

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der Nephrogenese und Albuminurie bei der
spontan hypertensiven Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Leonard Alexander Schulte

aus Münster

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	1
Einleitung	3
Zielstellung.....	4
Methodik	5
Ergebnisse	7
Diskussion	13
Literatur	16
Anteilerklärung	19
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	A
Lebenslauf	B
Komplette Publikationsliste	C
Eidesstattliche Versicherung	D
Danksagung	E

Studie 1

Schulte L, Schulz A, Unland J, Schulz H, Hubner N, Schmidt-Ott KM, Kreutz R. MWF rats with spontaneous albuminuria inherit a reduced efficiency of nephron induction during early nephrogenesis in comparison to SHR rats. *J Hypertens.* 2012;30:2031-2038.

Studie 2

Schulz A, Schütten-Faber S, van Es N, Unland J, Schulte L, Kossmehl P, de Heer E, Kreutz R. Induction of albuminuria and kidney damage in SHR by transfer of chromosome 8 from Munich Wistar Frömter rats. *Physiol Genomics.* 2012;44:110-116.

Studie 3

Schulz A, Schütten S, Schulte L, Kossmehl P, Nyengaard JR, Vetter R, Huber M, Kreutz R. Genetic locus on MWF rat chromosome 6 affects kidney damage in response to L-NAME treatment in spontaneously hypertensive rats. *Physiol Genomics.* 2010;42:126-133.

Abstrakt

Die Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte stellt ein interessantes Tiermodell zur Untersuchung der Nephrogenese und hypertensiver Nierenerkrankungen dar. Männliche Tiere weisen im Vergleich zur nierengesunden Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) eine angeborene reduzierte Nephronzahl von 27% auf. Des Weiteren entwickeln männliche MWF-Ratten eine milde spontane systemische Hypertonie, eine progressive Albuminurie und eine Glomerulosklerose. In Vorarbeiten konnte für die Entwicklung einer progressiven Albuminurie eine funktionelle Rolle für wichtige Quantitative Trait Loci (QTL) auf Rattenchromosom (RNO)6 und RNO8 bei der MWF-Ratte nachgewiesen werden. Hierbei wurde durch Transfer von SHR-RNO6 bzw. SHR-RNO8 in den MWF-Hintergrund bei den konsomen Stämmen MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} die Albuminurie deutlich reduziert. Darüber hinaus zeigten diese Studien, dass RNO6, aber nicht RNO8, eine wichtige kausale Rolle bezüglich des angeborenen Nephrondefizits der MWF-Ratte spielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Studie 1 der Zeitpunkt der Fehlentwicklung von MWF-Rattennieren im Vergleich zu SHR-Rattennieren bezüglich des Nephrondefizits bestimmt und mittels Immunfluoreszenz und 3D-Rekonstruktion die Veränderungen während der embryonal-fetalen Entwicklung erfasst. Anschließend wurde der Einfluss von MWF-RNO6 auf die pränatale Nephronentwicklung untersucht. Mittels einer Microarray- und Kandidatengenanalyse wurden literaturbekannte Gene im MWF-Ratenmodell überprüft. SHR-Ratten sind in ihrer Entwicklung stärker als MWF-Ratten bzw. MWF-6^{SHR}-Ratten retardiert, so dass für vergleichende Untersuchungen an embryonalen Nieren SHR-Embryonen eine etwa 12stündige längere Reifungszeit im Mutterleib benötigen. Die Auswertung der Whole-mount Immunfluoreszenz ergab eine tendenzielle Erniedrigung der Glomerulizahl bei MWF-Ratten am Entwicklungstag (E) 15,5 und eine signifikant erhöhte Anzahl an Ureterknospenspitzen verglichen mit SHR-Ratten an E16,0. Nach der Normierung Glomerulizahl pro Anzahl Ureterknospenendungen wurde ersichtlich, dass MWF-Rattennieren signifikant weniger Glomeruli pro einzelner Ureterknospenspitze entwickeln. Demnach besitzt der MWF-Stamm im Vergleich zum SHR-Stamm eine geringere Effizienz der Nephroninduktion. Mittels der dreidimensionalen Rekonstruktion der Ureterknospe wurden keine Verzweigungsanomalien nachgewiesen. Die Grundlage der verminderten Nephroninduktion wurde über ein Microarray-Experiment weiter entschlüsselt. Von 59 literaturbekannten Genen mit Einfluss auf die Nierenmorphogenese zeigte einzig der Hepatocyte Growth Factor (Hgf) auf RNO4 mit einer ungefähr 70% reduzierten mRNA-Expression signifikante Unterschiede bei MWF- und MWF-6^{SHR}-Ratten an E15,5 verglichen mit SHR-Ratten an E16,0. Die Vergleichbarkeit der Hgf-mRNA-Expression bei MWF- und MWF-6^{SHR}-Ratten demonstriert die von RNO6 unabhängige und potentielle Rolle der Hgf-Expression auf die Nephronentwicklung.

In den weiteren Studien 2 und 3 des vorliegenden Dissertationsvorhabens wurde geprüft, ob die unabhängige Einflussnahme von RNO6 bzw. RNO8 der MWF-Ratte im nierengesunden und isolierten SHR-Hintergrund eine Albuminurie unter Normalbedingungen, nach 50%iger Nephronreduktion (unilaterale Nephrektomie) oder unter *N*_ω-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME)-Behandlung bei adulten, konsomen SHR-6^{MWF}- bzw. SHR-8^{MWF}-Tieren induzieren kann. Die Analyse dieser konsomen Ratten schloss Untersuchungen zu strukturellen und funktionellen Nierenschäden, zum arteriellen Blutdruck, zur linksventrikulären Hypertrophie im Vergleich zwischen MWF- und SHR-Ratten sowie die Bestimmung der Gesamt-Glomerulizahl bei SHR-6^{MWF}-Ratten mittels der „Physikal fraktionator“-Technik mit ein. Die Befunde von SHR-6^{MWF}-Ratten, sowohl unter Normalbedingungen als auch nach unilateraler Nephrektomie zeigten, dass eine Albuminurie bei diesem Stamm nicht induziert werden konnte. Im Vergleich mit dem SHR-Stamm liegt beim konsomen SHR-6^{MWF}-Stamm

keine signifikant reduzierte Nephronzahl vor. Allerdings tragen genetische Faktoren auf RNO6 zu einer Entwicklung durch L-NAME induzierte Nierenschädigung und Albuminurie bei. Im Gegensatz hierzu konnte durch den Transfer von MWF-RNO8 in den SHR-Hintergrund zum ersten Mal der pathologische Albuminurie-Phänotyp bei konsomen SHR-8^{MWF}-Ratten unter normalen Bedingungen induziert werden. Der erhöhte Blutdruck der SHR-8^{MWF}-Ratte wird nicht als Ursache der Albuminurie gewertet, da der Blutdruck verglichen mit SHR signifikant niedriger war. Die unabhängige Rolle vom MWF-RNO8 QTL sowohl für Albuminurie als auch für strukturelle Nierenschäden wurde hierüber nachgewiesen.

Abstract

The Munich Wistar Frömter (MWF) rat strain represents a valuable genetic model for the investigation of nephrogenesis and kidney disease. Male MWF rats exhibit an inherited nephron deficit of about 27% compared to spontaneously hypertensive rats (SHR) with low grade albuminuria. Furthermore, male MWF rats develop mild spontaneous arterial hypertension, progressive albuminuria, and glomerulosclerosis. Previous studies demonstrated that the development of albuminuria in MWF rats is influenced by two major quantitative trait loci (QTL) on rat chromosome (RNO)6 and RNO8. Thus, transfer of SHR-RNO6 or SHR-RNO8 into the MWF background protects against the development of albuminuria in the consomic strains MWF-6^{SHR} and MWF-8^{SHR}, respectively. In addition, RNO6, but not RNO8 influences the inherited nephron deficit in MWF rats.

In study 1, the early onset of nephron endowment in MWF rats was analyzed in comparison to SHR by whole-mount immunohistochemistry and three-dimensional reconstruction. Secondly, the influence of SHR-RNO6 in the consomic strain MWF-6^{SHR} on nephron development was investigated. By microarray analysis gene expressions of candidate genes previously implicated in nephron development were evaluated.

The characterisation of early-stage embryonic development of the parental strains demonstrated that SHR animals were developmentally retarded. Thus, the developmental stages of SHR at embryonic day (E)16.0 and of consomic MWF-6^{SHR} rats at E15.5 were defined as stage-matched and selected for studies. The investigation of embryonic glomerular number revealed a trend towards reduced glomerular numbers and showed significantly higher numbers of ureteric bud (UB) tips in MWF rats at E15.5 compared to the stage-matched reference strain SHR at E16.0. When the number of glomeruli per kidney was related to the number of UB tips per kidney a significantly reduced ratio in MWF rats compared to SHR was observed. Thus, the efficiency of nephron induction in the MWF strain appeared to be reduced compared to SHR. The three-dimensional reconstruction of the UB by merged Z-stack channel of FITC staining revealed a similar architecture of the ureteric tree between the parental strains. Subsequently, the underlying mechanisms of reduced nephron induction were analysed by a gene expression analysis experiment. Overall 59 candidate genes involved in nephrogenesis or organized in known pathways for nephron development were selected by a systematic literature search. Only the hepatocyte growth factor (Hgf) on RNO4 showed a significant differential mRNA expression. Compared to the stage-matched SHR strain at E16.0, MWF and MWF-6^{SHR} rats at E15.5 exhibited a reduced Hgf expression of about 70% ($P < 0.004$). The results identified Hgf as a potential candidate for alterations in nephrogenesis. In study 2 and 3 it was tested whether the transfer of RNO6 or RNO8 of the MWF strain into the albuminuria-resistant SHR background induces albuminuria in consomic SHR-6^{MWF} or SHR-8^{MWF} animals either under standard conditions, after unilaterally nephrectomization (Nx), or under N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) treatment. Furthermore, renal structural changes such as glomerulosclerosis and tubulointerstitial damage index, systolic blood pressure and left ventricular hypertrophy of parental and the consomic strains and the total glomerular number per kidney by a physical fractionator technique in consomic SHR-

6^{MWF} rats were analyzed. The results demonstrated that in SHR-6^{MWF} rats albuminuria was not inducible under Sham and unilateral Nx conditions, respectively. Furthermore, the nephron number in SHR-6^{MWF} rats was not significantly reduced compared to SHR. However, the presented results demonstrated that SHR are very susceptible to L-NAME treatment and that this vulnerability is aggravated by introgressing RNO6 from the MWF strain into their genome.

In contrast to SHR-6^{MWF} rats, transfer of RNO8 from MWF into the resistant recipient background of SHR resulted in an induction of albuminuria already under normal conditions. This significant increase of albuminuria in SHR-8^{MWF} rats was not attributable to higher blood pressures, since these animals showed even lower blood pressures compared to SHR. Taken together, the latter study confirmed the independent genetic link between QTL on RNO8 and albuminuria.

Einleitung

Im Jahre 2008 wurden weltweit 63% aller registrierten Todesfälle durch nicht übertragbare Krankheiten verursacht. Davon werden alleine 48% den Herz-Kreislauf-Erkrankungen, darunter die arterielle Hypertonie, zugeschrieben [1]. Eine schwere Hypertonie schädigt das Herz und die Nieren und verstärkt bereits vorhandene kardiovaskuläre und chronische Nierenerkrankungen [2, 3]. Die Pathogenese der essentiellen Hypertonie, welche bei ca. 95% aller Hypertoniker diagnostiziert wird, ist bis heute nicht vollständig entschlüsselt. Faktoren wie die Überaktivität des sympathischen Nervensystems [4] und wie die gesteigerte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems [5-7] sind bekannte und behandelbare Pathomechanismen [8] und interagieren mit der Niere.

Bereits 1988 stellten Brenner et al. die Hypothese auf, dass eine reduzierte Anzahl an Nephronen, die kleinste funktionelle Einheit der Niere, die Manifestation der essentiellen Hypertonie in der allgemeinen Bevölkerung begünstigt [9]. Innerhalb eines Circulus vitiosus führt eine erniedrigte Filtrationsoberfläche, die sowohl durch eine reduzierte Glomerulanzahl als auch durch eine erniedrigte Filtrationsoberfläche pro individuellem Glomerulus gekennzeichnet sein kann, zu einer kompensatorischen Natriumretention. Dadurch entsteht ein Anstieg des Blutdruckes, welcher zu einer Erhöhung des glomerulären Drucks und einer Glomerulosklerose führt [9]. Des Weiteren werden auch funktionelle und strukturelle Nierenschäden mit Albuminurie und Glomerulosklerose als Folge einer Reduktion der Filtrationsoberfläche des angeborenen Nephrondefizits genannt [9, 10].

Im Verlauf der Gestation entwickeln sich drei unterschiedliche Nierenanlagen beim Ungeborenen. Primär bildet sich der Pronephros am zervikalen Anteil des intermediären Mesoderms und sekundär entsteht der Mesonephros, bei dem erste tubuläre und primitive renale Strukturen gebildet werden. Beide Anlagen sind von temporärer Dauer und degenerieren [11]. In der bleibenden Niere entspringt die Ureterknospe anfänglich dem mesonephrischen Gang (Urnierengang, Wolff'schen Gang) und wächst primär durch Verzweigungen, um deren Endungen metanephrisches Mesenchym kondensiert [12, 13]. Dieses formt prä-tubuläre Aggregate unterhalb jeder Ureterknospenverzweigung durch induktive Signale [14]. Im Anschluss einer Mesenchymal-Epithelial-Transformation bilden sich einfachste Tubuli, sogenannte renale Vesikel [15]. Nach einer Segmentation entsteht ein nach seiner Form benannter S-shaped body, bestehend aus dem Glomerulus am proximalen Ende und den tubulären Komponenten proximaler und distaler Tubulus. Dieser verbindet sich am distalen Tubulus mit der Ureterknospe, welche sich später selber zum Sammelrohr transformiert [12]. Beim Menschen beginnt die Metanephrogenese ab der 5. und ist in der 34-36. Gestationswoche vollständig abgeschlossen [11, 16]. Im Durchschnitt entwickeln sich knapp eine Millionen Nephrone pro Niere, wobei in der europäischen Bevölkerung eine bis zu 5,9 fache Variation der Gesamtzahl gefunden wurde [17-19]. Die Nephrogenese ist sowohl

von genetischen als auch von äußeren Einflüssen abhängig [20-22]. Störungen in bekannten Signalwegen wie zum Beispiel Gdnf/Ret, Wnt, Notch oder Bmp können zu einer Vielzahl an Defekten in der embryonalen Niere führen, welche sich in dem Ausbleiben des Herauswachsens der Ureterknospe [23], einer gestörten Verzweigungsmorphogenese [23], in hypoplastischen Nieren [24], einer reduzierten Nephronzahl [25, 26] oder in der Behinderung im Segmentierungsprozess mit fehlenden proximalen Nephronkomponenten äußern können [27]. Wie stark diese Fehlbildungen im Zusammenhang mit der Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung stehen wurde bislang nicht abschließend geklärt. Ein Frühsymptom und unabhängiger Prädiktor für die Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung, bzw. der glomerulären Schädigung ist dabei die Albuminurie, die bei gesunden Menschen unter 30 mg/24h liegt [28].

In diesem Zusammenhang stellt die Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte ein interessantes Tiermodell dar. Männliche MWF-Ratten entwickeln eine milde spontane arterielle Hypertonie, eine progressive Albuminurie und eine Glomerulosklerose [29, 30]. Im Vergleich zum nierengesunden Referenzstamm, der Spontaneously Hypertensive Rat (SHR), weist der MWF-Inzuchtstamm eine angeborene reduzierte Nephronzahl von 27% auf [29, 31]. Untersuchungen mit fetalen Nieren von MWF- und Wistar-Ratten am Entwicklungstag (E)19 deuten auf eine geminderte pränatale Entwicklung der Nephrone im MWF-Stamm [32]. In weiteren Vorstudien der Arbeitsgruppe konnten in Kosegregations- und Kopplungsanalysen bei der MWF-Ratte 11 QTL (Quantitative Trait Loci) im Zusammenhang mit Albuminurie identifiziert werden [33]. Das Rattenchromosom (RNO)6 der MWF-Ratte hat dabei einen entscheidenden Einfluss nicht nur auf die Entwicklung einer frühzeitig einsetzenden, progressiven Albuminurie, sondern auch auf die Entstehung eines Nephrondefizits [29]. So konnte durch den Transfer des isolierten SHR-RNO6 in den isogenetischen MWF-Hintergrund gezeigt werden, dass die Entwicklung einer erhöhten Albuminexkretion im Urin bei konsomen MWF-6^{SHR}-Ratten fast vollständig unterdrückt wurde [29]. Die Analyse der Glomerulanzahl 4 Wochen alter MWF-6^{SHR}-Ratten zeigte einen Rescue-Effekt bezogen auf das Nephrondefizit des MWF-Parentaltierstammes [29]. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass analog zu MWF-RNO6 auch auf MWF-RNO8 entscheidende QTL für die Entwicklung einer Albuminurie liegen, die aber im Gegensatz zu RNO6 das Nephrondefizit nicht beeinflussen [33].

Zielstellung

Studie 1

Im Rahmen des vorliegenden Dissertationsvorhabens wurden molekulare Grundlagen der Nephrogenese und damit der Nephronreduktion beim MWF-Rattenstamm untersucht. Dabei wurde zunächst der Zeitpunkt der Fehlentwicklung der Nieren männlicher MWF-Ratten bestimmt und die Veränderungen während der embryonal-fetalen Entwicklung erfasst. Des Weiteren wurde speziell der Einfluss von RNO6 auf die pränatale Nephronentwicklung untersucht. Hierzu wurden die Parentaltierstämme MWF und SHR und der konsome Stamm MWF-6^{SHR} vergleichend analysiert, da auf RNO6 ein entscheidender QTL mit starker Kopplung zur Albuminurie und zur Nephronreduktion nachgewiesen wurde [29, 33].

Studie 2 und Studie 3

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass sowohl SHR-RNO6 als auch SHR-RNO8 einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der progressiven Albuminurie bei der MWF-Ratte nehmen [29, 31, 33]. Im Dissertationsvorhaben wurde geprüft, ob RNO6 bzw. RNO8 der MWF-Ratte alleine, ohne die Interaktion der anderen Albuminurie-QTL des MWF-Stammes, nach Isolierung im nierengesunden SHR-Stamm eine Albuminurie induzieren

kann. Dazu wurden konsome SHR-6^{MWF}- bzw. SHR-8^{MWF}-Ratten bezüglich der Entwicklung einer Albuminurie und struktureller und funktioneller Nierenschäden analysiert.

Methodik

Rattenstämme und Haltung

Die kontrastierenden Inzucht-Parentalrattenstämme MWF und SHR wurden als eigene Kolonien in der Arbeitsgruppe von Prof. Reinhold Kreutz etabliert (MWF/FubRkb, SHR/FubRkb) [34, 35]. Die Tiere werden in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter standardisierten und kontrollierten Bedingungen gezüchtet. Dies beinhaltet eine konstante Raumtemperatur von 22°C, einen regelmäßigen 12 Stunden Tag-Nacht Zyklus, sowie freien Zugang zu Wasser und Futter. Die tierexperimentellen Arbeiten wurden mit Genehmigung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo) unter Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes durchgeführt (G 0278/07, G 0274/09).

Zur phänotypischen und genetischen Charakterisierung der MWF-Ratten wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe die konsomen Stämme MWF-6^{SHR}, SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} durch sequenzielle und Marker-unterstützte Rückkreuzungen gezüchtet [29, 30, 36]. Hierfür wurde bei MWF-6^{SHR}-Ratten das gesamte SHR-RNO6 in den isogenetischen Hintergrund von MWF-Ratten und das gesamte MWF-RNO6 bzw. MWF-RNO8 in den isogenetischen Hintergrund des Referenzstamms SHR bei SHR-6^{MWF}- bzw. SHR-8^{MWF}-Ratten überführt.

Studie 1. Untersuchungen an pränatalen Ratten

Die Methoden der Studie 1 sind ausführlich in der Publikation [37] beschrieben.

Verpaarung, Präparation und Anpassung des Entwicklungsstandes von Embryonen

Männliche und weibliche Ratten wurden zwei Stunden terminiert verpaart. Vor der Präparation wurden trächtige Ratten mit Isofluran narkotisiert. Nach der Entnahme des adulten Herzens wurden die Embryonen aus der Gebärmutter freigelegt und bezüglich der Scheitel-Steiß-Länge, des Körpergewichts und der Pfortenentwicklung phänotypisch charakterisiert, da sowohl MWF-, MWF-6^{SHR}- als auch SHR-Ratten in ihrer körperlichen Entwicklung unterschiedlich stark retardiert sind. Derjenige Entwicklungstag von MWF-6^{SHR}- und SHR-Ratten, bei dem diese Parameter keine signifikanten Unterschiede verglichen mit der MWF-Ratte am Entwicklungstag 15,5 zeigten („Stage-matching“), wurde für Folgeuntersuchungen verwendet.

Nephronzählung mittels Immunfluoreszenz und 3D-Rekonstruktion

Die embryonalen Metanephoi wurden für molekulargenetische Nierenuntersuchungen und die Leber für eine Geschlechtsbestimmung der Tiere unter einem Stereomikroskop dissektiert. Zur Asservierung wurden die Organe im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die Whole-mount Immunfluoreszenz wurden frisch explantierte, embryonale Nieren fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen geblockt. Im Anschluss wurden die Nieren mit Antikörpern inkubiert, gewaschen und auf einem Objektträger eingebettet. Der Antikörper für den Transkriptionsfaktor Wt1 (Wilms tumor-suppressor gene 1) wurde für die Fluoreszenz-Markierung von metanephrischem Mesenchym und Podozyten verwendet. Anti-Cytokeratin Antikörper wurden für die Markierung von Epithelzellen der Ureterknospe genutzt. Mit einem konfokalen Mikroskop wurden 5 µm dicke Z-Stapel (optische Schnitte) der Niere angefertigt. Im Anschluss wurden die Glomeruli und die Spitzen der Ureterknospenendungen computergestützt gezählt. Die Unterscheidung zwischen dem kondensierenden metanephrischen Mesenchym und den frühen Glomeruli ist möglich, da die

Wt1-positiven Podozyten der Glomeruli von den Ureterknospenspitzen entfernt liegen. Im Gegensatz dazu liegen Wt1-positive Zellen des kondensierenden Mesenchyms um die Cytokeratin-positiven Ureterknospenspitzen.

Die 3D-Rekonstruktion der Ureterknospe wurde aus den Z-Stapeln der konfokalen Mikroskopie generiert, um eventuelle Verzweigungsdefekte der Ureterknospe bewerten zu können.

Microarray- und Kandidatengenanalyse

Zur Geschlechtsunterscheidung wurde das für männliche Ratten charakteristische Sry (Sex determining region Y)-Gen in Leberproben mittels Standard-PCR und nachfolgender Gelelektrophorese bestimmt. Die RNA männlicher, embryonaler Nieren wurde extrahiert und eine genomweite Expressionsanalyse mittels Microarray-Technologie vorgenommen. Zur Validierung des Microarrayexperimentes wurden ausgewählte Genexpressionen per quantitativer Realtime (Reverse Transkriptase)-PCR nach der SYBR Green-Methode überprüft. Anschließend wurde eine systematische Literaturrecherche in der PubMed-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) zur Identifizierung von literaturbekannten Kandidatengen vorgenommen, die Einfluss auf die Nierenmorphogenese haben. In der Microarray-Auswertung wurden diese Gene auf differentielle Expression zwischen den Stämmen überprüft. Die False Discovery Rate (FDR) wurde für die ermittelten Kandidatengene Neuberechnet und die Schwelle der Signifikanz wurde bei einem FDR unter 5% und einem Fold-Change (FC) größer als 1,5 bzw. kleiner als -1,5 gelegt.

Studie 2 und Studie 3. Untersuchungen an adulten Ratten

Die Methoden der Studien 2 und 3 sind in den Publikationen [30, 36] detailliert beschrieben.

Versuchsgruppen

Für die Bewertung des Einflusses von RNO6 (Studie 2) bzw. RNO8 (Studie 3) der MWF-Ratte im isolierten nierengesunden Hintergrund der SHR-Ratte wurden verschiedene experimentelle Gruppen nach einem speziellen Phänotypisierungsprotokoll erstellt. In der Kontrollgruppe wurden die Ratten scheinoperiert und bekamen normales Leitungswasser ad libitum zu trinken. In der Nephrektomie (Nx)-Gruppe wurde bei jeder Ratte nach einer retroperitonealen Inzision eine unilaterale Nephrektomie vorgenommen und normales Leitungswasser ad libitum zum Trinken zur Verfügung gestellt. In der L-NAME (*N_ω*-Nitro-L-Arginin-Methylester)-Gruppe, welche nur in Studie 2 untersucht wurde, wurden die Ratten wie in der Kontrollgruppe scheinoperiert. Zusätzlich wurden 20 mg/l L-NAME ins Leitungswasser gegeben. L-NAME ist ein reversibler Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase 1, 2 und 3, deren Anwendung ein probates Mittel zur phänotypischen Charakterisierung in der Hypertonie-Forschung darstellt [38]. Die jeweiligen operativen Eingriffe wurden in der 6. Woche vorgenommen.

Pro Gruppe wurden die Parentaltierstämme MWF und SHR, sowie der konsome SHR-6^{MWF} bzw. SHR-8^{MWF} in der 24. Woche abschließend untersucht. Wegen einer vorzeitigen Letalität von SHR- und SHR-6^{MWF}-Ratten in der L-NAME-Gruppe wurde in einem neuen Ansatz die Studie 2 bis zur 12. Woche wiederholt. Hierbei wurde der mittlere, arterielle Blutdruck bei MWF-, SHR-6^{MWF}- und SHR-Ratten invasiv mit einem Katheter in der Femoralarterie an zwei aufeinander folgenden Tagen an wachen Tieren gemessen [39].

Renale Albuminexkretion, arterieller Blutdruck und Präparation

Der Albumingehalt im 24-Stunden Sammelurin (U_{Aib}) wurde in der 12., 18. und 24. Woche mit Hilfe von Stoffwechselkäfigen gewonnen und mittels eines Ratten-spezifischen ELISA bestimmt [29]. Zusätzlich wurde zu den oben genannten Zeitpunkten der systolische Blutdruck nicht-invasiv schwanzplethysmographisch (Tail-Cuff-Methode) gemessen [40].

Für biochemische und histologische Analysen wurden am Ende der Studie Plasma, Herz und Nieren der Ratten entnommen und asserviert.

Laboruntersuchungen und Bestimmung der Gesamt-Glomerulizahl

Strukturelle Nierenschäden wurden durch die semiquantitativen Parameter Glomeruloskleroseindex (GSI) und tubulointerstitieller Schädigungsindex (TDI) beurteilt [29]. Als Marker für die renale Funktion wurden die Cystatin C-Plasmaspiegel über eine Standardmethode gemessen (Labor 28, Berlin, Deutschland). Zur Bewertung der renalen Tubulusschädigung wurde in Studie 2 die Expression des Markers Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal) und in Studie 3 Hepatitis A virus cellular receptor 1 bzw. Kidney injury molecule-1 (Havcr1 bzw. Kim-1) per quantitativer Realtime-PCR nach der SYBR Green-Methode überprüft.

Die Gesamt-Glomerulizahl von männlichen, 4 Wochen alten konsomen SHR-6^{MWF}-Ratten wurde in Studie 2 mit der „Physikal fraktionator“-Technik bestimmt und mit zuvor in der Arbeitsgruppe erhobenen und veröffentlichten Daten von SHR- und MWF-Ratten verglichen [29].

In der Studie 3 wurde für die Beurteilung des glomerulären Schadens das Podozyten-spezifische Protein Podoplanin mittels Immunfluoreszenz analysiert [41]. Dazu wurden die Nieren in Paraffin eingebettet, geschnitten, entparaffiniert, mit einer endogenen Peroxidase geblockt und im Anschluss mit Antikörpern inkubiert.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte, sofern nicht anders angegeben, mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur. Bei den Untersuchungen an pränatalen Ratten sind alle Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben (Studie 1). Bei den Untersuchungen an adulten Ratten wurden die Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Zusätzlich wurde bei fehlender Normalverteilung der Mann-Whitney-U Test durchgeführt (Studie 2 und Studie 3).

Ergebnisse

Studie 1

MWF-Ratten an E15,5 sind vom Körpergewicht und der Scheitel-Steiß-Länge her mit dem MWF-6^{SHR}-Stamm an E15,5 und mit dem SHR-Stamm an E16,0 vergleichbar (Tab. 1). Es werden zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede beim Körpergewicht und der Scheitel-Steiß-Länge beobachtet. SHR-Ratten an E15,5 hingegen sind signifikant kleiner und leichter als MWF-Ratten an E15,5 ($P < 0,002$; Tab. 1). Diese Ergebnisse sind jeweils konsistent mit dem Entwicklungsstand der Pfoten [37].

Tabelle 1. Entwicklungsstand von embryonalen MWF-, konsomen MWF-6^{SHR}- und SHR-Ratten.

Phänotyp	MWF E15,5	MWF-6 ^{SHR} E15,5	SHR E15,5	SHR E16,0
Körpergewicht (mg)	260 \pm 32	270 \pm 21	181 \pm 28	249 \pm 26
Scheitel-Steiß-Länge (mm)	13 \pm 1	13 \pm 1	12 \pm 1	13 \pm 1

Mittelwert \pm SD. E, Entwicklungstag; MWF, Munich Wistar Frömter; SHR, Spontaneously Hypertensive Rat.

Die Quantifizierungsergebnisse der Parameter Anzahl an Glomeruli und Anzahl an Spitzen der Ureterknospenendungen von MWF- und MWF-6^{SHR}- an E15,5 und SHR-Ratten an E16,0 sind in Tab. 2 ersichtlich. Tendenziell wurden weniger Glomeruli und signifikant mehr Ureterknospenendungen bei MWF-Ratten (38 \pm 6 bzw. 77 \pm 12) verglichen mit SHR-Ratten

(44 ± 7 bzw. 60 ± 12 ; E16,0; $P = 0,04$) identifiziert (Tab. 2). Nach der Normierung auf Glomeruli pro einzelner Ureterknospe unterscheidet sich der MWF-Stamm ($0,50 \pm 0,03$) mit einer signifikant geringeren Ratio vom SHR-Stamm ($0,73 \pm 0,05$; $P < 0,0001$). Der konsome MWF-6^{SHR}-Stamm (E15,5) verhält sich bezogen auf den Quotienten Anzahl der Glomeruli pro Ureterknospenendungen zu den Parentaltierstämmen intermediär und unterscheidet sich signifikant zu MWF ($0,59 \pm 0,12$; $P = 0,02$).

Tabelle 2. Phänotypische Charakterisierung von embryonalen MWF-, konsomen MWF-6^{SHR}- und SHR-Ratten des gleichen Entwicklungsstandes.

Phänotyp	MWF E15,5	MWF-6 ^{SHR} E15,5	SHR E16,0
Körpergewicht (mg)	258 ± 28	265 ± 17	240 ± 22
Glomeruli pro Niere (n)	38 ± 6	37 ± 6	44 ± 7
Ureterknospenendungen (n)	77 ± 12	64 ± 12	60 ± 12
Glomeruli pro einzelner Ureterknospenendung (n)	$0,50 \pm 0,03$	$0,59 \pm 0,12$	$0,73 \pm 0,05$

Mittelwert \pm SD. E, Entwicklungstag; MWF, Munich Wistar Frömter; SHR, Spontaneously Hypertensive Rat.

Die makroskopische Bewertung der 3D-Rekonstruktion der Ureterknospe ergibt, dass weder MWF- noch SHR-Embryonen Anomalien in der Verzweigung bzw. Entwicklung zeigen. Sowohl MWF- als auch SHR-Embryonen weisen gleichmäßig verteilte Spitzen der Ureterknospe mit regulärem Verzweigungsmuster auf, wobei Nieren von MWF-Embryonen mehr Knospenendungen haben (Tab. 2). Anomalien wie geschwollene Ureterknospenenden, mehrere Ureter oder ein ungewöhnliches Verzweigungsmuster wurden nicht beobachtet.

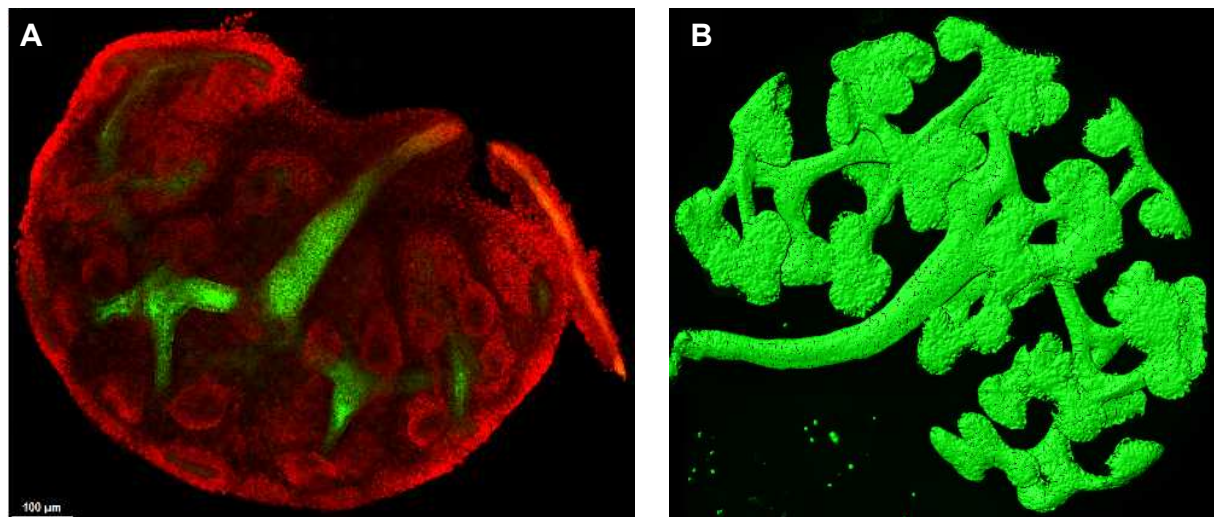


Abbildung 1. (A) Optischer 5 μ m dicker Z-Stapel-Schnitt einer repräsentativen MWF-Rattenniere am Entwicklungstag 15,5 nach der Whole-mount-Immunfluoreszenzfärbung. In grün ist die Ureterknospe dargestellt und in rot die frühen Glomeruli und das metanephrische Mesenchym. (B) Drei-dimensionale Rekonstruktion der Ureterknospe von einer embryonalen MWF-Rattenniere am Entwicklungstag 15,5.

Die systematische Literaturrecherche für eine erste Microarray-Analyse ergab 59 Gene, die einen Einfluss auf die Nierenmorphogenese haben (Supplement, Tab. 1; <http://links.lww.com/HJH/A185>). Darunter fanden sich vorwiegend die Signalwege von GDNF/Ret (Glial cell-derived neurotrophic factor/Ret proto-oncogene), Calciumionen, Notch, Bone morphogenetic protein und WNT/beta-catenin (Wingless integration site family/beta-Catenin). Die Auswertung dieser literaturbekannten Kandidatengene des Microarrays zeigte nach Berücksichtigung des Signifikanzschwellenwertes einzig beim Hepatocyte growth factor

(Hgf) bei MWF- und MWF-6^{SHR}-Rattennieren signifikant verminderte Expressionen verglichen mit SHR-Rattennieren ($P < 0,004$; Supplement, Tab. 1; <http://links.lww.com/HJH/A185>). Die Konfirmierung des Gens über eine Realtime-PCR ergab eine ungefähr 70%ige reduzierte Hgf-Genexpression bei MWF- und MWF-6^{SHR}-Ratten verglichen mit SHR-Ratten (Abb. 2; $P < 0,004$).

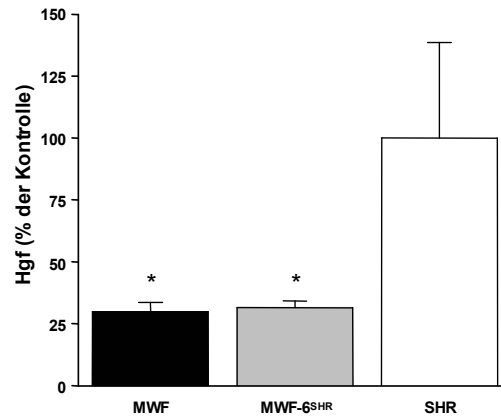


Abbildung 2. Hepatocyte growth factor (Hgf) mRNA-Expression von MWF- und MWF-6^{SHR}-Ratten am Entwicklungstag 15,5 und SHR-Ratten am Entwicklungstag 16,0. * $P < 0,004$ vs. SHR. Mittelwert \pm SD.

Studie 2

Die L-NAME-Behandlung führte bei SHR-6^{MWF}-Ratten spätestens in der 15. Woche und bei SHR-Ratten spätestens in der 18. Woche zu einem vorzeitigen Tod. Lediglich zwei SHR-Ratten unter L-NAME-Behandlung überlebten bis zum geplanten Ende des Untersuchungszeitraumes. Um die phänotypische Charakterisierung aller Stämme vervollständigen zu können, wurde in einem zweiten Versuchsdurchgang das ursprüngliche Versuchsprotokoll geändert und die Studie nicht mehr bis zur 24. Woche, sondern nur noch bis zur 12. Woche durchgeführt.

Renale Albuminexkretion

Der Gehalt an Albumin im Urin lag in der Kontrollgruppe bei MWF-Ratten bei $22,8 \pm 2,1$ mg/24 h in der 12. Woche und bei $108,7 \pm 12,3$ mg/24 h in der 24. Woche. SHR- und SHR-6^{MWF}-Ratten zeigten physiologische Werte von $0,4 \pm 0,1$ bzw. $0,5 \pm 0,2$ mg/24 h in der 12. Woche und $1,3 \pm 0,3$ bzw. $0,6 \pm 0,1$ mg/24 h in der 24. Woche (Abb. 3).

Die Nephrektomie bewirkte bei allen Stämmen und zu jedem Zeitpunkt eine signifikante Erhöhung der Albuminwerte ($P < 0,005$ vs. Kontrollgruppe), wobei sich die Unterschiede zwischen den Stämmen in beiden Gruppen ähnelten. 12 Wochen alte SHR6^{MWF}-Ratten stellten mit signifikant erhöhten Werten eine Ausnahme dar (Abb. 3).

Unter L-NAME-Behandlung erhöhten sich in der 12. Woche beim SHR- ($0,8 \pm 0,2$ mg/24 h) und beim konsomen SHR-6^{MWF}-Stamm ($12,7 \pm 3,5$ mg/24 h) die Albuminexkretionen signifikant verglichen mit dem korrespondierenden Stamm der Kontrollgruppe ($P < 0,006$). Bei MWF-Ratten hingegen wurden keine signifikanten Veränderungen beobachtet.

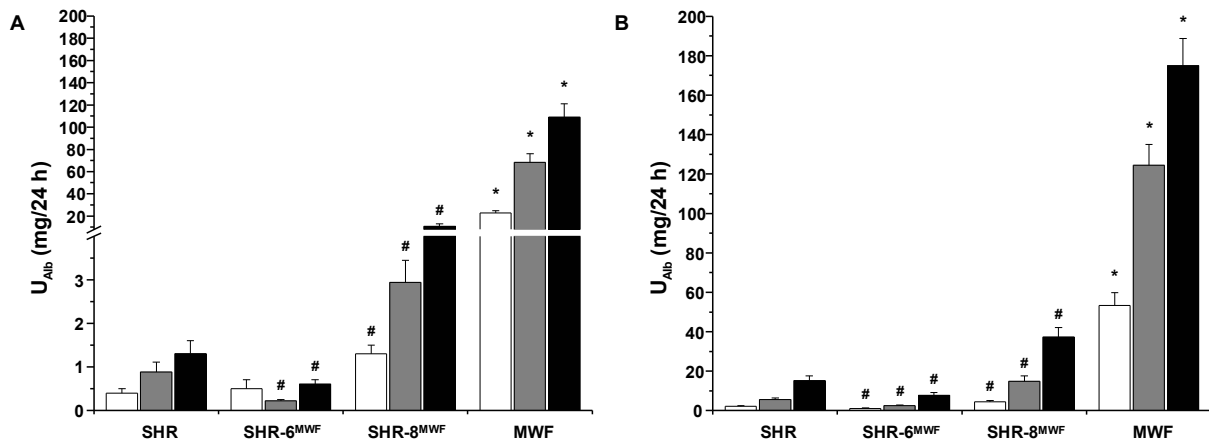


Abbildung 3. Zeitlicher Verlauf der Albuminausscheidung im Urin (U_{Alb}) von der 12. (weiß), 18. (grau) und 24. (schwarz) Woche der Kontrollgruppe (A) und der unilateral nephrektomierten Gruppe (B). * $P < 0,006$ vs. andere Stämme der gleichen Woche; # $P < 0,05$ vs. SHR in der gleichen Woche. Mittelwert \pm SEM.

Nicht-invasive und invasive Blutdruckmessungen

Die indirekten Blutdruckmessungen mittels Tail-Cuff-Methode gemessen ergaben in der Kontrollgruppe beim MWF- und SHR-Stamm von der 12. bis zur 24. Woche einen leichten und signifikanten Anstieg des Blutdruckes ($163,5 \pm 2,1$ vs. $186,7 \pm 4,3$ und $176,9 \pm 4,1$ vs. $210,9 \pm 6,7$ mm Hg; $P < 0,05$). Bei dem konsomen Stamm SHR-6^{MWF} wurden arterielle Blutdrücke gemessen, die sich zu keinem Zeitpunkt von denen der SHR-Ratten signifikant unterschieden.

In der Nx-Gruppe wurden verglichen mit den korrespondierenden Stämmen der Kontrollgruppe keine unterschiedlichen Blutdrücke ermittelt.

Als Antwort auf die L-NAME-Behandlung demonstrierten SHR- und SHR-6^{MWF}-Ratten im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant erhöhte Blutdrücke in der 12. Woche. Bei dem konsomen SHR-6^{MWF}-Stamm, bei dem keine Ratte die 15. Woche der L-NAME-Behandlung überlebte, konnte eine signifikante Anhebung des Blutdruckes verglichen mit SHR-Ratten in der 12. Woche verzeichnet werden ($P = 0,01$).

Die direkte Messung des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAD) in der 12 Wochen alten Kontrollgruppe ergab zur indirekten Blutdruckmessung ein analoges Bild. MWF-Ratten zeigten bei der direkten Messung im Vergleich zu den Stämmen SHR und SHR-6^{MWF} die geringsten Blutdrücke ($125,7 \pm 5,1$ vs. $166,0 \pm 9,1$ bzw. $155,4 \pm 4,7$ mm Hg; $P < 0,05$). Durch L-NAME stieg der MAD von SHR- und SHR-6^{MWF}-Ratten signifikant an ($216,1 \pm 6,3$ bzw. $184,6 \pm 11,2$ mm Hg; $P < 0,05$ vs. Kontrollgruppe).

Linksventrikuläres Gewicht

Das linksventrikuläre Gewicht wurde als Index für die linksventrikuläre Herzhypertrophie gewertet. In der 12 Wochen alten Kontrollgruppe besaßen SHR-6^{MWF}-Ratten intermediäre relative Herzgewichte, die sich jeweils signifikant zu den Parentaltierstämmen verhielten ($2,35 \pm 0,04$ mg/g; $P < 0,05$). SHR-Ratten verfügten dabei über das größte relative linksventrikuläre Gewicht ($2,53 \pm 0,08$ mg/g).

Beim MWF-Stamm wurden sowohl in der Kontroll- als auch in der Nx-Gruppe signifikant niedrigere relative linksventrikuläre Gewichte im Vergleich zu SHR ermittelt ($2,14 \pm 0,02$ vs. $2,53 \pm 0,08$ bzw. $2,07 \pm 0,04$ vs. $2,74 \pm 0,07$ mg/g; $P < 0,006$).

In der L-NAME-Gruppe erhöhte sich bei jedem Stamm das relative linksventrikuläre Gewicht, wobei eine signifikante Veränderung nur beim SHR-Stamm gegenüber dem jeweiligen Stamm der Kontrollgruppe beobachtet wurde ($2,84 \pm 0,07$ mg/g; $P < 0,05$).

Renale Phänotypen

Die Beurteilung des Nieren-Schädigungsindex GSI war bei 12 Wochen alten SHR- und SHR-6^{MWF}-Ratten ähnlich. Verglichen mit gleichaltrigen MWF-Ratten war der GSI dieser Stämme signifikant erhöht (Tab. 3; $P < 0,05$). Bei den mit L-NAME behandelten Tieren waren jeweils mehr sklerotische Veränderungen verglichen mit der Kontrollgruppe zu verzeichnen, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen (Tab. 3).

Die Analyse des Index TDI ergab bei 12 Wochen alten MWF-, SHR-6^{MWF}- und SHR-Ratten der Kontrollgruppe ein vergleichbares Ausmaß (Tab. 3). Unter L-NAME-Gabe waren die tubulointerstitiellen Schäden bei den konsomen SHR-6^{MWF}-Ratten signifikant verstärkt, sowohl im Vergleich mit den Parentaltierstämmen SHR und MWF als auch mit den konsomen Ratten in der Kontroll-Gruppe (Tab. 3; $P < 0,05$)

Tabelle 3. Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TDI), Glomeruloskleroseindex (GSI) und Cystatin C Plasmaspiegel der Kontroll- und L-NAME-Gruppe von 12 Wochen alten MWF-, SHR-6^{MWF}- und SHR-Ratten der Studie 2.

	Kontrollgruppe			L-NAME-Gruppe		
	TDI	GSI (Stufe 0 – 4)	Cystatin C (mg/l)	TDI	GSI (Stufe 0 – 4)	Cystatin C (mg/l)
MWF	0,37 ± 0,078	0,64 ± 0,068 *	0,11 ± 0,005 *	0,27 ± 0,051	1,07 ± 0,121	0,13 ± 0,004 #
SHR-6 ^{MWF}	0,29 ± 0,045	0,89 ± 0,061	0,05 ± 0,001 *	1,00 ± 0,170 *	1,24 ± 0,236	0,10 ± 0,022
SHR	0,40 ± 0,096	0,99 ± 0,066	0,07 ± 0,004	0,48 ± 0,089	1,13 ± 0,123	0,07 ± 0,006

Mittelwert ± SEM. * $P < 0,05$ vs. andere Stämme der gleichen Behandlung; # $P < 0,05$ vs. SHR der gleichen Behandlung. GSI, Glomeruloskleroseindex; MWF, Munich Wistar Frömter; SHR, Spontaneously Hypertensive Rat.

Die Ngal mRNA-Expressionen der Kontrollgruppe von MWF-, SHR-6^{MWF}- und SHR-Ratten zeigten ein zum TDI analoges Ergebnis. Durch L-NAME stieg die Expression des SHR-6^{MWF}-Stamms auf das 6- bis 12-fache verglichen mit den anderen beiden Stämmen an ($P < 0,05$).

Die Cystatin C-Plasmakonzentrationen der Kontrollgruppe waren bei dem MWF-Stamm signifikant höher als beim SHR-Stamm (Tab. 3; $P < 0,0001$). Die signifikant niedrigsten Konzentrationen wurden beim SHR-6^{MWF}-Stamm dokumentiert (Tab. 3; $P < 0,001$ vs. SHR-Ratten). Durch die L-NAME-Behandlung stiegen die Plasmakonzentrationen an Cystatin C der SHR-6^{MWF}- und MWF-Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant an (Tab. 3; $P < 0,05$). Es wurden bei dem SHR-6^{MWF}-Stamm vergleichbar hohe Plasmakonzentrationen an Cystatin C wie bei MWF-Ratten ermittelt (Tab. 3).

Nephronanzahl von konsomen SHR-6^{MWF}-Ratten

Die Bestimmung der Gesamtanzahl an Glomeruli von 4 Wochen alten SHR-6^{MWF}-Ratten ergab 33868 ± 1812 Glomeruli pro Niere. Der Vergleich mit früheren Studien der Arbeitsgruppe zeigt keine signifikante Abweichung der Gesamtzahl bezogen auf SHR-Ratten (36979 ± 1352), jedoch signifikant mehr Glomeruli verglichen mit MWF-Ratten (27028 ± 1322 ; $P < 0,01$) [29].

Studie 3

Renale Albuminexkretion

Bei SHR-8^{MWF}-Ratten war im Untersuchungszeitraum von der 12. bis zur 24. Woche ein kontinuierlicher und signifikanter Anstieg der Albuminausscheidung unter basalen Bedingungen zu verzeichnen ($1,3 \pm 0,2$ und $10,8 \pm 2,1$ mg/24 h; $P < 0,004$). Diese Werte

hoben sich zu jedem Zeitpunkt signifikant von denen der SHR-Ratten ab (Abb. 3; $P < 0,0001$). Die Nephrektomie bewirkte bei allen Stämmen und zu jedem Zeitpunkt eine signifikante Erhöhung der Albuminwerte ($P < 0,005$ vs. Kontrollgruppe), wobei die Unterschiede zwischen den Stämmen in der Kontrollgruppe und in der Nx-Gruppe vergleichbar waren.

Nicht-invasive Blutdruckmessung mittels Tail-Cuff

Bei 24 Wochen alten SHR-8^{MWF}-Ratten fiel der arterielle Blutdruck signifikant geringer aus als jener von gleichaltrigen SHR-Ratten ($P = 0,03$).

Mit Ausnahme von SHR-8^{MWF}-Ratten wurden in der Nx-Gruppe verglichen mit den korrespondierenden Stämmen der Kontrollgruppe keine unterschiedlichen Blutdrücke ermittelt. Beim SHR-8^{MWF}-Stamm wurde ein signifikanter Blutdruckanstieg nach Nephrektomie erfasst ($P = 0,04$).

Linksventrikuläres Gewicht

Das linksventrikuläre Gewicht wurde als Index für die linksventrikuläre Herzhypertrophie hinzugezogen. Durch die Übertragung von MWF-RNO8 verminderte sich das relative Herzgewicht bei 24 Wochen alten SHR-8^{MWF}-Ratten signifikant verglichen mit gleichaltrigen SHR-Ratten, sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach Nephrektomie ($2,36 \pm 0,06$ vs. $2,77 \pm 0,09$ bzw. $2,45 \pm 0,04$ vs. $2,74 \pm 0,07$ mg/g; $P < 0,001$). Die Untersuchung des relativen linksventrikulären Gewichts ergab bei beiden Stämmen in der Nx-Gruppe im Vergleich zum korrespondierenden Stamm der Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen.

Renale Phänotypen

Der Vergleich des GSI von 24 Wochen alten SHR- und SHR-8^{MWF}-Ratten erbrachte keine signifikanten Unterschiede in der Kontrollgruppe, jedoch einen signifikant erhöhten GSI für die konsomen Ratten in der Nx-Gruppe (Tab. 4; $P < 0,05$).

Im Gegensatz zum GSI wurden in der Kontrollgruppe signifikant erhöhte TDI-Werte bei SHR-8^{MWF}-Ratten verglichen mit dem SHR-Stamm beobachtet. Die Signifikanz war in der Nx-Gruppe nicht mehr vorhanden (Tab. 4).

Tabelle 4. Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TDI), Glomeruloskleroseindex (GSI) und Cystatin C Plasmaspiegel der Kontroll- und Nephrektomie (Nx)-Gruppe von 24 Wochen alten SHR-8^{MWF}- und SHR-Ratten der Studie 3.

	Kontrollgruppe			Nx-Gruppe		
	TDI	GSI (Stufe 0 – 4)	Cystatin C (mg/l)	TDI	GSI (Stufe 0 – 4)	Cystatin C (mg/l)
SHR-8 ^{MWF}	0,33 ± 0,038 *	1,38 ± 0,113	0,05 ± 0,002	0,49 ± 0,049 #	1,70 ± 0,068 *#	0,07 ± 0,003 #
SHR	0,20 ± 0,015	1,03 ± 0,128	0,05 ± 0,003	0,45 ± 0,050 #	1,23 ± 0,149	0,07 ± 0,003 #

Mittelwert ± SEM. * $P < 0,05$ vs. SHR der gleichen Behandlung; # $P < 0,05$ vs. gleicher Stamm der Kontrollgruppe. MWF, Munich Wistar Frömter; SHR, Spontaneously Hypertensive Rat.

Die Havcr1 mRNA-Expressionslevel von SHR- und SHR-8^{MWF}-Ratten fielen analog zu den Ergebnissen der TDIs aus.

Bei SHR-Ratten wurden in 4,2% der Glomeruli eine fokale und segmentale Reduktion in der Podoplanin-Proteinexpression gewertet. Bei SHR-8^{MWF}-Ratten hingegen waren 3,6-fach mehr Glomeruli betroffen ($P < 0,004$). In der Nx-Gruppe war eine Reduktion der Podoplaninexpression in beiden Stämmen als Folge zu erkennen, ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Stämmen.

Die Cystatin C-Plasmakonzentrationen von 24 Wochen alten SHR- und SHR-8^{MWF}-Ratten waren in der Nx-Gruppe verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe in beiden Stämmen

angestiegen (Tab. 4; $P < 0,05$). Differenzen zwischen den zwei Stämmen gab es unter beiden Bedingungen nicht (Tab. 4).

Diskussion

Studie 1

Aus Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe war bekannt, dass 4.Wochen alte MWF-Ratten eine verminderte Nephronzahl besitzen und sich dieses Defizit bereits bei MWF-Feten an E19 abzeichnet [29, 32]. Der erste Untersuchungsschwerpunkt der Studie 1 war die Ermittlung des Zeitpunktes der signifikant verminderten Anlage an Nierenkörperchen von MWF-Ratten verglichen mit SHR-Ratten. Für entwicklungsbiologische Untersuchungen ist die Bestimmung des Entwicklungsstandes eines Embryos essentiell. Obgleich oftmals das Alter von Embryonen (in Tagen oder Stunden) für eine grobe Bestimmung des Entwicklungsstadiums genutzt wird, sind aktuelle Einteilungsverfahren (Staging-Systeme wie z.B. jene von Theiler [42] oder Witschi [43]) geeigneter. Verschiedene Embryos eines Wurfs (auch genetisch identische) können sich in unterschiedlicher Geschwindigkeit entwickeln und deshalb bezüglich ihres Entwicklungsstandes nicht direkt miteinander verglichen werden. Deshalb ist das Anpassen der körperlichen Entwicklung durch unterschiedliche Reifungszeiten im Mutterleib ein bedeutender Aspekt, um intrinsische Unterschiede bezogen auf die körperliche Entwicklung auszuschließen [44]. Des Weiteren diente in der vorliegenden Arbeit das Angleichen der körperlichen Entwicklung von MWF- und SHR-Ratten der Angleichung der Nierenentwicklung. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass SHR-Ratten in ihrer Entwicklung stärker retardiert sind als MWF-Ratten (Tab. 1).

Die Quantifizierung der Glomeruli ergab nur tendenzielle, aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parentaltierstämmen MWF an E15,5 und SHR an E16,0, wobei SHR-Rattennieren im Mittel mehr Glomeruli aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigten MWF-Rattennieren signifikant mehr Ureterknospenspitzen im Vergleich zu SHR-Rattennieren. Nach der Normierung der Gesamtanzahl der Glomeruli pro Niere durch die Anzahl der Ureterknospenendungen wurde deutlich, dass sich in MWF-Rattennieren weniger Glomeruli pro einzelner Ureterknospenspitze entwickeln (Tab. 2). Daher kann die Vermutung aufgestellt werden, dass der MWF-Stamm im Vergleich zum SHR-Stamm eine geringere Effizienz der Nephroninduktion besitzt. Diese Hypothese wird durch die drei-dimensionale Rekonstruktion der Ureterknospe gestärkt. In Abb. 1B wird eine vollständige embryonale MWF-Niere nach einer drei-dimensionalen Rekonstruktion beispielhaft gezeigt. Keine offensichtlichen Anomalien wurden identifiziert. Daher ist es wahrscheinlich, dass die beobachtete geringere Anzahl an Glomeruli nicht durch einen prinzipiellen Verzweigungsdefekt hervorgerufen wird. Um die genetische Grundlage der verminderten Nephroninduktion weiter aufzuklären, wurden in einem ersten Ansatz literaturbekannte Gene mit einem starken Einfluss auf die Nierenmorphogenese über ein Microarray-Experiment analysiert. Von den 59 identifizierten Kandidatengen zeigte einzig Hgf signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen SHR- und MWF-Ratten und wurde als ein interessantes Kandidatengen für das beobachtete Nephrondefizit in MWF-Ratten identifiziert (Supplement, Tab. 1; <http://links.lww.com/HJH/A185>). In der Nierenkultur fördert Hgf sowohl die Differenzierung von metanephrischen Mesenchymzellen in epitheliale Vorstufen des Nephrons als auch die Verzweigungsmorphogenese der Ureterknospe. Des Weiteren hemmt Hgf den Zelltod innerhalb des renalen Mesenchyms [45]. Da Hgf auf RNO4 liegt, können genetische Variationen in diesem Gen keine direkte Wirkung auf den genetischen Einfluss von RNO6 auf das Nephrondefizit bei MWF-Ratten haben. Die Tatsache, dass die Hgf-mRNA-Expression im MWF- und dem konsomen MWF-6^{SHR}-Stamm vergleichbar war, zeigt deshalb

die von RNO6 unabhängige und potentielle Rolle der Hgf-Expression auf die Nephronentwicklung. Weiterführende Auswertungen und Analysen der erhobenen Microarray-Daten sind zur Aufklärung des genetischen Defekts des Nephrondefizits bei der MWF-Ratte nötig.

Studie 2

Die Züchtung von konsomen Stämmen dient der Validierung funktioneller Effekte, da es den Nachweis eines protektiven Einflusses des übertragenen Chromosoms vom kontrastierenden Stamm in einen kranken genetischen Hintergrund erlaubt [29, 31, 46]. Im Gegensatz dazu erscheint der Nachweis der Induktion eines pathogenen Phänotyps durch die Übertragung des als pathogen identifizierten QTL in den Hintergrund eines gesunden Referenzstamm weniger erfolgreich [40, 46]. Der Verlust allelischer Interaktionen oder der Verlust von Signalwegen zur Induktion und Regulierung der Phänotypen ist hierbei eine mögliche Erklärung.

Die Hypothese der zweiten Studie war, dass durch die Übertragung des für die Entwicklung einer Albuminurie verantwortlichen MWF-RNO6 in den isogenetischen Hintergrund der nierengesunden SHR-Ratte eine Albuminurie induziert werden kann. Die Befunde von SHR-6^{MWF}-Ratten sowohl unter Normalbedingungen als auch nach der Reduzierung der Nephrongesamtzahl um ca. 50% durch eine unilaterale Nephrektomie zeigten, dass eine Albuminurie bei diesen konsomen Ratten nicht induziert werden konnte.

Der fehlende Effekt von MWF-RNO6 auf die Albuminexkretion in SHR-6^{MWF}-Ratten könnte auf verschiedene physiologische Kompensationen durch den genetischen Hintergrund des SHR-Stamms beim SHR-6^{MWF}-Konsomen und/oder antagonistische epistatische Interaktionen [47] zurückzuführen sein. Diese Mechanismen haben jedoch keinen Einfluss auf den systolischen Blutdruck, da keine signifikant erniedrigten Blutdrücke bei konsomen Kontroll- und Nx-Tieren, verglichen mit den jeweiligen korrespondierenden SHR-Ratten, ermittelt wurden. Allerdings zeigten die Ergebnisse, dass genetische Faktoren auf RNO6 zur Entwicklung durch L-NAME induzierte Nierenschädigung und Albuminurie beitragen. Diese Faktoren der L-NAME-sensiblen Albuminurie können sich von dem Albuminurie-QTL, welcher in vorangegangenen Studien bei MWF-6^{SHR}-Ratten identifiziert und bestätigt wurde [29, 33], unterscheiden.

Der tubuläre Schaden bei 12 Wochen alten SHR-6^{MWF}-Ratten unter L-NAME-Behandlung ist möglicherweise keine direkte Konsequenz der Albuminurieinduktion, da die Erhöhung der Albuminausscheidung relativ mild ausfällt und MWF-Ratten unter L-NAME-Behandlung keine tubulären Schäden trotz höherer Albuminuriewerte in der 12. Woche vorweisen. Auch die alleinige verstärkte Ngal mRNA-Expression im konsomen Stamm deutet erneut auf einen vom Albuminurie-QTL unbekanntem und unabhängigen Mechanismus. Da beim konsomen SHR-6^{MWF}-Stamm keine signifikant reduzierte Nephronzahl im Vergleich mit dem SHR-Stamm vorliegt, kann die verstärkte Anfälligkeit der SHR-6^{MWF}-Niere deshalb nicht durch frühzeitige Anpassungsmechanismen als Antwort eines Nephrondefizites erklärt werden.

Studie 3

Im Gegensatz zur ausbleibenden Induktion der Albuminurie bei SHR-6^{MWF}-Ratten konnte in der dritten Studie durch den Transfer von MWF-RNO8 in den SHR-Hintergrund zum ersten Mal der pathologische Albuminurie-Phänotyp bei konsomen SHR-8^{MWF}-Ratten unter normalen Bedingungen hervorgerufen werden. Weitere Untersuchungen müssen abschließend klären, ob dieses einmalige Ergebnis auch auf die fehlenden protektiven Effekte von RNO8 des SHR-Stammes zurückzuführen ist. Der erhöhte Blutdruck der SHR-8^{MWF}-Ratte kann nicht als Ursache der Albuminurie gewertet werden, da dieser verglichen mit SHR signifikant niedriger ausfällt.

Aus einer vorigen Studie war bereits bekannt, dass der MWF-8^{SHR}-Stamm verglichen mit dem MWF-Stamm einen signifikant erhöhten Blutdruck aufweist [31]. Dieser den Blutdruck beeinflussende Locus auf RNO8 konnte in dieser Studie bestätigt werden.

Zusätzlich zur erhöhten Albuminausscheidung bei SHR-8^{MWF}-Ratten konnte ein struktureller Nierenschaden festgestellt werden. Sowohl tubulointerstitielle Schäden als auch die renale Haver1 mRNA-Expression waren verglichen mit jenen von SHR-Ratten signifikant erhöht. Die Beteiligung der tubulären Veränderung in der Entwicklung der Albuminurie bei MWF-Ratten kann demnach entweder als Konsequenz oder als verursachender Faktor der Albuminurie gewertet werden [48].

Als wichtigster Befund dieser Studie konnte die unabhängige Rolle vom MWF-RNO8 QTL sowohl für Albuminurie als auch für strukturelle Nierenschäden nachgewiesen werden. Weitere Studien mit kongenen Linien, bei denen Teilabschnitte von Chromosomen zweier Rattenstämme ausgetauscht werden, sind nötig, um diesen QTL einzugrenzen und die genetischen Grundlagen weiter aufzuklären.

Literatur

1. World Health Organization, World Health Statistics 2012.
2. Diez J, Frohlich ED. A translational approach to hypertensive heart disease. *Hypertension*. 2010;55:1-8.
3. Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, Brancati FL, Ford CE et al. Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med*. 1996;334:13-18.
4. Julius S, Schork MA. Predictors of hypertension. *Ann N Y Acad Sci*. 1978;304:38-58.
5. Sealey JE, Blumenfeld JD, Bell GM, Pecker MS, Sommers SC, Laragh JH. On the renal basis for essential hypertension: nephron heterogeneity with discordant renin secretion and sodium excretion causing a hypertensive vasoconstriction-volume relationship. *J Hypertens*. 1988;6:763-777.
6. Gordon DB. The renal basis of essential hypertension. *Jpn Heart J*. 1974;15:419-434.
7. Whinnery RA. Renal vascular disease a primary basis of essential hypertension. *Harper Hosp Bull*. 1953;11:194-196.
8. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M. Mutschler Arzneimittelwirkungen. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart; 2008.
9. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens*. 1988;1:335-347.
10. Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension*. 2006;47:502-508.
11. Becker F. Embryologie, Organogenese und Anomalien des Urogenitaltraktes. In: Steffens J und Siemer S. Häufige urologische Erkrankungen im Kindesalter. Darmstadt: Steinkopff-Verlag; 2008. S. 3-11.
12. Quaggin SE, Kreidberg JA. Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. *Development*. 2008;135:609-620.
13. Costantini F, Kopan R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Dev Cell*. 2010;18:698-712.
14. Carroll TJ, Park JS, Hayashi S, Majumdar A, McMahon AP. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell*. 2005;9:283-292.
15. Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature*. 1994;372:679-683.
16. Brenner BM. Brenner and Rector's the kidney. Philadelphia: Saunders, Elsevier; 2008.
17. Merlet-Bénichou C, Gilbert T, Vilar J, Moreau E, Freund N, Lelièvre-Pégorier M. Nephron number: variability is the rule. Causes and consequences. *Lab Invest*. 1999;79:515-527.
18. Nyengaard JR, Bendtsen TF. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec*. 1992;232:194-201.
19. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med*. 2003;348:101-108.
20. Dotsch J, Plank C, Amann K, Ingelfinger J. The implications of fetal programming of glomerular number and renal function. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87:841-848.
21. Dotsch J, Plank C, Amann K. Fetal programming of renal function. *Pediatr Nephrol*. 2012;27:513-520.
22. Kuure S, Vuolteenaho R, Vainio S. Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech Dev*. 2000;92:31-45.
23. Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A et al. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature*. 1996;382:73-76.

24. Puelles VG, Hoy WE, Hughson MD, Diouf B, Douglas-Denton RN, Bertram JF. Glomerular number and size variability and risk for kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011;20:7-15.
25. Ishibe S, Karihaloo A, Ma H, Zhang J, Marlier A, Mitobe M et al. Met and the epidermal growth factor receptor act cooperatively to regulate final nephron number and maintain collecting duct morphology. *Development.* 2009;136:337-345.
26. Ritz E, Amann K, Koleganova N, Benz K. Prenatal programming-effects on blood pressure and renal function. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7:137-144.
27. Cheng HT, Kopan R. The role of Notch signaling in specification of podocyte and proximal tubules within the developing mouse kidney. *Kidney Int.* 2005;68:1951-1952.
28. de Zeeuw D, Parving HH, Henning RH. Microalbuminuria as an early marker for cardiovascular disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:2100-2105.
29. Schulz A, Weiss J, Schlesener M, Hansch J, Wehland M, Wendt N et al. Development of overt proteinuria in the Munich Wistar Fromter rat is suppressed by replacement of chromosome 6 in a consomic rat strain. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:113-121.
30. Schulz A, Schütten S, Schulte L, Kossmehl P, Nyengaard JR, Vetter R et al. Genetic locus on MWF rat chromosome 6 affects kidney damage in response to L-NAME treatment in spontaneously hypertensive rats. *Physiol Genomics.* 2010;42:126-133.
31. Schulz A, Hansch J, Kuhn K, Schlesener M, Kossmehl P, Nyengaard JR et al. Nephron deficit is not required for progressive proteinuria development in the Munich Wistar Fromter rat. *Physiol Genomics.* 2008;35:30-35.
32. Rothermund L, Nierhaus M, Fialkowski O, Freese F, Ibscher R, Mieschel S et al. Genetic low nephron number hypertension is associated with dysregulation of the hepatic and renal insulin-like growth factor system during nephrogenesis. *J Hypertens.* 2006;24:1857-1864.
33. Schulz A, Standke D, Kovacevic L, Mostler M, Kossmehl P, Stoll M, Kreutz R. A major gene locus links early onset albuminuria with renal interstitial fibrosis in the MWF rat with polygenetic albuminuria. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:3081-3089.
34. Kreutz R, Kovacevic L, Schulz A, Rothermund L, Ketteler M, Paul M. Effect of high NaCl diet on spontaneous hypertension in a genetic rat model with reduced nephron number. *J Hypertens.* 2000;18:777-782.
35. Poyan Mehr A, Siegel AK, Kossmehl P, Schulz A, Plehm R, de Zeeuw JA et al. Early onset albuminuria in Dahl rats is a polygenetic trait that is independent from salt loading. *Physiol Genomics.* 2003;14:209-216.
36. Schulz A, Schütten-Faber S, van Es N, Unland J, Schulte L, Kossmehl P et al. Induction of albuminuria and kidney damage in SHR by transfer of chromosome 8 from Munich Wistar Fromter rats. *Physiol Genomics.* 2012;44:110-116.
37. Schulte L, Schulz A, Unland J, Schulz H, Hubner N, Schmidt-Ott KM, Kreutz R. MWF rats with spontaneous albuminuria inherit a reduced efficiency of nephron induction during early nephrogenesis in comparison to SHR rats. *J Hypertens.* 2012;30:2031-2038.
38. Mattson DL, Dwinell MR, Greene AS, Kwitek AE, Roman RJ, Cowley AW, Jr., Jacob HJ. Chromosomal mapping of the genetic basis of hypertension and renal disease in FHH rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293:F1905-F1914.
39. Kreutz R, Fernandez-Alfonso MS, Liu Y, Ganten D, Paul M. Induction of cardiac angiotensin I-converting enzyme with dietary NaCl-loading in genetically hypertensive and normotensive rats. *J Mol Med (Berl).* 1995;73:243-248.
40. Kreutz R, Hubner N. Congenic rat strains are important tools for the genetic dissection of essential hypertension. *Semin Nephrol.* 2002;22:135-147.
41. Ijpeelaar DH, Schulz A, Koop K, Schlesener M, Buijn JA, Kerjaschki D et al. Glomerular hypertrophy precedes albuminuria and segmental loss of podoplanin in podocytes in Munich-Wistar-Fromter rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294:F758-F767.

42. Theiler K. *The House Mouse - Atlas of Embryonic Development*. New York, Springer-Verlag 1989.
43. Witschi E, Development: Rat. In: *Growth including reproduction and morphological development*. Altman, PL, and Dittmer DS, ed. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., Washington DC, 1962. pp. 304-314.
44. Boehm B, Rautschka M, Quintana L, Raspopovic J, Jan Z, Sharpe J. A landmark-free morphometric staging system for the mouse limb bud. *Development*. 2011;138:1227-1234.
45. Woolf AS, Kolatsi-Joannou M, Hardman P, Andermarcher E, Moorby C, Fine LG et al. Roles of hepatocyte growth factor/scatter factor and the met receptor in the early development of the metanephros. *J Cell Biol*. 1995;128:171-184.
46. Rapp JP. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev*. 2000;80:135-172.
47. Desai MM, Weissman D, Feldman MW. Evolution can favor antagonistic epistasis. *Genetics*. 2007;177:1001-1010.
48. Boger CA, Chen MH, Tin A, Olden M, Köttgen A, de B, I et al. CUBN is a gene locus for albuminuria. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:555-570.

Anteilserklärung

Publikation 1

Schulte L, Schulz A, Unland J, Schulz H, Hubner N, Schmidt-Ott KM, Kreutz R.
MWF rats with spontaneous albuminuria inherit a reduced efficiency of nephron induction during early nephrogenesis in comparison to SHR rats.
Journal of Hypertension 2012

Anteil: 85 Prozent

Literaturstudium

Planung der Studie

Tierexperimentelle Arbeiten: Terminiertes Verpaaren, Präparation, Anpassung des Entwicklungsstandes

Laborarbeiten: Whole-mount Immunfluoreszenz, Konfokale Mikroskopie, 3D-Rekonstruktion, Geschlechtsbestimmung, Microarray-Vorbereitung (RNA), Realtime PCR

Datenanalyse

Verfassen des Manuskripts

Publikation 2

Schulz A, Schütten-Faber S, van Es N, Unland J, Schulte L, Kossmehl P, de Heer E, Kreutz R
Induction of albuminuria and kidney damage in SHR by transfer of chromosome 8 from Munich Wistar Frömter rats.
Physiological Genomics, 2012

Anteil: 20 Prozent

Tierexperimentelle Arbeiten: invasive und nicht-invasive Blutdruckmessungen, Stoffwechselläufiguntersuchungen, Präparationen

Publikation 3

Schulz A, Schütten S, Schulte L, Kossmehl P, Nyengaard JR, Vetter R, Huber M, Kreutz R
Genetic locus on MWF rat chromosome 6 affects kidney damage in response to L-NAME treatment in spontaneously hypertensive rats.
Physiological Genomics, 2010

Anteil: 30 Prozent

Tierexperimentelle Arbeiten: invasive und nicht-invasive Blutdruckmessungen, Stoffwechselläufiguntersuchungen, Präparationen

Laborarbeiten: Vorbereitung der histologischen Untersuchungen
Überarbeitung des Manuskriptes

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Originalarbeiten

Schulte L, Schulz A, Unland J, Schulz H, Hubner N, Schmidt-Ott KM, Kreutz R. MWF rats with spontaneous albuminuria inherit a reduced efficiency of nephron induction during early nephrogenesis in comparison to SHR rats. *J Hypertens.* 2012;30:2031-2038.

Schulz A, Schütten-Faber S, van Es N, Unland J, **Schulte L**, Kossmehl P, de Heer E, Kreutz R. Induction of albuminuria and kidney damage in SHR by transfer of chromosome 8 from Munich Wistar Frömter rats. *Physiol Genomics.* 2012;44:110-166.

Schulz A, Schütten S, **Schulte L**, Kossmehl P, Nyengaard JR, Vetter R, Huber M, Kreutz R. Genetic locus on MWF rat chromosome 6 affects kidney damage in response to L-NAME treatment in spontaneously hypertensive rats. *Physiol Genomics.* 2010;42:126-133.

Abstrakts - Posterpräsentationen

Grabowski K, **Schulte L**, Witten A, Schulz A, Stoll M, Kreutz R. Genome-wide fetal expression profiling in a genetic model of hypertension supports a fetal genetic predisposition to hypertensive left ventricular hypertrophy. 35. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie 2011“ der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutsche Hypertonie Gesellschaft. http://dx.doi.org/10.5882/10.5882_HYPERTONIE2011_PS14

Grabowski K, **Schulte L**, Witten A, Schulz A, Stoll M, Kreutz R. A genome-wide screen for fetal gene expression in a genetic model of hypertension reveals a fetal genetic predisposition to left ventricular hypertrophy. *J Hypertens.* 2012;Vol. 30;e-Suppl A:35.135.

Unland J, Schütten S, **Schulte L**, Kreutz R, Schulz A. Interaktionen zwischen Testosteron und Genloci auf Chromosom 6 und 8 sind für die Entwicklung einer progressiven Albuminurie bei Munich Wistar Frömter-Ratten verantwortlich. 34. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie 2010“ der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutsche Hypertonie Gesellschaft. *Dtsch Med Wochenschr.* 2010;135:S154.

Sietmann A, **Schulte L**, Huber M, Schulz A, Rühle F, Frey N, Weichenhan D, Völler H, Katus H, Wegscheider K, Krawczak M, von Eberstein H, Schreiber S, Kreutz R, Stoll M. Identifizierung neuer Suzeptibilitätsgene für die Entstehung einer hypertensiven linksventrikulären Hypertrophie mittels vergleichender Genomik. 34. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie 2010“ der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutsche Hypertonie Gesellschaft. *Dtsch Med Wochenschr.* 2010;135:S155.

Schütten S, **Schulte L**, Unland J, Vetter R, Bublath B, Kreutz R, Schulz A. Ein Albuminurie-QTL der Munich Wistar Frömter-Ratte vermag bei Albuminurie-resistenten SHR-Ratten eine Albuminurie zu induzieren. 34. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie 2010“ der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutsche Hypertonie Gesellschaft. *Dtsch Med Wochenschr.* 2010;135:S155.

Schulte L, Schulz A, Sietmann A, Schütten S, Unland J, Grabowski K, Stoll M, Kreutz R. Neue Transkriptionssignaturen und Kandidatengene für Linksherzhypertrophie bei der SHRSP-Ratte. 34. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie 2010“ der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL[®] - Deutsche Hypertonie Gesellschaft. Dtsch Med Wochenschr. 2010;135:S165.

Schulz A, Schütten S, **Schulte L**, Vetter R, Bublath B, Kreutz R. Induction of spontaneous albuminuria in SHR rats by transfer of a genetic locus from the Munich Wistar Frömter rat. Hypertension. 2010;56:1179.

Schütten S, **Schulte L**, Vetter R, Steireif SC, Bublath B, Kreutz R, Schulz A. NO-Inhibition und Transfer von Chromosom 6 von der MWF-Ratte induziert Blutdruckanstieg und Nierenschädigung bei spontan hypertensiven Ratten. 33. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie 2009“ der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL[®]. Dtsch Med Wochenschr. 2009;134:S262.

Schulte L, Schütten S, Unland J, Bublath B, Kreutz R, Schulz A. Androgenverlust schützt vor progressiver Albuminurie bei der Munich Wistar Frömter-Ratte. 33. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie 2009“ der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL[®]. Dtsch Med Wochenschr. 2009;134:S270.

Abstrakt – mündlicher Vortrag

Schulte L, Unland J, Schütten S, Bublath B, Schmidt-Ott KM, Werth M, Kreutz R, Schulz A. Untersuchung der embryonalen Nephronentwicklung bei Munich Wistar Frömter-Ratten mit angeborenem Nephrondefizit und genetischer Nephropathie. 34. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie 2010“ der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL[®] - Deutsche Hypertonie Gesellschaft. Dtsch Med Wochenschr. 2010;135:S142.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Leonard Schulte, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Untersuchung der Nephrogenese und Albuminurie bei der spontan hypertensiven Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum: 21.02.2013

Leonard Schulte

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Reinhold Kreutz für die Ermöglichung dieser Dissertation, zahlreiche Erklärungen und die hilfsbereite und geduldige Unterstützung bei der Zusammenstellung der Arbeit.

Ausdrücklich bedanke ich mich bei Frau Dr. Angela Schulz für ihre immerwährende Betreuung, die bereitwillige Beantwortung aller Fragen, für Ihr Verständnis und Hilfestellungen, die mir unermesslich wertvoll waren.

Herrn Prof. Dr. Kai M. Schmidt-Ott danke ich für die stets intensive Kooperation in der Thematik der Nephrogenese, die Einführung in deren Methoden und die Betreuung am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin.

Einen herzlichen Dank an Claudia Plum und Sabine Wunderlich für mehr als technische Assistenz und Einführung in die Labormethoden. Ihre Ratschläge und unsere Gespräche waren mir eine unschätzbare Motivation.

Bei Bettina und Gerd-Jürgen Bublath, sowie Christiane Priebisch möchte ich mich für die exzellente Tierzucht und Tierhaltung bedanken. Mit ihrer Erfahrung und tatkräftigen Hilfe standen sie mir jederzeit freundschaftlich und beratend zur Seite.

Meinen Freunden und Kollegen Johannes Unland und Dr. Sabrina Schütten-Faber danke ich vielmals für entspannende Gespräche, praktische Unterstützung und viele wertvolle Momente und Erinnerungen.

Für einen stets angenehmen Laboralltag danke ich dem gesamten Arbeitskreis der Klinischen Pharmakologie und Toxikologie.

Prof. Dr. Norbert Hübner, Dr. Herbert Schulz und Sabine Schmidt vom Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin danke ich für die unkomplizierte Kooperation im Zuge der Microarray-Analysen, die Unterstützung bei deren Auswertung und die Bearbeitung der empfindlichen Laborproben.

Meinen Eltern zolle ich meinen ständigen Dank. Ihr habt mein Engagement geweckt, erhalten und gefördert. Danke.