

Aus dem Universitätsklinikum Benjamin Franklin
der Freien Universität Berlin
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Abteilung Klinische Pharmakologie
(Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Martin Paul)

Genetische Charakterisierung der MWF-Ratte:

Ein Rattenmodell zur Identifizierung genetischer Faktoren, die zu arterieller Hypertonie und Proteinurie führen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Angela Schulz
aus Berlin

1. Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Reinhold Kreutz

2. Korreferent: Prof. Dr. med. Walter Zidek

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 13.09.2002

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
Abstract	8
1. Einleitung	9
1.1 Primäre Hypertonie-Erkrankungen	9
1.2 Tiermodelle für die Untersuchung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen	11
1.3 Identifizierung krankheitsrelevanter Gene und Genloci bei Hypertonie-Erkrankungen	13
1.4 Die Inzuchtrattenstämme Munich Wistar Frömter und Lewis/Mol	15
1.5 Die MWF-Ratte – ein Tiermodell zur Identifizierung genetischer Faktoren, die zu arterieller Hypertonie und Proteinurie führen	16
1.6 Ziel der Arbeit	17
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Chemikalien und Radionukleotide	20
2.1.2 Enzyme	21
2.1.3 Basenpaarleitern für die Agarosegel-Elektrophorese	21
2.1.4 Kits und kompetente Zellen	21
2.1.5 Puffer, Lösungen und Medien	22
2.1.6 Sonstige Materialien und Futtermittel	23
2.1.7 Geräte	24
2.2 Parentalstamm-Charakterisierung und Kosegregationsanalyse	25
2.2.1 Zucht	25
2.2.1.1 Parentaltiere MWF und Lew	25
2.2.1.2 Haltung	25
2.2.1.3 Zucht und Diät	26
2.2.1.3.1 Parentaltiere	26
2.2.1.3.2 Backcross (Lew x MWF)	26
2.2.2 Phänotypisierung	27
2.2.2.1 Systolische Blutdruckmessung	27
2.2.2.2 Urin- und biochemische Untersuchungen	27
2.2.2.2.1 Uringewinnung für die Erstellung klinischer Daten	27
2.2.2.2.2 Messung der Albuminurie	27
2.2.2.2.3 Biochemische Analysen	29
2.2.2.3 Phänotypisierung der Parental- und Backcross-Tiere	29
2.2.2.4 Präparation	30
2.2.2.5 Histologie	30
2.2.3 Genom- und Kopplungsanalyse	31
2.2.3.1 Genom-Analyse mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker	31
2.2.3.1.1 Prinzip	31
2.2.3.1.2 Genomische DNA-Isolierung aus Rattenschwänzen und Milz	31
2.2.3.1.3 Herstellung der DNA-Stockplatten	32
2.2.3.1.4 Mikrosatellitenmarker	32
2.2.3.1.5 Primer-Kinasierung	32
2.2.3.1.6 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	33
2.2.3.1.7 Polyacrylamidgel-Elektrophorese	33
2.2.3.2 Genom-Analyse der Parental- und Backcross-Tiere	34
2.2.3.3 Statistische Analyse	34

2.3 Differentielle Genexpressionsanalyse	35
2.3.1 Zucht und Präparation	35
2.3.2 Genotypisierung	35
2.3.3 cDNA-Subtraktion	35
2.3.3.1 Prinzip der cDNA-Subtraktion	35
2.3.3.2 Methode	37
2.3.3.2.1 RNA-Isolierung über Trizol	37
2.3.3.2.2 cDNA-Synthese	37
2.3.3.2.3 Rsa I-Spaltung	39
2.3.3.2.4 Adapter-Ligation an die Tester-cDNA (PCR-Select cDNA Subtraction Kit [®])	40
2.3.3.2.5 Erste und zweite Hybridisierung	41
2.3.3.2.6 Erste und zweite PCR-Amplifikation	41
2.3.3.2.7 Subtraktionseffizienz-Test	42
2.3.3.3 Differentielles Screening der Produkte aus der cDNA-Subtraktion	43
2.3.3.3.1 Klonierung der Genprodukte aus der cDNA-Subtraktion	43
2.3.3.3.2 Anzucht der Klone	44
2.3.3.3.3 Plasmidisolierung mit der Standard-Plasmid-Minipräparation (Qiagen)	44
2.3.3.3.4 Restriktionsverdau	44
2.3.3.3.5 Insertamplifizierung	45
2.3.3.3.6 cDNA-Dot Blots	45
2.3.3.3.7 Random Primer Labeling der cDNA-Proben	45
2.3.3.3.8 Prähybridisierung und Hybridisierung	46
2.3.3.3.9 Exponieren der Röntgenfilme	46
2.3.4 Analyse der Genprodukte aus der cDNA-Subtraktion	46
2.3.4.1 Sequenzierung	47
2.3.4.2 Genexpressionsanalyse mit der Northern Blot-Technik	47
2.3.4.3 Somatische Zellhybrid-Analyse	47
2.3.4.4 Radiation Hybrid-Mapping	48
2.3.4.4.1 Prinzip	48
2.3.4.4.2 Methode	49
2.4 Mikroarray-Technik	50
2.5 Ermittlung von Ko-Lokalisationen krankheitsrelevanter Gene und Genloci	50
2.5.1 Die Kandidatengene Neph rin, α -Aktinin-4, Zonula occludens-1 und Renin	50
2.5.2 Ko-Lokalisationen	51
3. Ergebnisse	52
3.1 Parentalstamm-Charakterisierung	52
3.1.1 Phänotypisierung der Parentalstämme MWF und Lew	52
3.1.1.1 Phänotypische Charakterisierung und Untersuchung auf Salzsensitivität	52
3.1.1.2 Vergleich der Phänotypen männlicher und weiblicher MWF- und Lew-Ratten	55
3.1.1.3 Nieren-Histologie	59
3.2 Kosegregationsanalyse	61
3.2.1 Phänotypisierung der Backcross-Population Lew x MWF	61
3.2.2 QTL-Mapping und Kopplungsanalyse	65
3.3 Differentielle Genexpressionsanalyse	78
3.3.1 Genotypisierung	78
3.3.2 cDNA-Subtraktion	78
3.3.3 Analyse der Genprodukte aus der differentiellen Genexpressionsanalyse	80
3.3.3.1 Charakterisierung der Genprodukte	80
3.3.3.2 Northern Blot-Analyse	83
3.3.3.3 Chromosomale Lokalisation der differentiell exprimierten Genprodukte	87
3.3.3.3.1 Somatische Zellhybrid-Analyse	87
3.3.3.3.2 Radiation Hybrid-Mapping	88

3.4. Auswertung der Mikroarray-Analyse	90
3.5 Ko-Lokalisationen zwischen differentiell exprimierten Genprodukten der cDNA-Subtraktion und QTL der Kosegregationsanalyse	93
3.6 Ermittlung von Ko-Lokalisationen zwischen krankheitsrelevanten Kandidatengenen und QTL aus der Kosegregationsanalyse	94
3.6.1 Nephrin, α -Aktinin-4 und Zonula occludens-1	94
3.6.2 Renin, antinatriuretisches Peptid und Kallikrein 1	97
3.6.3 Gene des Endothelinsystems	98
3.7 Zusammenfassende Präsentation der experimentell nachgewiesenen Ko-Lokalisationen	99
4. Diskussion	100
5. Abkürzungen	112
6. Literatur	113
7. Anhang	118

Zusammenfassung

Die Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte neigt zu einer spontanen Entwicklung einer arteriellen Hypertonie und einer ausgeprägten Albuminurie. Sie eignet sich deswegen aus klinischer Sicht als aussagekräftiges Tiermodell für die Humanmedizin, da Patienten mit arterieller Hypertonie und Albuminurie ein signifikant erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre und renale Erkrankungen zeigen.

Die phänotypische Charakterisierung männlicher MWF-Ratten ergab einen mittleren hypertensiven systolischen Blutdruck von $166,0 \pm 4,3$ mmHg und eine durchschnittliche renale Albuminexkretion von $49,86 \pm 24,77$ mg/24h. Bei weiblichen MWF-Tieren wurde dagegen nur eine leichte Hypertonie und erst mit zunehmendem Alter auch eine pathologische Albuminexkretion im Urin festgestellt. Als weitere phänotypische Auffälligkeit wurde im sog. Cortex Corticis der MWF-Niere eine signifikant erhöhte Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt nachgewiesen. Bei der MWF-Ratte ist die angeborene signifikante Nephronreduktion nicht zwangsläufig mit salzsensitiver Hypertonie assoziiert. Eine 4%ige Natriumchlorid-Gabe im Futter beeinflusst in keiner Weise die Hypertonie- und Albuminurie-Entwicklung der Tiere. Erst die Verabreichung einer extremen Hochsalzdiät (8% NaCl) führt bei beiden Geschlechtern zu einer Salzsensitivität der Hypertonie und Albuminurie. Im Gegensatz zu den MWF-Männchen, manifestiert sich bei den leicht hypertensiven Weibchen erst mit steigendem Alter eine deutliche Albuminurie. Als mögliche Ursache wird ein glomerulärer Defekt in der Niere diskutiert.

Nach den Ergebnissen der Kosegregations- bzw. Kopplungsanalyse sind die Phänotypen Hypertonie, Albuminurie und die Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt, die insgesamt einem rezessivem Vererbungsmodus folgen, durch unterschiedliche genetische Faktoren bzw. Genloci determiniert. Sie werden nicht durch den Effekt eines einzelnen Gens (major gene effect) bzw. einer Mutation im Sinne eines pleiotropen Effektes hervorgerufen, sondern unterliegen komplexen genetischen Zusammenhängen, in die verschiedene Genloci involviert sind.

Über die Kopplungsanalyse wurden für den polygen vererbten Phänotyp Albuminurie mindestens 4 verschiedene Quantitative Trait Loci (QTL) auf den Chromosomen 1, 6, 12 und 17 detektiert, die einem rezessiven Vererbungsmodus folgen. Es besteht eine komplizierte Interaktion unter den Albuminurie-QTL, von denen mindestens drei Loci eine Homozygotie aufweisen müssen, um einen Anstieg der Albuminurie um ca. 10 mg/24h zu verursachen. Die Analysen ergaben signifikant positive, epistatische Interaktionen zwischen den Albuminurie-QTL UAE 2 und UAE 4. Darüber hinaus wurden über die Kopplungsanalyse für den Phänotyp Hypertonie mindestens drei verschiedene QTL auf den Ratten-Chromosomen 1, 4 und 5, für die Anzahl subkapsulärer Glomeruli ohne Kapselkontakt mindestens ein QTL

auf dem X-Chromosom und für die Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit Kapselkontakt mindestens zwei QTL auf den Chromosomen 1 und 13 identifiziert.

Für die über die Kopplungsanalyse detektierten QTL wurden zahlreiche Ko-Lokalisationen mit differentiell exprimierten Genprodukten aus der cDNA-Subtraktion, mit differentiell exprimierten Transkripten aus der Mikroarray-Analyse und mit literaturbekannten Kandidatengenen nachgewiesen.

Mit den Ergebnissen werden neue Einblicke in die Pathogenese von Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen erwartet.

Abstract

Hypertension and proteinuria are important risk factors for cardiovascular morbidity and mortality. The Munich Wistar Frömter (MWF) rat represents an animal model for the identification of genetic factors, leading to spontaneous hypertension and proteinuria.

Male MWF rats demonstrated significantly elevated systolic blood pressure (SBP) values of 166.0 ± 4.3 mmHg and an urinary albumin excretion (UAE) of 49.86 ± 24.77 mg/24h as compared to normal Lewis rats. Female MWF animals showed somewhat lower systolic blood pressure values and normal albumin excretion rates compared to age matched male MWF rats. Moreover, MWF rats exhibit a significant number of surface glomeruli with and without direct renal surface contact in the cortex corticis region of the kidney.

MWF rats are resistant to salt loading when fed a diet containing 4% NaCl. In contrast, after high NaCl treatment (8% NaCl) SBP was significantly higher in both male and female MWF compared to MWF under normal diet. UAE was also significantly higher in male and female MWF animals after high NaCl excess compared to normal diet.

The results of the cosegregation and linkage analyses revealed that hypertension, increased urinary albumin excretion, and the presence of surface glomeruli are influenced by independent genetic loci, determined by a set of recessive genes.

Total genome scan analysis identified four Quantitative Trait Loci (QTL) on rat chromosomes 1, 6, 12, and 17, respectively, linked to urinary albumin excretion. Further analysis showed that homozygosity at least at three QTL was necessary to achieve an elevation of mean urinary albumin excretion levels above 10 mg/24h in adult backcross animals.

Moreover, linkage analysis indicated three independent blood pressure QTL on rat chromosome 1, 4, and 5, respectively. Independent loci influence the presence of superficial glomeruli without surface contact on the X-chromosome and with surface contact on chromosome 1 and 13.

We performed comparative gene expression analysis by a PCR-based cDNA subtraction method and by microarray-technique and identified differentially expressed mRNAs in the kidneys of MWF rats and the normotensive salt-resistant Lewis reference strain. Several candidate genes could be detected and are currently investigated.

The identification of genetic mechanisms leading to albuminuria and proteinuria in hypertension in the MWF model may provide new insights into the pathogenesis of similar conditions in human disease.