

## 4. Diskussion

Für die Untersuchung der genetischen Faktoren, die der essentiellen Hypertonie und assoziierten Endorganschäden wie der progressiven Nierenerkrankung zugrunde liegen, haben sich verschiedene Tiermodelle als geeignet erwiesen. Die Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte stellt aufgrund ihrer charakteristischen Merkmalsausprägungen wie der spontanen Entwicklung einer arteriellen Hypertonie, einer frühzeitig einsetzenden Albuminurie und damit einhergehenden sekundären strukturellen Veränderungen in der Niere ein aus klinischer Sicht interessantes Modell zur Erforschung der Pathogenese von Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen dar.

In Kosegregations- und Kopplungsanalysen mit Backcross-Populationen der MWF-Ratte und der normotensiven Lewis-Ratte (Schulz et al., 2002) sowie der spontan hypertensiven (SHR)-Ratte als kontrastierenden Stamm (Schulz et al., 2003) wurde der polygenetische Ursprung des Hypertonus, der Proteinurie und der Albuminurie der MWF-Ratte nachgewiesen. Merkmale, wie beispielsweise der Blutdruck oder die Albuminausscheidung im Urin, werden aufgrund ihrer kontinuierlichen Verteilung von niedrigen zu hohen Werten auch als quantitative Merkmale bezeichnet, deren natürliche Variation durch Umwelt- oder genetische Faktoren oder durch ein Wechselspiel aus beiden Faktoren verursacht wird. Der genetische Ursprung der quantitativen Merkmale ist oft polygen, d.h. der Phänotyp beruht auf kumulativen Effekten mehrerer Gen-Loci. Diese Loci, die einen Einfluss auf ein quantitatives Merkmal besitzen, werden als Quantitative Trait Loci (QTL) bezeichnet, und beschreiben chromosomale Regionen, die wahrscheinlich ein oder mehrere das Merkmal beeinflussende Gene beinhalten (Rapp, 2000).

Für die MWF-Ratte konnten in den oben genannten Kosegregations- und Kopplungsanalysen insgesamt 11 verschiedene QTL für die Albuminurie identifiziert werden, die einen jeweils unterschiedlichen Einfluss auf das Ausmaß der Albuminausscheidung haben. In der Kopplungsanalyse der MWF x SHR-Backcross-Population erklärten vier Albuminurie-QTL mit signifikanter Kopplung auf den Chromosomen 1, 6, 8 und 9 der MWF-Ratte 50 % der absoluten Varianz der Albuminurie (Schulz et al., 2003). Die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung zwischen dem Gen-Locus und dem quantitativen Merkmal wird über den LOD-Score (logarithm of the odds) berechnet, wobei nach Lander & Kruglyak (1995) in einer Backcross-Population bei einem LOD-Score  $\geq 3,3$  ( $p < 0,0001$ ) eine signifikante Kopplung und bei einem LOD-Score  $\geq 1,9$  ( $p < 0,0034$ ) eine wahrscheinliche Kopplung besteht.

Von besonderer Bedeutung erschien der QTL auf Chromosom 6 (RNO6), da er eine signifikante Kopplung der Albuminurie schon bei jungen Tieren in der 8. Lebenswoche zeigte (LOD 4,3) mit einer altersabhängigen Zunahme der LOD-Scores auf 7,8 in der 14. Woche und 10,1 in der 24. Woche in Zusammenhang mit einem starken phänotypischen Effekt bei Homozygotie für

das MWF-Allel im QTL-Bereich. Die gleiche Region wurde in der zuvor gezüchteten Backcross-Population aus MWF- und normotensiven Lewis-Ratten detektiert, mit einem ähnlichen, wenngleich schwächeren statistischen (LOD 1,8) und phänotypischen Effekt auf die frühzeitige Entwicklung der Albuminurie im Alter von 8 Wochen (Schulz et al., 2002). Die Kollokalisierung beider QTL aus verschiedenen Backcross-Populationen der MWF-Ratte sowie die überlappende Lage eines in einer Backcross-Population aus salzsensitiven Dahl- (Dahl/SS/Jr) und SHR-Ratten identifizierten Albuminurie-QTL (Poyan Mehr et al., 2003; Garrett et al., 2003) unterstrichen die potentielle Bedeutung von RNO6. Ein weiterer interessanter Aspekt des von Schulz et al. (2003) identifizierten RNO6 war neben der Kopplung mit erhöhten Albuminuriewerten eine Kopplung mit einer gesteigerten renalen interstitiellen Fibrose bei ausgewachsenen Tieren in der 24. Woche (LOD 2,4). Eine Homozygotie für das MWF-Allel im QTL-Bereich auf Chromosom 6 führte zu einem Anstieg von 15,8 % der renalen interstitiellen Fibrose im Vergleich zu Tieren mit Heterozygotie für das MWF- und SHR-Allel in der Region von RNO6.

Um den Einfluss und die Relevanz von RNO6 experimentell zu überprüfen und die beteiligten Gene zu identifizieren, wurde der konsome Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> gezüchtet, bei dem das gesamte Chromosom 6 der SHR-Ratte in den isogenetischen Hintergrund der MWF-Ratte mit Hilfe eines Marker-unterstützten Selektionsprotokolls transferiert wurde. Analog zu der zur Identifizierung des RNO6 führenden Kosegregations- und Kopplungsanalyse der Backcross-Population aus MWF- und SHR-Ratten, wurde für die Zucht des konsomen Stammes die SHR-Ratte als kontrastierender Referenzstamm ausgewählt. Trotz des spontanen Hypertonus der SHR-Ratte weist sie histologisch eine im Wesentlichen gesunde Nierenstruktur auf (Karlsen et al., 1997) und zeigt nur eine geringe und langsame Progression von vergleichsweise milden hypertensiven Nierenschädigungen im hohen Lebensalter (Bakoush et al., 2004; Feld et al., 1977).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die genetische Reinheit des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> mit Hilfe von 237 Mikrosatellitenmarkern systematisch überprüft und bestätigt, und auf der Grundlage dieser genetischen Analyse wurden Tiere für die zu definierende Erhaltungszucht ausgewählt, die frei von spontan auftretenden Mutationen waren.

Bei der anschließenden mit den Parentaltierstämmen vergleichenden phänotypischen Charakterisierung des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> konnte gezeigt werden, dass der genetische Austausch von RNO6 einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung und Progression der Nierenerkrankung bei der MWF-Ratte hat.

Aufgrund der bei den Parentaltieren vorhandenen sexuellen Dimorphismen und der dadurch bedingten stärkeren Ausprägung der Phänotypen bei männlichen MWF- und SHR-Ratten, lag der Schwerpunkt der Untersuchungen analog zu den meisten Kosegregations- und

Interventionsstudien mit diesen Rattenstämmen (Schulz et al., 2003; Siegel et al., 2004; Iordache et al., 1994; Macconi et al., 2000; Garrett et al., 2003) bei der umfassenden Phänotypisierung der männlichen Tiere. Die in der Verlaufsstudie zur Untersuchung der altersabhängigen Entwicklung der Albuminurie erhobenen Daten der Parentaltiermännchen entsprachen den aus der Literatur bekannten Werten für die Albuminausscheidung der männlichen MWF- und SHR-Ratten (Schulz et al., 2003; Poyan Mehr et al., 2003; Feld et al., 1977; Garrett et al., 2006; Hackbarth et al., 1991). Die SHR-Männchen zeigten bis zur 12. Woche Albuminausscheidungen im physiologischen Bereich von bis zu 1 mg/24h, die auf leicht erhöhte Werte von  $2,32 \pm 1,07$  mg/24h in der 24. Woche anstiegen. Im Gegensatz dazu wiesen die MWF-Männchen schon in der 8. Woche eine deutliche Albuminurie mit Werten von  $18,14 \pm 8,39$  mg/24h auf, die im weiteren Verlauf erheblich zunahm und zwischen der 14. und 18. Woche Werte von über 150 mg/24h erreichte, die dem nephrotischen Bereich bei Ratten entsprechen und mit der starken Proteinurie von über 3 – 3,5 g/24h beim nephrotischen Syndrom des Menschen zu vergleichen sind (van Goor et al., 1993; Schachter et al., 2005). Die Albuminwerte der MWF-Männchen nahmen mit steigendem Alter nochmals um mehr als das Doppelte zu, so dass zum Endpunkt dieser Verlaufsbeobachtung in der 32. Woche Werte von  $354,61 \pm 112,92$  mg/24h als Ausdruck einer massiven Albuminurie und Proteinurie gemessen wurden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Entwöhnung vom Muttertier, in der 4. Woche, die MWF-Männchen noch eine Albuminausscheidung im physiologischen Bereich von unter 1 mg/24h aufwiesen. In früheren Charakterisierungen der MWF-Ratte wurde die Manifestation der Albuminurie bei den MWF-Männchen im Alter von 6 Wochen, dem Untersuchungsbeginn der Studie, nachgewiesen (Schulz, Dissertation 2002). Der Zeitpunkt der Entwicklung der Albuminurie bei der MWF-Ratte ist somit zwischen der 4. und 6. Woche einzuordnen.

Diese frühzeitige Manifestation der Albuminurie bei der MWF-Ratte wurde durch die Übertragung des Chromosoms 6 von der SHR-Ratte in den genetischen Hintergrund der MWF-Ratte im konsomen Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> vollständig supprimiert. Mit Werten von unter 1 mg/24h unterschieden sich die MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen hinsichtlich der Albuminausscheidung nicht von den Männchen des SHR-Stammes. Bei einem nachfolgenden Vergleich zwischen den MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen und dem kontrastierenden SHR-Stamm mit niedrigen Albuminuriewerten zeigte sich ein kontinuierlicher moderater Anstieg der Albuminausscheidung bei den MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen, der in der 18. Woche signifikant wurde ( $4,16 \pm 3,58$  vs.  $1,40 \pm 0,73$  mg/24h,  $p < 0,05$ ). Es ließ sich somit nachweisen, dass, verglichen mit dem MWF-Stamm, die Entwicklung von erhöhten Albuminuriewerten im konsomen Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> signifikant verzögert und in ihrer Ausprägung deutlich vermindert war.

Einen interessanten Einblick in die der frühzeitigen Entwicklung der Albuminurie zugrunde liegende genetische Konstellation von RNO6 ergaben die Befunde der Albuminausscheidung bei der aus MWF- und MWF-6<sup>SHR</sup>-Tieren gezüchteten F1-Generation. Diese F1-Tiere weisen einen heterozygoten Allelstatus von RNO6 auf, d.h. sie tragen ein SHR- und ein MWF-Allel von Chromosom 6 bei einem für das MWF-Allel homozygoten genetischen Hintergrund. Im Alter von 8 Wochen entwickelten die F1-Männchen im Vergleich zu den Normalwerten von MWF-6<sup>SHR</sup>- und SHR-Männchen mit  $5,74 \pm 6,64$  mg/24h signifikant erhöhte Albuminuriewerte ( $p < 0,05$ ), welche ungefähr ein Drittel so hoch waren, wie die Albuminuriewerte der MWF-Männchen ( $18,14 \pm 8,39$  mg/24h) ( $p < 0,0001$ ). Diese Ergebnisse zeigen eine Art „Gen-Dosis-Effekt“ auf, da ein SHR-Allel bereits den Anstieg der Albuminurie vermindert, während der Einfluss von zwei SHR-Allelen notwendig ist, um die Entwicklung der frühzeitigen Manifestation der Albuminurie vollständig zu unterdrücken, wie dies mit Hilfe des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> bestätigt werden konnte.

Zur Klärung der Frage, inwieweit die Höhe des Blutdruckes der drei Stämme und die Entwicklung und Progression der Nierenerkrankung einander bedingen, wurden in der 14. und 24. Woche bei allen Tieren die systolischen Blutdruckwerte mit der Tailcuff-Methode nicht-invasiv bestimmt. Im Vergleich zu den Ergebnissen der in der 14. Woche durchgeführten Blutdruckmessung der Parentaltiere aus der Kosegregationsstudie (Schulz et al., 2003) wurden innerhalb dieser Arbeit niedrigere Blutdruckwerte für die MWF-Ratten und höhere Werte für die SHR-Ratten bestimmt, die damit jedoch in Übereinstimmung mit publizierten Daten anderer MWF- und SHR-Kolonien stehen (Fassi et al., 1998; Garrett et al., 2006; Hackbarth et al., 1991; Skov et al., 1994). Die in der 24. Woche erhobenen Blutdruckwerte der SHR-Ratten korrelierten mit bekannten Daten (Garrett et al., 2003; Yamori, 1994), wobei der in der Literatur von Remuzzi et al. (1990) beschriebene altersabhängige Blutdruckanstieg der MWF-Männchen um bis zu 30 mmHg in dieser Arbeit zum Zeitpunkt der 24. Woche nicht gezeigt werden konnte. Die Daten korrelieren eher mit neueren Untersuchungen des Arbeitskreises von Remuzzi, die erst einen späteren Anstieg des Blutdruckes zur 40. Woche dokumentieren (Macconi et al., 2006). Die beschriebenen Messwertunterschiede lassen sich auf saisonale Unterschiede im Blutdruckverhalten, einen unterschiedlichen Gewöhnungsgrad der Tiere an die Meßmethode, geringfügig veränderte Haltungsbedingungen der Ratten sowie eventuelle geringfügige genetische Unterschiede zwischen den jeweiligen Kolonien eines Stammes, im Sinne eines Gendrifts, zurückführen (Lindpaintner et al., 1992; Rapp, 2000).

Der systolische Blutdruck der SHR-Männchen in der 14. Woche war mit  $177,49 \pm 7,21$  mmHg signifikant erhöht gegenüber den Werten der MWF-6<sup>SHR</sup>- ( $151,05 \pm 8,74$  mmHg) und MWF-Männchen ( $146,02 \pm 4,52$  mmHg), die sich nicht signifikant voneinander unterschieden. Ein im Vergleich zur 14. Woche signifikanter Anstieg der Blutdruckwerte bei adulten Tieren in der 24.

Woche wurde nicht beobachtet, aber der Unterschied der Blutdruckwerte zwischen den MWF-6<sup>SHR</sup>- und MWF-Männchen wurde in der 24. Woche signifikant ( $151,00 \pm 6,76$  vs.  $145,13 \pm 4,71$  mmHg,  $p=0,037$ ). Ob dieser Unterschied Messungenauigkeiten der Tailcuff-Methode geschuldet ist, oder ob ein tatsächlich unabhängiger Blutdruckeffekt durch den Austausch des Chromosoms 6 in Erscheinung tritt, wird in weiteren Untersuchungen zu überprüfen sein. Möglich wäre, dass ein in der ursprünglichen Kopplungsanalyse (Schulz et al., 2003) nicht identifizierter blutdrucksteigernder QTL auf Chromosom 6 der SHR-Ratte den Blutdruck des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> im Vergleich zur MWF-Ratte erhöhen lässt. Interessanterweise wurde in Backcross-Populationen aus salzsensitiven Dahl- und SHR-Ratten ein nicht mit dem beschriebenen Albuminurie-QTL überlappender zweiter QTL auf Chromosom 6 identifiziert, bei dem das SHR-Allel mit einem blutdruckerhöhenden Effekt kosegregiert (Garrett et al., 2003; Siegel et al., 2004). In der Kosegregationsanalyse von Siegel et al. (2004) war dieser QTL mit einem LOD-Score von 3,32 für 7,1 % der Blutdruck-Gesamtvarianz verantwortlich.

Als wichtiges Ergebnis der vergleichenden Blutdruckuntersuchungen dieser Arbeit ist herauszustellen, dass die gegenüber den MWF-Männchen verbesserte renale Funktion des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> nicht auf den Einfluss von veränderten Blutdruckeffekten zurückzuführen ist. Der im Vergleich zu den MWF-Männchen sowohl in der 14. Woche höhere und in der 24. Woche signifikant erhöhte systolische Blutdruck der MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen stellt dagegen für sich allein betrachtet eher ein Risiko für die Manifestation und Progression von hypertoniebedingten Endorganschäden dar (Carretero & Oparil, 2000; Cutler, 1996), und macht zusätzlich deutlich, dass RNO6 mindestens ein Gen mit einem entscheidenden und vom Blutdruck vermutlich unabhängigen Einfluss auf die Entwicklung der progressiven Nierenerkrankung enthalten muss.

Die beobachteten signifikanten Unterschiede der absoluten und relativen Herzgewichte zwischen den drei Stämmen in der 24. Woche spiegelten deutlich die unterschiedlichen systolischen Blutdruckwerte der SHR, MWF-6<sup>SHR</sup>- und MWF-Männchen wider. Bei nicht signifikant unterschiedlichen Körpergewichten der einzelnen Stämme wiesen die SHR-Männchen im Vergleich zu den MWF-6<sup>SHR</sup>- und den MWF-Männchen signifikant erhöhte Werte ( $p < 0,0001$ ) für das absolute Herzgewicht, für das zum Körpergewicht ins Verhältnis gesetzte relative Herzgewicht und für das relative linksventrikuläre Gewicht auf, die als Parameter für eine kardiale Hypertrophie anzusehen sind. Die gemessenen Werte der MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen waren erhöht verglichen mit den Werten der MWF-Männchen, wobei nur der Unterschied beim absoluten ( $p=0,0004$ ) und relativen Herzgewicht ( $p=0,012$ ) signifikant war, nicht jedoch beim relativen linksventrikulären Gewicht. Die Daten lassen den Schluss zu, dass in Korrelation mit einem signifikant erhöhten systolischen Blutdruck die SHR-Männchen Zeichen einer hypertoniebedingten Herzhypertrophie zeigen, die in Ansätzen auch bei den MWF-6<sup>SHR</sup>-

Männchen in Korrelation zu dem, verglichen mit den MWF-Männchen, höheren Blutdruck zu beobachten ist.

Zur Beurteilung von Organschädigungen wurden neben der Untersuchung von Herzhypertrophie-Parametern auch die absoluten und relativen, d.h. zum Körpergewicht ins Verhältnis gesetzten, Nierengewichte in der 24. Woche ermittelt. Die MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen wiesen mittlere Werte für das absolute und relative Nierengewicht auf, wobei die Unterschiede zu den niedrigeren Werten der MWF-Männchen und zu den höheren Werten der SHR-Männchen nicht signifikant waren. Im Gegensatz dazu waren die absoluten und relativen Nierengewichte der MWF-Männchen im Vergleich zu den SHR-Männchen signifikant erniedrigt, und stimmten damit mit bereits publizierten Daten überein (Schulz et al., 2003). Inwieweit diese Reduktion der Nierengewichte, mit der, verglichen mit normotensiven Referenzstämmen, um bis zu 50 % reduzierten Nephronanzahl der MWF-Ratten (Kaufmann & Hackbarth, 1990; Fassi et al., 1998) im Vergleich zu der nur 14 %igen Reduktion der Nephrone bei SHR-Ratten (Skov et al., 1994) in Zusammenhang steht, oder als Ausdruck der progressiven Nierenerkrankung der MWF-Ratten mit fibrotisch-sklerosierenden Veränderungen zu interpretieren ist, bleibt in weiterführenden Untersuchungen zu klären.

Als Parameter für die Schwere der Nierenschädigung wurden die auch in der Klinik zur Einschätzung des Krankheitsbildes relevanten Werte des Harnstoffes und des Kreatinins im Serum sowie die Kreatininclearance bestimmt. Bei der Interpretation der Kreatininwerte der Ratten ist zu beachten, dass ähnlich wie beim Menschen das Kreatinin von Faktoren wie Alter, Geschlecht und Körpergewicht abhängt, und nicht nur glomerulär filtriert, sondern auch zu nicht unerheblichen Anteilen tubulär sezerniert wird und somit nur bedingt als Parameter für die glomeruläre Filtrationsleistung aussagekräftig ist (Cockcroft & Gault, 1976; Levey et al., 1999; Toto, 1995). Da bei einer Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) das Kreatinin verstärkt tubulär sezerniert wird, werden erhöhte Serumkreatininspiegel sowie eine verminderte Kreatininclearance erst bei einer fortgeschrittenen GFR-Abnahme detektierbar. Aus diesem Grund konnten in der 24. Woche hinsichtlich des Serumkreatinins und der Kreatininclearance auch keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden, jedoch reflektierte der Retentionsparameter Harnstoff im Serum die Nierenfunktion der drei Stämme. Die MWF-Männchen wiesen mit  $9,39 \pm 0,79$  mmol/l signifikant erhöhte Harnstoffwerte ( $p < 0,0001$ ) im Vergleich zu den MWF-6<sup>SHR</sup>- und SHR-Männchen ( $7,50 \pm 0,74$  bzw.  $7,07 \pm 0,39$  mmol/l) auf, deren Werte sich nicht signifikant voneinander unterschieden.

In der Untersuchung einer Subgruppe von MWF-6<sup>SHR</sup>- und MWF-Männchen in der 32. Woche zeigten die MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen keinen signifikanten Anstieg von Harnstoff im Serum, wohingegen die signifikant erhöhten Werte der MWF-Männchen weiterhin nachzuweisen waren ( $7,39 \pm 1,51$  vs.  $10,72 \pm 1,56$  mmol/l,  $p = 0,0004$ ). Erstmals sichtbar wurden allerdings signifikante

Unterschiede der Kreatininwerte. Die MWF-Männchen wiesen im Vergleich zu den unveränderten Werten der MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen signifikant erhöhte Serumkreatininwerte ( $41,2 \pm 2,3$  vs.  $37,5 \pm 3,2$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $p=0,006$ ) sowie eine signifikant erniedrigte Kreatininclearance ( $0,46 \pm 0,06$  vs.  $0,59 \pm 0,11$   $\text{ml/min} \cdot 100\text{g}$ ,  $p=0,01$ ) als Ausdruck einer hochgradig eingeschränkten GFR auf.

Zusätzlich zu der signifikant verbesserten renalen Funktion waren die MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen im Vergleich zu den MWF-Männchen durch einen gebesserten Fettstoffwechsel gekennzeichnet. Die MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen wiesen mit den SHR-Männchen vergleichbare Werte für LDL, HDL und Gesamtcholesterin auf, die signifikant niedriger waren, als die deutlich erhöhten Cholesterinwerte der MWF-Männchen. In der 24. Woche waren die Triglyceridwerte der MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen ( $1,23 \pm 0,30$   $\text{mmol/l}$ ) noch vergleichbar mit denen der MWF-Männchen ( $1,08 \pm 0,37$   $\text{mmol/l}$ ) und signifikant erhöht verglichen mit den Werten der SHR-Männchen ( $0,70 \pm 0,12$   $\text{mmol/l}$ ). Bei unverändert gebliebenen Werten der MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen ( $1,19 \pm 0,38$   $\text{mmol/l}$ ), zeigten die MWF-Männchen in der 32. Woche mit Triglyceridwerten von  $2,44 \pm 0,72$   $\text{mmol/l}$  und signifikant erhöhten Cholesterinwerten die typischen Zeichen einer Dyslipidämie bei hochgradig eingeschränkter Nierenfunktion (Varizi, 2006). Sowohl bei niereninsuffizienten Patienten als auch beim Rattentiermodell mit Nierenfunktionseinschränkung ist die Dyslipidämie gekennzeichnet durch eine veränderte Zusammensetzung der Plasma-Lipoproteine und eine gestörte Funktion von Schlüsselenzymen des Lipidstoffwechsels. In der Folge resultieren daraus erhöhte Plasmakonzentration von Triglyceriden, eine Akkumulation von atherogenen IDL-Partikeln, eine gestörte Umwandlung von Cholesterinester-armen HDL-3- zu Cholesterinester-reichen, kardioprotektiven HDL-2-Partikeln und bei starker Proteinurie eine Erhöhung der Gesamtcholesterinwerte und der Cholesterinkonzentration der LDL-Partikel. Während sich leichtgradige Veränderungen des Lipidstoffwechsels schon bei einer beginnenden Nierenfunktionseinschränkung nachweisen lassen, stellt das Vollbild der Dyslipidämie, die beim Menschen neben der massiven Proteinurie das nephrotische Syndrom kennzeichnet, einen bedeutsamen kardiovaskulären Risikofaktor vor allem auch bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz dar (Prichard, 2003; Seliger et al., 2002; Varizi et al., 2003; Varizi, 2006).

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass der Austausch von RNO6 im konsomen Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> zu einer signifikanten Verzögerung der sich bei den MWF-Männchen frühzeitig entwickelnden Albuminurie führte, und eine altersabhängige massive Albuminurie im nephrotischen Bereich mit Nierenfunktionsverlust eindeutig supprimiert wurde, war der Einfluss auf strukturelle Veränderungen der Niere zu überprüfen. Die Analysen der histologischen Untersuchungen in der 24. Woche ergaben für die MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen im Vergleich zu den

MWF-Männchen eine signifikante Reduktion der renalen interstitiellen Fibrose (RIF), des Glomeruloskleroseindex (GSI) und des Index für tubulointerstitielle Schädigungen (TI). Das Ausmaß der tubulointerstitiellen Schädigungen der MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen lag im Bereich der Werte der SHR-Männchen, während die SHR-Männchen die signifikant niedrigsten Werte für den GSI und die RIF aufwiesen.

Bei der Auswertung der differentiellen Genexpressionsanalyse mittels Real-Time-PCR zeigte sich eine im Vergleich zu den SHR-Männchen signifikant erhöhte Kollagen III mRNA-Expression im Nierengewebe der MWF-Männchen, die bei den MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen vollständig normalisiert war und sich nicht von den Werten der SHR-Männchen unterschied. Kollagen III ist als wesentlicher Bestandteil retikulärer Bindegewebsfasern an der Strukturhaltung vieler Organe sowie in der Lamina fibroreticularis am Aufbau der Basalmembran beteiligt. Die Lamina fibroreticularis fehlt jedoch bei der Basalmembran des Glomerulus, die nur aus der Lamina rara externa, - densa und - rara interna besteht, so dass Kollagen III in der Niere vor allem als Bestandteil des normalen Stützgewebes vorkommt, welches bei fibrotischen Umbauvorgängen vermehrt gebildet wird. Die Normalisierung der Kollagen III mRNA-Expression in Verbindung mit der histologisch nachweisbaren signifikanten Reduktion der renalen interstitiellen Fibrose der MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen im Vergleich zu den MWF-Männchen bestätigt den im Bereich von RNO6 identifizierten QTL für die renale interstitielle Fibrose (Schulz et al., 2003).

Interessanterweise wurde bei den konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen auch eine Abnahme der Glomerulosklerose festgestellt, obwohl in beiden Kopplungsanalysen mit MWF-Ratten kein QTL für den GSI detektiert werden konnte (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Garrett et al. (2003) haben in ihrer Kosegregations- und Kopplungsanalyse der Backcross-Population aus Dahl/SS/Jr- und SHR-Ratten einen in dem Bereich von RNO6 liegenden QTL mit wahrscheinlicher Signifikanz für strukturelle Nierenveränderungen, sog. kidney lesion grades (KLG) identifiziert, wobei das Dahl/SS/Jr-Allel mit verstärkt ausgeprägten glomerulosklerotischen und regenerativen tubulären Schädigungen kosegregiert. Es ist möglich, dass dieser KLG-QTL auch für die Nierenschädigung der MWF-Ratte von Relevanz ist und in der Kopplungsanalyse aufgrund des unterschiedlichen genetischen Hintergrundes oder aus statistischen Gründen nicht identifiziert werden konnte, wie auch Garrett et al. (2006) in einer späteren analog aufgebauten Studie den KLG-QTL auf Chromosom 6 unter einer Hochsalzdiät der Tiere nicht mehr nachweisen konnten.

In der Kopplungsanalyse der MWF x SHR-Backcross-Population wurden zwei weitere QTL im Bereich von RNO6 identifiziert, bei denen das MWF-Allel mit einer erhöhten Anzahl oberflächlich gelegener Glomeruli mit sowie ohne Kapselkontakt gekoppelt war (Schulz et al., 2003). Diese subkapsulären Glomeruli im normalerweise glomerulusfreien Cortex cortici der

Niere stellen zusätzliche charakteristische Merkmale der MWF-Ratte dar, die bei der Etablierung des Stammes als Sublinie der Munich-Wistar-Ratte genetisch fixiert wurden (Hackbarth et al., 1980). Mit einem LOD-Score von 7,0 war der QTL auf Chromosom 6 der einzige identifizierte Locus für das Vorhandensein oberflächlicher Glomeruli mit Kapselkontakt, während insgesamt vier QTL für oberflächliche Glomeruli ohne Kapselkontakt gefunden wurden, wobei der QTL auf Chromosom 6 mit einem Wert von 5,6 den höchsten LOD-Score aufwies (Schulz et al., 2003). Die im Rahmen dieser Arbeit in der 24. Woche pro transversalem Nierenschnitt bestimmte Anzahl der oberflächlichen Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt, welche bei den MWF-Männchen gegenüber den SHR-Männchen signifikant erhöht war, stimmt mit den bereits publizierten Daten überein (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003; Remuzzi et al., 1988). Bei den Männchen des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> konnte verglichen mit den MWF-Männchen eine signifikante Reduktion der Anzahl der oberflächlichen Glomeruli mit direktem Kapselkontakt nachgewiesen werden ( $1,6 \pm 1,2$  vs.  $3,8 \pm 2,2$ ,  $p=0,01$ ), während die Anzahl der oberflächlich gelegenen Glomeruli ohne Kapselkontakt nicht signifikant verändert war ( $15,2 \pm 3,1$  vs.  $16,7 \pm 3,1$ ).

Der Einfluss des auf Chromosom 6 in der Kopplungsanalyse detektierten signifikanten QTL für oberflächliche Glomeruli ohne Kapselkontakt (Schulz et al., 2003) konnte bisher - mit Hilfe des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> - nicht bestätigt werden. Die Ursache dafür ist sicherlich, trotz des im Vergleich zu den anderen 3 QTL relativ hohen LOD-Scores von RNO6, in dem diesem Merkmal zugrunde liegenden vielfältigen Geninteraktionen zu sehen. Neben den vier in der MWF x SHR-Backcross-Population auf Chromosom 2, 6, 7 und 9 identifizierten QTL für oberflächliche Glomeruli ohne Kapselkontakt wurden zuvor in der MWF x Lew-Backcross-Population ein QTL auf dem X-Chromosom für oberflächliche Glomeruli ohne Kapselkontakt sowie zwei QTL auf Chromosom 1 und 13 für oberflächliche Glomeruli mit Kapselkontakt detektiert (Schulz et al., 2002). Subkapsuläre Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt scheinen somit zum einen über jeweils unterschiedliche genetische Loci determiniert zu werden und zum anderen konnte die Hypothese, dass der QTL auf Chromosom 6 für oberflächliche Glomeruli ohne Kapselkontakt den größten Einfluss auf das Merkmal hat, da er den höchsten LOD-Score aufwies, mit den Ergebnissen der Untersuchungen des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> vorerst nicht bekräftigt werden. Bislang nicht bekannte Geninteraktionen könnten jedoch die Ursache für den im konsomen Stamm nicht nachzuweisenden Effekt sein, so dass ein Einfluss von RNO6 auf die Anzahl der subkapsulären Glomeruli ohne Kapselkontakt nicht ausgeschlossen werden kann.

Ein entscheidender Einfluss des QTL für oberflächliche Glomeruli mit Kapselkontakt auf Chromosom 6 konnte durch die signifikant reduzierte Anzahl dieser subkapsulären Glomeruli im konsomen Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> dagegen eindeutig bestätigt werden. Aufgrund der Kolo-kalisation des Albuminurie-QTL mit dem QTL für oberflächliche Glomeruli mit direktem Kapselkontakt auf

Chromosom 6 wäre ein Kandidatengen auf RNO6 mit einem Effekt auf beide Phänotypen denkbar. Mit höherer Wahrscheinlichkeit liegen den beiden Phänotypen voneinander verschiedene genetische Ursachen zugrunde. Remuzzi et al. (1988) haben gezeigt, dass MWF-Weibchen bei einer deutlich niedrigeren Proteinausscheidung eine im Vergleich zu den MWF-Männchen verdoppelte Anzahl der oberflächlichen Glomeruli mit Kapselkontakt ausweisen, und sind daher zu dem Schluss gekommen, dass die erhöhte Proteinausscheidung der MWF-Männchen nicht mit einer erhöhten Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit Kapselkontakt in Verbindung steht. Ob subkapsuläre Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt, die durch postnatale Entwicklungsstörungen bei der MWF-Ratte entstehen und zum Teil nicht wie orthotop gelegene Glomeruli vollständig von Tubulusanteilen umgeben sind (Hackbarth et al., 1983; Hackbarth et al., 1991), als veränderte Variante nicht dennoch einen Einfluss auf die Nierenfunktion haben, ist zum momentanen Zeitpunkt durch strukturelle und funktionelle Untersuchungen nicht abschließend geklärt.

Zusätzlich zu der Frage, inwieweit mit Hilfe des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> der wahrscheinliche Einfluss von RNO6 auf die jeweiligen Merkmalsausprägungen der MWF-Ratte nachgewiesen und bestätigt werden kann, waren vor allem unter dem Gesichtspunkt der aufgrund sexueller Dimorphismen beeinflussten Merkmale die phänotypischen Veränderungen der konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen von Interesse. Die den sexuellen Dimorphismen zugrunde liegenden genetischen Ursachen sind bisher weitgehend ungeklärt, ebenso wie die Mechanismen der beim Menschen als „gender-Effekte“ bezeichneten unterschiedlichen Häufigkeiten, Ausprägungen und Altersabhängigkeiten verschiedener Krankheiten bei Frauen und Männern.

Durch die vergleichende Analyse der Phänotypen von SHR-, MWF-6<sup>SHR</sup>- und MWF-Weibchen konnte für den Albuminurie-QTL auf RNO6 gezeigt werden, dass dieser einen geschlechtsunabhängigen Einfluss auf die Entwicklung der Albuminurie der MWF-Ratte hat und somit andere Faktoren die, im Vergleich zu den MWF-Männchen, protektiven Wirkungen bei den MWF-Weibchen vermitteln müssen.

In der Albuminurieverlaufsstudie konnte die in der Literatur beschriebene mildere Verlaufsform der Albuminurie bei den MWF-Weibchen im Vergleich zu den MWF-Männchen bestätigt werden (Kreutz et al., 2000; Schulz, Dissertation 2002; Fassi et al., 1998; Remuzzi et al., 1988; Remuzzi et al., 1992). Im Gegensatz zu den Daten von Remuzzi et al., die einen Anstieg der Gesamtproteinausscheidung im Urin bei den MWF-Weibchen ab der 21. Woche (1988) mit weiterer Progredienz und ersten Anzeichen von Glomerulosklerose in der 35. Woche (1992) beobachteten, wurde in dieser Arbeit bereits in der 8. Woche mit  $5,22 \pm 3,62$  mg/24h die erste

signifikante Erhöhung der Albuminausscheidung bei den MWF-Weibchen nachgewiesen. Der weitere Anstieg der Albuminurie verlief kontinuierlich bis auf Werte um 20 mg/24h in der 24. und 32. Woche. Diese Werte stimmen mit den zu früheren Zeitpunkten in diesem Arbeitskreis erhobenen Daten überein (Schulz, Dissertation 2002), und die Abweichungen zu anderen Publikationen können wie bereits beschrieben auf verschiedene Nachweisverfahren oder auf geringfügige genetische Unterschiede der jeweiligen Rattenkolonien zurückgeführt werden.

Im Gegensatz zu den Albuminuriedaten der MWF-Weibchen wiesen die Weibchen des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> eine signifikante Reduktion der Albuminausscheidung auf. Zum Zeitpunkt der bereits manifestierten Albuminurie der MWF-Weibchen in der 8. Woche zeigten die MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen mit den SHR-Weibchen vergleichbare Albuminausscheidungen im physiologischen Bereich von unter 1 mg/24h. Im weiteren Verlauf stieg die Albuminexkretion der MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen unter inter- und intraindividuellen Schwankungen leicht auf Werte um 1 mg/24h an und war in der 24. Woche signifikant gegenüber den Werten der SHR-Weibchen erhöht ( $1,71 \pm 1,67$  vs.  $0,21 \pm 0,10$  mg/24h,  $p < 0,0001$ ). Verglichen mit den MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen waren die Albuminuriewerte der MWF-Weibchen jedoch deutlich erhöht, in der 24. Woche mit  $24,02 \pm 22,77$  mg/24h um das 14-fache und in der 32. Woche um das 20-fache ( $17,07 \pm 8,61$  vs.  $0,82 \pm 0,37$  mg/24h,  $p < 0,0001$ ), und lagen damit eindeutig im pathologischen Bereich.

Der Vergleich der Albuminuriewerte zwischen den Weibchen und Männchen des jeweiligen Stammes spiegelte die für die SHR- und MWF-Ratten typische, und auch bei den konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Ratten zu beobachtende, geschlechtsabhängige unterschiedliche Ausprägung der Nierenerkrankung, gemessen an der Albuminausscheidung, wider. Zum Endpunkt des Vergleiches aller drei Stämme in der 24. Woche war die Albuminausscheidung der SHR-Weibchen im Vergleich zu den leicht über den physiologischen Bereich angestiegenen Werten der SHR-Männchen signifikant erniedrigt, ebenso wie die Werte der MWF-6<sup>SHR</sup>- und MWF-Weibchen deutlich unterhalb der Werte der jeweiligen Männchen lagen. Die Mechanismen, die zu einer mildereren Verlaufsform der Erkrankung bei den Weibchen im Vergleich zu den Männchen führen, bleiben weiterhin unbekannt. Gezeigt werden konnte durch die Analyse des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> jedoch, dass mindestens ein Faktor auf Chromosom 6 der MWF-Ratte einen pathogenen Einfluss auf die Albuminurie sowohl bei den MWF-Männchen als auch bei den MWF-Weibchen haben muss. Die Eliminierung des einen oder mehrerer der Albuminurie zugrunde liegender Faktoren durch den genetischen Austausch des Chromosoms 6 führt zu einer deutlich zeitlich verzögerten Manifestation und in der Ausprägung drastisch verminderten Albuminurie bei den MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen. Bei den MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen konnte der genaue Zeitpunkt der Manifestation der Albuminurie im Rahmen dieser Verlaufsstudie nicht ermittelt werden, da sich eine Erhöhung der Albuminausscheidung zwar andeutete, aber die zum Teil schwankenden Albuminwerte bis zum letzten Messzeitpunkt in der 32. Woche nicht stabil über dem Grenzwert im pathologischen Bereich lagen. Es ist aber davon

auszugehen, dass die MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen mit höherem Alter eine im Vergleich zu den MWF-Weibchen mildere Form der Albuminurie entwickeln, da der Faktor auf RNO6 Teil der polygenetischen Basis der Albuminurie der MWF-Ratte ist, der zwar einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Albuminurie hat, aber sie nicht alleinig bestimmt, wie dies durch die Charakterisierung der MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen nachgewiesen werden konnte.

Der durch die Untersuchungen der Albuminurie bei männlichen F1-Tieren entdeckte „Gen-Dosis-Effekt“ konnte durch die Analysen weiblicher F1-Tiere bestätigt werden. Die Weibchen der aus MWF- und MWF-6<sup>SHR</sup>-Ratten gezüchteten F1-Generation wiesen in der 8. Woche, analog zu den Verhältnissen bei den Männchen, mit  $2,32 \pm 1,93$  mg/24h intermediäre Albuminwerte im Vergleich zu den signifikant erhöhten Werten der MWF-Weibchen und den Normalwerten der MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen auf. Diese Reduktion der Albuminurie in der F1-Generation auf ca. 32 % der Werte der MWF-Ratte bei den Männchen und auf ca. 44 % bei den Weibchen spricht gegen den nach der Kopplungsanalyse postulierten rein rezessiven Erbgang der Kandidatenregion auf Chromosom 6 der MWF-Ratte (Schulz et al., 2003), da nachgewiesen werden konnte, dass auch bei Vorhandensein von nur einem MWF-Allel von RNO6 in der F1-Generation eine Albuminurie auftritt, während durch die Abwesenheit beider MWF-Allele von RNO6 zum gleichen Zeitpunkt die Albuminurie im konsomen Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> vollständig supprimiert wird. Aufgrund der isogenetischen Hintergründe der (MWF-6<sup>SHR</sup> x MWF)-F1-Generation und des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> lassen sich gezieltere Aussagen zum Vererbungsmodus treffen, als es die Analysen der genetisch heterogenen Backcross-Population zugelassen haben. Dieser neue Befund spricht eher für einen additiven Effekt des MWF-Allels, bei dem sich die Ausprägung der Albuminurie proportional zur Anzahl der MWF-Allele verhält.

Die Blutdruckunabhängigkeit der im Vergleich zu den MWF-Weibchen bei den MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen supprimierten Albuminurie wurde wie bei den Männchen durch Messungen des systolischen Blutdruckes in der 14. und 24. Woche nachgewiesen. Die dabei mittels Tailcuff-Methode erhobenen Daten der Parentaltierweibchen stimmten mit bereits publizierten Blutdruckwerten überein (Fassi et al., 1998; Feld et al., 1981; Remuzzi et al., 1992; Yamori, 1994). Bei fehlendem signifikantem Unterschied der Blutdruckwerte aller drei Stämme zur 24. Woche wiesen in der 14. Woche die SHR-Weibchen mit  $157,6 \pm 6,9$  mmHg signifikant erhöhte Blutdruckwerte im Vergleich zu den MWF-6<sup>SHR</sup>- und MWF-Weibchen auf, die keine signifikant unterschiedlichen Blutdruckwerte zeigten ( $142,8 \pm 7,2$  vs.  $142,5 \pm 7,5$  mmHg).

Der Nachweis, dass die bei den MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen durch Ersetzen des Chromosoms 6 der MWF-Ratte erzielte Reduktion der Albuminurie bei vergleichbaren Blutdruckwerten der MWF-Weibchen eintrat, war von entscheidender Bedeutung, um den suppressiven Einfluss auf die

Albuminausscheidung tatsächlich auf die Elimination von RNO6 zurückführen zu können. In früheren Arbeiten von Kreutz et al. (2000) wurde gezeigt, dass mit einer 8%igen Hochsalzdiät ein signifikanter Anstieg des systolischen Blutdruckes bei der MWF-Ratte provozierbar ist, und dass unter dem angestiegenen Blutdruck die MWF-Ratten eine im Vergleich zur Normaldiät deutlich verstärkte Albuminurie entwickeln. Der unter Normaldiät signifikant niedrigere Blutdruck der MWF-Weibchen im Vergleich zu den MWF-Männchen scheint ein Faktor zu sein, der die Weibchen vor einer stärkeren Ausprägung der Albuminurie schützt, da nachgewiesen werden konnte, dass unter dem Salz-induzierten Blutdruckanstieg sich die Albuminausscheidung der Weibchen auf Werte erhöhte, die vergleichbar waren mit denen der Männchen unter Normaldiät (Kreutz et al., 2000).

Beim geschlechterspezifischen Vergleich der in dieser Studie erhobenen Blutdruckwerte waren erwartungsgemäß signifikant höhere Blutdrücke bei den Männchen der SHR-, MWF-6<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten im Vergleich zu den Weibchen des jeweiligen Stammes in der 14. und 24. Woche zu erkennen.

Interessanterweise spiegelte sich im Gegensatz zu den Männchen die Blutdrucksituation bei den Weibchen nicht direkt in den Herzhypertrophie-Parametern wider. Während sich die Weibchen der drei Stämme nicht signifikant hinsichtlich des Körpergewichtes und des absoluten und relativen Nierengewichtes unterschieden, zeigten die SHR-Weibchen entsprechend ihrer höchsten Blutdruckwerte signifikant erhöhte absolute und relative Herzgewichte sowie ein signifikant erhöhtes linksventrikuläres Gewicht im Vergleich zu den MWF-6<sup>SHR</sup>- und MWF-Weibchen. Die MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen wiesen jedoch im Vergleich zu den MWF-Weibchen etwas höhere Werte für das absolute und relative Herzgewicht auf, ohne eine wie bei den MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen in der 24. Woche stattgefunden signifikante Blutdruckerhöhung im Vergleich zu den MWF-Weibchen. Während der Unterschied beim absoluten und relativen Herzgewicht in der 24. Woche nicht signifikant war, ließ sich in der 32. Woche bei den MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen ein grenzwertig signifikant erhöhtes relatives Herzgewicht verglichen mit den MWF-Weibchen nachweisen ( $2,88 \pm 0,11$  vs.  $2,79 \pm 0,09$  mg/g,  $p=0,05$ ). Aufgrund des grenzwertig signifikanten p-Wertes sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren. Da die im Vergleich zu den MWF-Weibchen erhöhten bis signifikant erhöhten Herzhypertrophieparameter der MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen im Einklang mit den Ergebnissen der MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen stehen, wäre es denkbar, dass mit der Einführung des Chromosoms 6 der SHR-Ratte in den MWF-Stamm neben den bekannten QTL auch ein QTL mit einem vom Blutdruck unabhängigen Einfluss auf die Herzhypertrophie der SHR-Ratte im konsomen Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> in Erscheinung tritt. Mehrere solcher blutdruckunabhängiger QTL mit Einfluss auf das Herzgewicht sind bereits identifiziert worden (Clark et al., 1996; Hamet et al., 1996; Innes et al., 1998). Bei der Kosegregationsanalyse der Backcross-Population aus SHR- und Dahl/SS-/Jr-Ratten von Siegel

et al. (2004) wurde auf dem Chromosom 6 im Bereich des um den Marker D6Rat69 gelegenen QTL für die Blutdrucksteigerung bei der SHR-Ratte (Siegel et al., 2004; Garrett et al., 2003), eine mit einem LOD-Score von 2,65 knapp unterhalb des Signifikanzniveaus liegende Kopplung mit der linksventrikulären Hypertrophie identifiziert, wobei auch bei diesem Locus das SHR-Allel mit der Hypertrophie kosegregiert (Siegel, Dissertation 2004). Ein Einfluss dieses Locus auf die Herzgröße des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> wäre eine mögliche Erklärung für die im Vergleich zum MWF-Stamm überraschend verschiedenen Herzgewichte. In Betracht zu ziehen sind allerdings auch Fehler bei der Präparation der Herzen, die zu den erhöhten bis signifikant erhöhten Hypertrophieparametern bei den MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen geführt haben können. Entsprechende weiterführende Untersuchungen beispielsweise von kongenen Sublinien des MWF-6<sup>SHR</sup>-Stammes könnten zur Klärung der Ergebnisse beitragen.

Ähnlich wie beim Vergleich der Männchen war bei den Weibchen in der 24. und 32. Woche kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Körpergewichtes zwischen den Stämmen zu beobachten. Tendenziell wiesen die MWF-Weibchen die niedrigsten absoluten und relativen Nierengewichte auf, der Unterschied war jedoch im Vergleich zu den SHR- und MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen nicht signifikant. In Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Daten zum MWF-Stamm konnte für die Parentaltiere, aber auch für den neu etablierten konsomen Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> gezeigt werden, dass die Körpergewichte und die absoluten Nieren- und Herzgewichte bei den Weibchen aller drei Rattenstämme signifikant erniedrigt waren im Vergleich zu denen der jeweiligen Männchen (Kreutz et al., 2000; Fassi et al., 1998; Remuzzi et al., 1988).

Nach der Auswertung der Ergebnisse der vergleichenden Phänotypisierung des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Bedeutung der QTL auf dem Chromosom 6 der Ratte hinsichtlich des Einflusses auf die Ausprägung der Albuminurie, auf die Entwicklung der renalen interstitiellen Fibrose und auf die Anzahl der oberflächlichen Glomeruli mit Kapselkontakt der MWF-Ratte durch die Analyse des neuen ingezüchteten konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> bestätigt werden konnte. Der experimentelle Nachweis von RNO6 als entscheidender, geschlechtsunabhängiger Faktor, der sowohl die frühzeitige Entstehung als auch die Progression der Albuminurie der MWF-Ratte maßgeblich beeinflusst, legt den Grundstein für weitere Untersuchungen mit dem Ziel, die genetischen Hintergründe dieses Albuminurie-QTL zu identifizieren.

Die wahrscheinlichste Position eines oder mehrerer für den Phänotyp verantwortlichen Gene(s) befindet sich unter dem Peak-Bereich eines QTL, wobei die exakte Lokalisation nicht genau

vorhergesagt werden kann. Der Bereich, der durch eine LOD-Einheit um den Peak herum beschrieben wird, gibt ungefähr das 95 %ige Konfidenzintervall für die wahrscheinliche Position an, während das 2-LOD-Intervall mit 60-95 % Wahrscheinlichkeit den gesuchten Locus enthält (Rapp, 2000).

Bei der vergleichenden Kartierung des 99-95 %igen Konfidenzintervalls von RNO6 mit dem humanen Genom kartiert dieser Bereich in die Region 14q23.1-14q31.3 des humanen Chromosoms 14 (Schulz et al., 2006). Diese Region enthält 146 beschriebene Gene, von denen 46 auf EST-Daten beruhen und abschließend bestätigt werden müssen. Aufgrund der Größe allein dieses stark eingegrenzten Bereiches des Albuminurie-QTL auf RNO6 und der noch höheren Anzahl von Genen, die sich im 2-LOD-Intervall des QTL befinden, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine valide Aussage darüber getroffen werden, welches Gen bzw. welche Gene innerhalb des QTL-Bereiches von RNO6 die Albuminurie bedingen.

In den kürzlich durchgeführten genomweiten Kopplungsanalysen beim Menschen wurden auf den humanen Chromosomen 5q, 7q, 8q, 12q, 19q, 21q und 22q verschiedene Albuminurie-QTL identifiziert (Fox et al., 2005; Freedman et al., 2003; Krolewski et al., 2006), während die homologe Region des Albuminurie-QTL RNO6 im humanen Genom, 14q23.1-14q31.3, bei diesen Analysen nicht detektiert worden ist. Dies schließt jedoch die potentielle klinische Bedeutung dieses QTL für den Menschen nicht aus. Auch bei dem vereinfachten Modell der QTL-Analyse verschiedener ingezüchteter Rattenstämme hinsichtlich Albuminurie und Bluthochdruck zeigte sich, dass das Auffinden und die Reproduzierbarkeit solcher QTL stark abhängig ist von Faktoren wie dem getesteten Zeitpunkt, der zugrunde liegenden Methode (Stoll et al., 2000), der Salzaufnahme der Tiere (Garrett et al., 2006) und nicht zuletzt von dem genetischen Hintergrund des kontrastierenden Referenzstammes (Schulz et al., 2003). Vor dem Hintergrund der Komplexität des Phänotyps Albuminurie beim Menschen, welcher durch multiple Geninteraktionen und verschiedene Umweltfaktoren in weitaus größerem Umfang beeinflusst wird, stellen genetisch weniger heterogene Tiermodelle zur Identifikation von genetischen Faktoren eine Methode mit erhöhter statistischer Aussagekraft dar (Kreutz & Hübner, 2002). Die größere genetische und phänotypische Heterogenität von komplexen Merkmalen wie der Albuminurie in Humanpopulationen kann aufgespaltet in verschiedene phänotypische Subtypen durch stammspezifisch genetisch unterschiedliche Inzuchtstämme reflektiert werden. In diesem Sinne könnte der Albuminurie-QTL auf dem Chromosom 6 der MWF-Ratte einer genetischen Prädisposition eines spezifischen Subtyps der Albuminurie beim Menschen entsprechen, welche in Kopplungsanalysen humaner Populationen aufgrund der ausgeprägten genetischen Heterogenität bisher nicht identifiziert werden konnte. Nachdem mit Hilfe des konsomen Rattenstammes MWF-6<sup>SHR</sup> die besondere Bedeutung von RNO6 für die Entwicklung der Albuminurie bei der MWF-Ratte nachgewiesen werden konnte, lässt sich der

homologe Bereich auf dem humanen Chromosom 14 als potentielle Kandidatenregion für die Albuminurie beschreiben, die in weiterführenden Untersuchungen basierend auf Polymorphismen von einzelnen Nukleotiden (SNPs) und Haplotypenanalysen näher charakterisiert werden könnte (Marshall, 1999; Wang et al., 1998). Auf der anderen Seite ist durch die Etablierung des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> die Grundlage geschaffen, um ausgehend von der konsomen Rattenlinie durch gezielte Marker-assistierte Kreuzungen so genannte kongene bzw. teilkongene Rattenlinien mit immer kürzeren SHR-Fragmenten des Chromosoms 6 zu züchten, um über die Phänotypisierung dieser kongenen Stämme den relevanten QTL-Bereich weiter eingrenzen zu können.

Ausgehend von einer Vielzahl an Kopplungsanalysen bei der Ratte und den darüber identifizierten QTL für die Albuminurie und Proteinurie beispielsweise der Fawn-hooded-Ratte (FHH) (Brown et al., 1996; Shiozawa et al., 2000), der Buffalo-Ratte (Murayama et al., 1998), der Dahl/SS-/Jr-Ratte (Siegel et al., 2004; Poyan Mehr et al., 2003; Garrett et al., 2003), der MWF-Ratte (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003) und der Sabra-Ratte (Yagil et al., 2006), sind einige konsome oder kongene Rattenstämmen zur Bestätigung und für weitere Untersuchungen der QTL beschrieben worden.

Garrett et al. (2006) konnten mittels kongener Rattenstämmen, bei denen jeweils der gesamte QTL-Bereich ausgetauscht worden war, die in ihrer Dahl/SS-/Jr- x SHR-Backcross-Population detektierten Albuminurie-QTL auf den Chromosomen 2, 6, 9, 11 und 13 bestätigen. Im Gegensatz zum konsomen Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> führte die Elimination des QTL auf dem Chromosom 6 der Dahl/SS-/Jr-Ratte beim kongenen Stamm S.SHR(6) in der 8. Woche nicht zu einer vollständigen Suppression der Albuminurie auf Werte, die denen der SHR-Ratten vergleichbar waren. Verglichen mit den anderen kongenen Stämmen S.SHR(2), S.SHR(9) und S.SHR(13) wies der Stamm S.SHR(6) jedoch die niedrigsten Albuminuriewerte auf, was die Bedeutung des Albuminurie-QTL auf dem Chromosom 6 auch bei der salzsensitiven Dahl-Ratte unterstreicht. Die Albuminurie der salzsensitiven Dahl-Ratte scheint aber stärker als die MWF-Ratte durch die genetischen Interaktionen mehrerer QTL bedingt zu sein, so dass die alleinige Ausschaltung eines QTL nicht zu einer so ausgeprägten Besserung des Krankheitsgeschehens führt.

Mit der Identifizierung von Rab38 als ein Gen, das an der Albuminurie der FHH-Ratte mitbeteiligt ist, haben Rangel-Filho et al. (2005) gezeigt, wie über den Weg der Kopplungsanalysen und der Züchtung kongener Rattenstämmen Krankheitsgene detektiert werden können. Über den kongenen Rattenstamm FHH.BN-Rab38 konnte von insgesamt 5 Albuminurie-QTL aus den Kopplungsanalysen zwischen FHH- und Brown-Norway(BN)-Ratten (Brown et al., 1996; Shiozawa et al., 2000) das Gen des einen QTL auf Chromosom 1 der Ratte (Rf-2) identifiziert werden. Bei der vergleichenden Kartierung wurde eine Übereinstimmung der

homologen humanen Region von Rf-2 auf Chromosom 11 mit einer zuvor von Winn et al. (1999) beschriebenen Kopplung für die Entwicklung von Proteinurie und fokal-segmentaler Glomerulosklerose beim Menschen gefunden. Inwieweit das erste identifizierte Gen, welches an einer Bluthochdruck assoziierten Nierenschädigung im Tiermodell mitbeteiligt ist, auch beim Menschen eine pathogene Rolle spielt, muss in folgenden Studien an Humanpopulationen näher untersucht werden. Aitman et al. (2006) konnten diesen Spezies übergreifenden Zusammenhang für das Fcgr3-Gen als Determinante einer immunologisch vermittelten Glomerulonephritis sowohl bei Wistar Kyoto-Ratten als auch beim Menschen bereits erfolgreich darlegen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass über die Analyse von genetisch verschiedenen Inzuchtstämmen, die als Repräsentanten spezieller Subtypen von komplexen, polygenetisch determinierten Krankheiten des Menschen wie Bluthochdruck und dessen assoziierte Endorganschädigungen betrachtet werden können, die Aufklärung der bisher weitgehend unbekanntenen Mechanismen von Pathogenese und Progression dieser Krankheitsbilder möglich ist. Die MWF-Ratte stellt in diesem Sinne ein viel versprechendes Tiermodell für die Erforschung der Hypertonie assoziierten, proteinurischen Nierenerkrankung dar. Die postulierte besondere Bedeutung des Albuminurie-QTL auf dem Chromosom 6 der MWF-Ratte (Schulz et al., 2003) wurde durch die deutliche Suppression der proteinurischen Nierenschädigung im konsomen Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> untermauert, die unter dem alleinigen Austausch des QTL auf RNO6 bei dem weiterhin bestehendem Einfluss der anderen detektierten Albuminurie-QTL auftrat. Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit wurde bereits mit der Züchtung kongener Rattenstämme zur Eingrenzung des relevanten QTL-Bereiches auf ein chromosomales Intervall von ca. 0,3-0,5 cM begonnen. Die Aufgabe der weiterführenden Untersuchungen wird es sein, diesen im Vergleich zu dem ca. 18 cM umfassenden 1-LOD-Intervall des QTL deutlich verkleinerten chromosomalen Bereich gezielt in Hinsicht auf Kandidatengene z.B. mit Hilfe von differentiellen Genexpressionsuntersuchungen und Funktionsanalysen zu charakterisieren, um die für die Phänotypen verantwortlichen Gene und Mechanismen zu identifizieren.

Mit einem verbesserten Verständnis der Ursachen, die der essentiellen Hypertonie und deren assoziierten Endorganschädigungen zugrunde liegen, werden sich die Möglichkeiten der Früherkennung und der prognostischen Aussagen verbessern und neue, auf die Ursachen gerichtete und dem individuellen Risikoprofil entsprechende Therapien für den Menschen entwickeln lassen.