dem gesamten Chromosom 13 mehrere QTL kartieren, die auf den genannten Nephrontyp Einfluß nehmen.

Um die Identifizierung relevanter Kandidatengene zu beschleunigen, wurde die Integration der Kartierungsergebnisse differentiell exprimierter Transkripte aus der differentiellen Genexpressionsanalyse und literaturbekannter Kandidatengene mit den Kartierungsergebnissen der Blutdruck- und Proteinurie-relevanten Genloci vorgenommen.

Auf Basis der dazu erfolgreich etablierten cDNA-Subtraktion konnten nach der Auswertung des differentiellen Screenings und der Northern Blot-Analysen 14 Transkripte als eindeutig differentiell exprimiert identifiziert und zum Teil mittels RH-Mapping kartiert werden. Mit Hilfe der Mikroarray-Analyse wurden u. a. 114 eindeutig differentiell exprimierte Genprodukte identifiziert, deren Lokalisationen in der Ratte bereits bekannt sind.

Die literaturveröffentlichten, jedoch noch nicht in der Ratte kartierten Kandidatengene Nephrin (*Nphs1*), α -Aktinin-4 (*Actn4*) und Zonula occludens-1 (*Zo-1*) wurden über FISH-Analysen bzw. RH-Mapping mit Erfolg chromosomal lokalisiert. Alle Genprodukte wurden auf existierende Ko-Lokalisationen mit QTL aus der Kopplungsanalyse untersucht.

Für den QTL Blutdruck der 14. Woche auf Chromosom 1, der gegebenenfalls an der potentiellen Hypertonie-Problematik beteiligt ist, bieten sich nach den bestehenden Kartierungsergebnissen mehrere Kandidatengene an. Dazu zählen die Gene *Nphs1*, *Actn4*, Kallikrein 1 (*Klk1*) und 5 Genprodukte aus der Mikroarray-Analyse. Die Kandidatengene *Nphs1*, *Actn4* und *Klk1* sind allerdings nur am Rande des Signifikanzbereiches lokalisiert und vermutlich nicht in den Krankheitsprozeß der MWF-Ratte eingebunden. Die aus der Mikrochip-Analyse stammenden Gene (s. Tab. 17) liegen innerhalb des Signifikanzbereiches und könnten eventuell, wie bereits weiter oben diskutiert, durchaus agonistische und antagonistische Effekte auf den Blutdruck bewirken. Ob sie auch in das Albuminurie-Geschehen eingreifen, ist nicht wahrscheinlich, da sie zwar gleichzeitig eine Ko-Lokalisation mit diesem QTL zeigen, jedoch nur an der Peripherie des 2-Lod-Intervalls liegen.

Innerhalb des QTL systolischer Blutdruck der 14. Woche auf Chromosom 4 kartieren zwei Gene aus der Mikroarray-Analyse (s. Tab. 17). Welche Funktionen diese speziell in der Niere

ausüben, muß explizit geklärt werden. Plisov et al. (2000) diskutieren, daß das Gen „sh3 domain binding protein“ als Signalprotein in der Nierenentwicklung, insbesondere bei der Bildung des Nephronepithels, eine wichtige Rolle spielen könnte.

Sechs Genprodukte aus der cDNA-Subtraktion und der Mikroarray-Analyse weisen eine Ko-Lokalisation mit dem QTL systolischer Blutdruck der 14. Woche auf Chromosom 5 auf.

Das differentiell exprimierte Transkript 9.139 (Leucin-Zipper-Protein 1, *Luzp1*) aus der cDNA-Subtraktion zeigt eine direkte Ko-Lokalisation mit diesem QTL. Die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse belegen, daß bei der MWF-Ratte zwischen Tag 2-5 eine höhere Expression vorliegt, die sich vermutlich schon vor dem zweiten Lebenstag manifestiert. *Luzp1* ist ein neues Protein mit drei Leucin-Zipper-Motiven, das bei der Ratte vor allem im Gehirn bzw. in Zellkernen von Neuronen eine Rolle spielt (Sun et al., 1996). Welche physiologische bzw. pathophysiologische Bedeutung es im Gesamtorganismus einnimmt und ob es primär oder sekundär in nierenphysiologische Stoffwechselwege involviert sein könnte, ist derzeit nicht geklärt. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, Rückschlüsse auf seine Funktion im Blutdruckgeschehen zu ziehen. Da das Lew-Allel auf den QTL Einfluß nimmt, wäre es denkbar, daß nicht die MWF-Ratte eine zu hohe Expression des Genproduktes aufweist, sondern die Lew-Ratte *Luzp1* zu gering exprimiert und auf diese Weise die Hypertonie-Entwicklung negativ beeinflusst.

Das antinatriuretische Peptid (*Anf*) als zweites potentiell und literaturbekanntes Kandidatengen kartiert direkt in dem Signifikanzbereich des 1-Lod-Intervalls auf Chromosom 5. Dieses äußerst interessante Gen wird u. a. im Nierenparenchym synthetisiert und ist in die cGMP-vermittelte Blutdruckhomöostase involviert (Ogawa et al., 1999). Die Studie belegte, daß der Verlust an *Anf* eine Natriumretention und eine reduzierte Nierendurchblutung bewirkt und eine Erklärung für die Entwicklung einer salzsensitiven Hypertonie bei diesen Tieren liefert. In diesem Zusammenhang ist es unumgänglich, eine potentielle pathophysiologische Bedeutung von *Anf* in der Hypertonie-Entwicklung der MWF-Ratte weiter zu untersuchen.

Eine dritte Ko-Lokalisation für den QTL systolischer Blutdruck der 14. Woche auf Chromosom 5 besteht für das Endothelin-Converting-Enzym-1-Gen (*ECE-1*). *ECE-1* katalysiert die proteolytische Umwandlung von inaktiv vorliegendem Big-Endothelin-1 zu aktivem Endothelin-1 (Schweizer et al., 1997; Valdenaire et al., 1999). Erhöhte Endothelin-1 (ET-1)-Konzentrationen werden mit schweren Formen der Hypertonie und Nierenendorganschäden in Verbindung gebracht. ET-1 wird nach neuesten Erkenntnissen u. a. als primäres oder sekundäres Agens für die Hypertonie-Pathogenese angesehen, obwohl dazu in der Literatur kontroverse Darstellungen zu finden sind (Naruse et al., 2000; Schiffrin et al., 2000). Ob das Endothelinsystem in das Hypertonie-Geschehen der Ratte eingreift und

inwieweit dieser Sachverhalt auch für den Menschen Gültigkeit besitzt, ist gegenwärtig explikationsbedürftig.

Das vierte Genprodukt „tubulin beta chain (*t beta-15*)“ liegt im 2-Lod-Intervall des Blutdruck-QTL auf Chromosom 5 und könnte nach neuesten Untersuchungen mit der Nephrogenese assoziiert und speziell an der Umwandlung des metanephrotischen Mesenchyms zum Nephronepithel beteiligt sein (Plisov et al., 2000).

Zwei weitere Gene (s. Tab. 17) kartieren direkt in das 1-Lod-Intervall des QTL; sie sind daher äußerst interessante Kandidatengene, deren Funktionen ebenfalls näher untersucht werden müssen.

Das differentiell exprimierte Genprodukt 9.107 (Aldolase A, *AldoA*) weist eine Ko-Lokalisation mit dem QTL Albuminurie der 14. Woche auf Ratten-Chromosom 1 auf und liegt im 2-Lod-Intervall des Signifikanzbereiches. *AldoA* ist ein Enzym der Glykolyse und katalysiert die Spaltung von D-Fruktose-1,6-Bisphosphat in D-Glyzerinaldehydphosphat und Dihydroxyazetonphosphat. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, daß *AldoA* in den vorliegenden pathologischen Kontext involviert ist.

Darüber hinaus konnten über die Mikroarray-Analyse drei weitere Kandidatengene identifiziert werden, die sich jedoch bereits außerhalb des 2-Lod-Intervalls befinden.

Für den QTL Albuminurie der 14. und 24. Woche auf Chromosom 6 gingen aus der Chip-Analyse zwei differentiell exprimierte Genprodukte hervor, die allerdings beide außerhalb des Signifikanzbereiches kartieren. Das Gen „Bradykininrezeptor B1 (*Bdkrb1*)“ ist eine wichtige Komponente des Kallikrein-Kinin-Systems für intrarenale hormonelle Regulationsmechanismen und hat eine entscheidende Funktion in der Kontrolle der Nierendurchblutung und der Salz- und Wasserausscheidung. Untersuchungen haben ergeben, daß Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems eine Rolle bei der Entstehung von Nierenendorganschäden und für die Hypertonie-Entwicklung spielen könnten (Yu et al., 1998). Aufgrund seines differentiellen Expressionsmusters wäre eine nähere Analyse des Gens im vorliegenden Kontext dennoch interessant.

Zwei differentiell exprimierte Gene aus der Mikroarray-Analyse (s. Tab. 17) zeigen eine direkte Ko-Lokalisation mit dem QTL Albuminurie der 24. Woche auf Chromosom 12. Beide Genprodukte liegen innerhalb des 2-Lod-Intervalls und fungieren daher als bedeutende Kandidatengene, die einer näheren Funktionsanalyse unterzogen werden müssen.

Ein wichtiges Kandidatengen für die Albuminexkretion im Urin stellt das ET-1-Gen dar. Es zeigt eine direkte Ko-Lokalisation mit dem QTL Albuminurie der 14. und 24. Woche auf Chromosom 17 der Ratte und wurde bereits weiter oben im Zusammenhang mit dem

Endothelinsystem und der Pathogenese der Hypertonie diskutiert. Es ist wahrscheinlich, daß ET-1 in der Lage ist, primär oder sekundär Einfluß auf die Entwicklung der Albuminurie zu nehmen.

Weiterhin wurde das differentiell exprimierte Gen „phosphotriesterase related protein“ in der Mikroarray-Analyse detektiert, das eine Ko-Lokalisation mit dem Albuminurie-QTL aufzeigt und hinsichtlich seiner Funktion in der Nierenphysiologie weiter untersucht werden muß.

Fünf Gene mit einem differentiellen Expressionsmuster aus der Mikroarray-Analyse (s. Tab. 17) weisen Ko-Lokalisationen mit dem QTL für subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt der 24. Woche auf Chromosom 1 auf. Vier der Gene kartieren direkt in den Signifikanzbereich und eines in den Randbereich des QTL. Das Gen „*gdnf receptor alpha precursor (gdnfr-alpha)*“ ist nach neuesten Erkenntnissen Komponenten der TGF-beta-Superfamilie ähnlich und scheint als Wachstumsfaktor für Mesangiumzellen und für die Pathogenese der Glomerulosklerose eine bedeutsame Funktion zu haben (Orth et al., 2000). Inwieweit es für die Entwicklung des neuen Nephrontyps relevant ist, müssen weiterführende Studien zeigen.

Das zwischen MWF und Lew differentiell exprimierte und literaturbekannte Kandidatengen Renin (*Ren*) liegt im Signifikanzbereich von Chromosom 13 des QTL subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt. Das Renin-Angiotensin-System (RAS) nimmt eine bedeutende Rolle in der Nierenentwicklung ein (Stuart et al., 2001). Welchen Einfluß Renin bzw. das RAS auf den Nephrontyp subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt hat, ist derzeit ungeklärt.

Über die Mikroarray-Analyse konnten noch 6 weitere, über das Chromosom 13 verteilt vorliegende, Kandidatengene identifiziert werden. Sie bieten eine Erklärung für die weiter oben diskutierten, über das gesamte Chromosom sich ziehenden, signifikant auffälligen Plateauphasen.

Für den QTL subkapsuläre Glomeruli ohne Kapselkontakt der 24. Woche konnte nur ein differentiell exprimiertes Gen aus der Mikroarray-Analyse auf dem X-Chromosom detektiert werden (s. Tab. 17).

Alle Transkripte, die eine Ko-Lokalisation mit den nachgewiesenen Loci der Rückkreuzungen aufweisen, sind besonders interessante Kandidatengene, die primär einer weiteren funktionellen Analyse unterzogen werden. Da bei ca. 70% der über die Mikroarray-Analyse identifizierten Genprodukte noch keine Kartierung in der Ratte vorliegt, ist davon auszugehen, daß die Anzahl der Kandidatengene für die ermittelten QTL-Regionen der Kopplungsanalyse noch erheblich gesteigert werden kann. Weiterführende Untersuchungen

der Gene, zur Identifizierung ihrer chromosomalen Lokalisation und die Analyse ihrer Funktionen im Organismus sind zur Klärung der Pathophysiologie bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen von entscheidender Bedeutung.

Aus den dargestellten Ergebnissen ist abzuleiten, daß die Phänotypen systolischer Blutdruck und subkapsuläre Glomeruli unabhängig voneinander genetisch determiniert sind und keine Kopplung zu den identifizierten QTL für Albuminurie aufweisen. Die Ergebnisse belegen, daß die im MWF-Rattenstamm auffällig gewordene Albuminurie und der Phänotyp systolischer Blutdruck nicht durch den Effekt eines singulären Gens (major gene effect) verursacht werden, sondern jeweils durch mehrere Gene mit geringeren Auswirkungen auf die Phänotypen. Nur der Albuminurie-QTL auf Chromosom 12 (UAE 3) bewirkt, von den drei anderen QTL isoliert betrachtet, einen moderaten, aber signifikanten Anstieg der Albuminurie. Für das Auftreten deutlich erhöhter Albuminuriewerte ist eine Homozygotie an mindestens drei QTL erforderlich.

Die dargestellten Befunde verdeutlichen die äußerst komplexen Zusammenhänge in einem so exakt definierten Tiermodell wie dem des Inzuchtstammes MWF. Es ist davon auszugehen, daß mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit über MWF-spezifische Allele, die in einen anderen genetischen Hintergrund eingekreuzt werden, vielleicht nicht nur dieselben, sondern vielmehr zusätzliche Loci bzw. QTL ermittelt werden könnten. Es würde sich anbieten, die hypertensive und nierenkranke MWF-Ratte mit einem zweiten hypertensiven, aber nierengesunden Referenzstamm zu verpaaren, um so über den in beiden Parentalstämmen stärker ausgeprägten Bluthochdruck einerseits die Entwicklung der Albuminurie zu beschleunigen und andererseits ihr Ausmaß zu intensivieren. Auf diese Weise könnten vielleicht Ergebnisse mit noch höheren Lod-Scores in der Kopplungsanalyse erzielt werden. QTL, deren Identifikation über beide Studien abgesichert werden könnten, würden besonders interessante und aussagekräftige Kandidatengenregionen enthalten, die von vorrangiger experimenteller Relevanz wären.

Unter Einsatz des aussagekräftigen Tiermodells MWF gelang die Detektion neuer Kandidatengene und Kandidatengenregionen für die Phänotypen Albuminurie und Hypertonie. Mit ihrer Hilfe könnten aussichtsreiche Einblicke in die zugrundeliegenden genetischen Mechanismen ermöglicht werden. Zur weiteren Charakterisierung der Albuminurie- und Blutdruck-relevanten Loci wird eine Feinkartierung der Regionen und die

Identifizierung und Funktionsanalyse von Kandidatengenen durch Mutationsuntersuchungen und Studien zur Genexpression erfolgen.

Weiterhin könnten durch Züchten kongener Rattenstämme die ermittelten Loci in den kontrastierenden Parentalstamm überführt werden, um auf diese Weise die Verifizierung des jeweiligen Phänotyps zu ermöglichen und eine Einengung der identifizierten Intervalle vorzunehmen.

Die konzeptionellen und methodischen Erkenntnisse der vorliegenden und der weiterführenden Arbeiten am MWF-Tiermodell stellen eine hervorragende Basis dar, identifizierte Kandidatengene über humangenetische Studien wie Geschwisterpaaranalysen oder Fallkontroll- bzw. Assoziationsstudien bei Patienten eingehend zu untersuchen. Schwerwiegende Erkrankungen und daraus resultierende gravierende Folgen wie Herzinfarkt oder Nierenerkrankungen, die zu terminalem Nierenversagen mit der unvermeidlichen Durchführung einer Nierenersatztherapie (Dialyse und/oder Transplantation) führen, wären einzuschränken oder gar zu vermeiden.

In aktuellen Untersuchungen zur arteriellen Gefäßfunktion konnte bei MWF-Ratten im Vergleich zu spontanhypertensiven und nierengesunden SHR-Ratten eine deutlich eingeschränkte endotheliale Dysfunktion in den Koronararterien nachgewiesen werden (Gschwend et al., 2002). Diese Befunde deuten im Hinblick auf das erheblich gesteigerte kardiovaskuläre Risiko bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen auf einen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen endothelialer Dysfunktion und Nierenerkrankung hin. Die vorliegenden Befunde belegen auch die Bedeutung der MWF-Ratte für die Aufklärung genetischer Grundlagen für diese klinisch wichtige Symptomkonstellation.

Vergleichende Kartierungsuntersuchungen von blutdruckregulierenden QTL bei der Ratte und bei Patienten mit Hypertonie wurden bereits für zwei Genloci auf Ratten-Chromosom 1 (Kreutz et al., 1997; Wong et al., 1999) und Ratten-Chromosom 10 beschrieben (Kreutz et al., 1995; Julier et al., 1997). Erfolgversprechende Untersuchungen dieser Art ermöglichen beim Menschen Einblicke in die komplexen Stoffwechselwege der Niere sowie die Detektion analoger phänotypischer Veränderungen; sie werden nach der Identifizierung krankheitsrelevanter Gene Einblicke in Gen-Gen- und Umwelt-Gen-Interaktionen erlauben. Diese Erkenntnisse werden die Pharmakogenetik befähigen, gezielt neue Pharmaka und Behandlungsstrategien zur Prävention und Bekämpfung kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen zu entwickeln.