

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

DISSERTATION

Feinkartierung und Identifizierung eines neuen Kandidatengens
im Albuminurie-QTL auf Rattenchromosom 6 der MWF-Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Martina Schmidbauer

aus Cham

Datum der Promotion: 01.03.2019

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
1. Zusammenfassung	10
2. Einleitung	14
2.1 Epidemiologie chronischer Nierenerkrankungen – ein weltweit gesundheitspolitisches Problem.....	14
2.2 Mikroalbuminurie – Frühwarnsystem für renale und kardiovaskuläre Erkrankungen.....	15
2.3 Der renale Filtrations- und Absorptionsapparat – Pathophysiologie der Albuminurie.....	18
2.4 Die Albuminurie – eine komplexe, multifaktorielle Erkrankung.....	21
2.5 Tiermodelle und experimentelle Strategien für die Genidentifizierung komplexer Phänotypen.....	22
2.5.1 Methodischer Wert von Tiermodellen in der biomedizinischen Forschung.....	22
2.5.2 Die Ratte als Tiermodell.....	23
2.5.3 Die Rattenmodelle MWF und SHR.....	23
2.5.4 Von der Kopplungsanalyse zum Kandidatengen.....	24
2.6 Identifikation eines bedeutsamen Albuminurie-QTL auf RNO6 der MWF-Ratte.....	26
2.6.1 Initiale Kopplungs- und Kosegregationsanalysen und weiterführende Validierungsexperimente.....	26
2.6.2 Weitere Eingrenzung und funktionelle Validierung des Albuminurie-QTLs mittels phänotypischer Charakterisierung kongener Rattenlinien....	27
2.6.3 Positionelle Kandidatengenanalyse im feinkartierten U _{Alb1} -QTL auf RNO6.....	29
2.7 Zielsetzung der Arbeit.....	30
3. Material und Methoden	31
3.1 Material.....	31
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	31
3.1.2 Kits.....	31
3.1.3 Puffer und Lösungen.....	32
3.1.4 Gele.....	33
3.1.5 Primer.....	33
3.1.6 Enzyme.....	33
3.1.7 Antikörper und Blockierungspeptide.....	34
3.1.8 Medikamente und Arzneimittel.....	34
3.1.9 Software.....	34

3.1.10	Geräte.....	35
3.1.11	Tierbedarf	35
3.1.12	Sonstiges Material	36
3.2	Methoden	37
3.2.1	Tierhaltung und Zucht.....	37
3.2.1.1	Tierhaltung.....	37
3.2.1.2	Parentaltierstämme und weiterführende Zuchten	37
3.2.2	Phänotypische Charakterisierung	37
3.2.2.1	Blutdruckmessung	38
3.2.2.1.1	Messung des Systolischen Blutdrucks mittels plethysmographischer Blutdruckmessung	38
3.2.2.1.2	Invasive Blutdruckmessung des mittleren arteriellen Drucks	39
a)	Materialvorbereitung	39
b)	Katheterimplantation.....	39
c)	Blutdruckmessung	40
3.2.2.2	Urinuntersuchungen	40
3.2.2.2.1	Uringewinnung	40
3.2.2.2.2	Messung der Albuminkonzentration im Urin.....	41
3.2.3	Organentnahme und Glomeruli-Isolation	41
3.2.3.1	Präparation bei 8 und 24 Wochen alten Tieren	41
3.2.3.2	Präparation bei 4 Wochen alten Tieren	42
3.2.4	Differentielle Genexpressionsanalysen.....	42
3.2.4.1	RNA-Isolierung	43
3.2.4.2	Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung isolierter RNA.....	44
3.2.4.3	cDNA-Synthese durch reverse Transkription.....	44
3.2.4.4	Quantitative Real-Time PCR mit SYBR-Green.....	44
3.2.4.4.1	Primerdesign und -testung	46
3.2.4.4.2	Datenanalyse und statistische Auswertung.....	47
3.2.5	Proteinbiochemie	47
3.2.5.1	Proteinextraktion aus Glomeruliprobe.....	47
3.2.5.2	Proteinbestimmung nach Lowry.....	48
3.2.5.3	Western Blot.....	48
3.2.5.3.1	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS- PAGE) nach Lämmli.....	48
3.2.5.3.2	Probenvorbereitung.....	49
3.2.5.3.3	Blotting	49
3.2.5.3.4	Blocken und Waschen.....	50
3.2.5.3.5	Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern – Immunoblot....	50
3.2.5.3.6	Detektion	51
3.2.5.3.7	Semiquantitative Auswertung.....	51
3.2.5.4	Massenspektrometrie	51

3.2.5.5	Herstellung des polyklonalen Antikörpers Anti-TMEM63C-1	52
3.2.5.6	Immunhistochemische Analyse	52
3.2.6	Graphik und statistische Auswertung.....	53
4.	Ergebnisse.....	54
4.1	Phänotypische Charakterisierung.....	54
4.1.1	Entwicklung der Albuminexkretion im Altersverlauf und vergleichende Analyse.....	54
4.1.2	Analyse des Blutdruckverhaltens.....	56
4.1.2.1	Vergleich des systolischen Blutdruckes.....	57
4.1.2.2	Vergleich des mittleren arteriellen Blutdruckes.....	57
4.2	Differentielle Genexpressionsanalyse	57
4.2.1	Vergleichende Genexpressionsanalyse im Altersverlauf bei männlichen Tieren	57
4.2.2	Vergleichende Genexpressionsanalyse im Altersverlauf bei weiblichen Tieren	59
4.2.3	Vergleichende Genexpressionsanalyse im SHR-Hintergrund.....	60
4.3	Proteinbiochemische Analysen	61
4.3.1	Western Blot	61
4.3.1.1	Vorstudien mit kommerziellen Antikörpern	61
4.3.1.2	Massenspektrometrische Analyse	62
4.3.1.3	Western Blot unter Verwendung des institutseigenen Antikörpers	62
4.3.1.3.1	Qualitätsanalyse der Immunisierung und Aufreinigung	63
4.3.1.3.2	Vergleichende Proteinquantifikation	64
4.3.1.3.3	Expressionsanalyse an humanen Podozyten.....	65
4.3.2	Immunhistochemie.....	66
4.3.3	Massenspektrometrische Analyse	68
5.	Diskussion	69
6.	Literaturverzeichnis	81
7.	Eidesstattliche Erklärung	93
8.	Curriculum Vitae.....	94
9.	Publikationsliste.....	95
10.	Danksagung.....	97

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau des glomerulären Filtrationsapparates und Physiologie der Albuminurie beim Menschen.....	19
Abb. 2: Schematische Darstellung des multifaktoriellen Einflusses auf die Entwicklung, Ausprägung und Aufrechterhaltung der Albuminurie.....	21
Abb. 3: QTL-Substitution mittels Generierung kongener Linien.	26
Abb. 4: Feinkartierung des U_{Aib1} -QTL auf RNO6 und Phänotypisierung ausgewählter kongener Linien (nach RGSC v6.0).	28
Abb. 5: Schematische Darstellung des Katheters für die invasive Blutdruckmessung.....	39
Abb. 6: Exemplarische Darstellung eines RT-qPCR-Laufes.....	45
Abb. 7: Vergleich der Albuminexkretion im Urin im Altersverlauf bei männlichen Tieren.....	55
Abb. 8: Vergleichende Analyse des systolischen und des mittleren arteriellen Blutdruckes zum Zeitpunkt der 14. Woche.....	56
Abb. 9: Differentielle mRNA-Genexpression des Gens <i>Tmem63c</i> bei männlichen Individuen im Altersverlauf.	58
Abb. 10: Differentielle mRNA-Genexpression des Gens <i>Tmem63c</i> bei weiblichen Tieren im Altersverlauf.	60
Abb. 11: Differentielle mRNA-Genexpression des Gens <i>Tmem63c</i> im SHR-Hintergrund.	61
Abb. 12: Qualitätskontrolle des polyklonalen Antikörpers Anti-TMEM63C-1.....	63
Abb. 13: Repräsentativer Western Blot von Glomerulilysaten der Parentalstämme MWF und SHR zum Zeitpunkt der 8. Woche.	64
Abb. 14: Semiquantitative Western Blot Analyse der TMEM63C-Proteinexpression in Glomerulilysaten.....	65
Abb. 15: Nachweis der TMEM63C-Expression in humanen Podozyten im Western Blot.....	65
Abb. 16: Immunhistochemische Färbung des Proteins TMEM63C.....	66
Abb. 17: Vergleichende semiquantitative Immunhistochemie-Analyse der TMEM63C-Expression in Podozyten der Parentalstämme SHR und MWF. ..	67

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einteilung der Albuminurie gemäß den KDOQI-Guidelines [28].	16
Tab. 2: Blutdruckanalyse – Stammübersicht und Tieranzahl.	38
Tab. 3: Albuminurie – Stammübersicht und Tieranzahl.	41
Tab. 4: RT-qPCR – Stammübersicht, Geschlecht und Tieranzahl bei Tieren des MWF-Hintergrundes.	43
Tab. 5: RT-qPCR – Stammübersicht und Tieranzahl bei männlichen Tieren des SHR-Hintergrundes.	43
Tab. 6: Standardprotokoll für die Durchführung der RT-qPCR.	46
Tab. 7: Standard PCR-Protokoll für die Primertestung.	47
Tab. 8: Durchführung der Coomassie-Färbung.	52
Tab. 9: Immunhistochemie – Stämme, Analysezeitpunkte und Tieranzahl.	53
Tab. 10: Prozentuale Beteiligung des $U_{\text{Alb}1}$ -QTL auf RNO6 an der Albuminurie im Altersverlauf.	56
Tab. 11: Ergebnisübersicht der kommerziellen Antikörper in Western Blot-Experimenten.	62

Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit werden die üblichen Symbole und Abkürzungen des internationalen Einheitensystems verwendet.

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of variance
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
AS	Aminosäuren
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
cM	centi Morgan
C _T	cycle threshold
Cu	Kupfer
CUBN	Cubilin
DDT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FEM	Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin
GFB	glomeruläre Filtrationsbarriere
GBM	glomeruläre Basalmembran
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HGSC	Human Genome Sequencing Center
Hmbs	Hydroxymethylbilan-Synthase
HRP	Horseradish peroxidase
I.E.	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilo-Dalton
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KG	Körpergewicht
MA	Mikroalbuminurie
MAD	Mittlerer arterieller Druck

Mb	Megabasen
MG	Molekulargewicht
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MWF	Munich Wistar Frömter
N.	Nervus
NGS	Next generation sequencing
OD	Optische Dichte
p	p-Wert
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
QTL	Quantitative Trait Locus
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RGD	Rat Genome Database
RGSC	Rat Genome Sequencing Consortium
RNA	Ribonukleinsäure
RNO	Rattenchromosom
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	quantitative Real-Time PCR
SBD	Systolischer Blutdruck
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SHR	Spontan Hypertensive-Ratte
Tab.	Tabelle
<i>Tmem63c</i> /TMEM63C	Transmembranprotein 63c
TRPC	transient receptor potential canonical
U _{Alb}	Albuminausscheidung im Urin
Upm	Umdrehungen pro Minute
V.	Vena
WKY	Wistar Kyoto

1. Zusammenfassung

Einleitung: Die Albuminurie (U_{Aib}) gilt als bedeutender, unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung kardio- und zerebrovaskulärer Ereignisse sowie einer progressiven Nephropathie und unterliegt einer komplexen multifaktoriellen Pathogenese unter Beteiligung genetischer Faktoren. Die Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte zeichnet sich durch eine frühzeitig spontan einsetzende U_{Aib} aus und hat sich als Tiermodell für die Identifikation einzelner, kausal an der U_{Aib} beteiligter Gene bewährt. Durch die gezielte Verpaarung von MWF mit dem kontrastierenden, nierengesunden Stamm SHR (Spontan Hypertensive-Ratte) und umfangreicher genetischer Analysen konnte auf Rattenchromosom (RNO)6 ein wichtiger Quantitative Trait Locus (QTL), $U_{Aib}1$ -QTL, für die U_{Aib} -Entwicklung identifiziert werden. Durch den Transfer des $U_{Aib}1$ -QTL aus SHR in den isogenetischen Hintergrund von MWF konnte die kongene Tierlinie MWF.SHR- (*D6Rat1-D6Mgh4*) etabliert werden, welche im Alter von 8 Wochen eine gegenüber MWF um 91% supprimierte U_{Aib} zeigt. Ziel der vorliegenden Arbeit waren die Validierung des $U_{Aib}1$ -QTL für die progressive U_{Aib} -Entwicklung im weiteren Altersverlauf im Tiermodell sowie die molekulargenetische Analyse des innerhalb des $U_{Aib}1$ -QTL kartierenden Gens Transmembranprotein 63c (*Tmem63c*) als potentiell, neuartiges Kandidatengen für die U_{Aib} mit bislang unbekannter Relevanz für Nierenerkrankungen.

Methodik: Die Bestimmung der U_{Aib} im 24h-Sammelurin erfolgte mittels rattenspezifischem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bei 14 und 24 Wochen alten Tieren. Blutdruckabhängige Effekte auf die U_{Aib} wurden mittels invasiver und nicht-invasiver Blutdruckmessung zum Zeitpunkt der 14. Woche erfasst. Die Analysen des Kandidatengens *Tmem63c* umfassten differentielle Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Real Time-PCR (RT-qPCR), Western Blots an Glomeruli-Isolaten und immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten ganzer Nieren bei 4, 8, und 24 Wochen alten Tieren.

Ergebnisse: Der Transfer des $U_{Aib}1$ -QTL aus SHR in MWF resultierte beim kongenen Stamm MWF.SHR- (*D6Rat1-D6Mgh4*) gegenüber MWF in einer signifikanten Reduktion der U_{Aib} um 89% in der 14. Woche und um 68% in der 24. Woche ($p < 0,0001$). Zusätzliche blutdruckabhängige Effekte auf die Suppression der U_{Aib} konnten ausgeschlossen werden. Expressionsanalysen des Gens *Tmem63c* zeigten zu allen

Zeitpunkten ein differentes, allelisch reguliertes Expressionsmuster mit einer gegenüber den nierengesunden Stämmen SHR und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) signifikanten Hochregulation der *Tmem63c* mRNA-Expression beim albuminurischen MWF-Stamm ($p < 0,001$). Mittels Western Blot konnte die Expression des Proteins TMEM63C in den Glomeruli nachgewiesen werden. Immunhistochemisch dominierte zu allen Zeitpunkten eine Expression des Proteins TMEM63C in den glomerulären Podozyten sowie eine im Altersverlauf zunehmende Expression im Bürstensaum proximaler Tubuli.

Schlussfolgerung: Der U_{Aib1} -QTL auf RNO6 ist von erheblicher Relevanz für die Prävention einer progressiven U_{Aib} . Das im U_{Aib1} -QTL kartierte Gen *Tmem63c* stellt ein vielversprechendes, neuartiges Kandidatengen für die U_{Aib} dar, dessen pathophysiologische Bedeutung in weiterführenden Studien im Detail zu untersuchen ist.

Abstract

Background: Albuminuria (U_{Alb}) is an independent risk factor for the development of chronic nephropathy and cardio- or cerebrovascular events in the general population. However, due to the complexity of this phenotype, identification of single causative genetic factors of U_{Alb} is still limited. The Munich Wistar Frömter (MWF) rat represents a model for chronic kidney disease with the development of severe U_{Alb} . By genomic analysis in MWF and normoalbuminuric SHR (spontaneously hypertensive rat) an important quantitative trait locus (QTL) with significant linkage to U_{Alb} was identified on rat chromosome (RNO)6 and termed $U_{Alb}1$ -QTL. By introgressing the $U_{Alb}1$ -QTL from SHR into the isogenetic background of MWF the congenic strain MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) could be established, which shows at the age of 8 weeks a significant 91% reduction of U_{Alb} . Within the $U_{Alb}1$ -QTL a novel putative candidate gene for U_{Alb} , i.e. transmembrane protein 63c (*Tmem63c*), was identified. In this study, the impact of the $U_{Alb}1$ -QTL on the progressive development of U_{Alb} and the potential role of *Tmem63c* as a novel putative candidate gene should be validated.

Methods: U_{Alb} was analysed with a rat-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-technique in 24h-urine in 14 and 24 week old animals. Blood pressure was measured either by intra-arterial and non-invasive tail-cuff measurements at 14 weeks of age. Glomeruli of the kidney were isolated and RNA and protein were extracted. Differentially mRNA expression and protein levels of *Tmem63c* were investigated by Real-time PCR (RT-qPCR) and western blot analysis at week 4, 8 and 24. In addition, immunohistochemistry analysis in paraffin sections of the whole kidney was performed.

Results: Introgressing the $U_{Alb}1$ -QTL from SHR into MWF resulted in a significant decrease in U_{Alb} of about 89% at week 14 and 68% at week 24 compared to MWF ($p < 0.0001$). Blood pressure effects as a causative role of the observed differences on U_{Alb} could be excluded. Expression analyses of *Tmem63c* revealed significant increase in albuminuric MWF compared to SHR and MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) ($p < 0.001$, each timepoint). Western blot analyses validated successfully translation of *Tmem63c* into protein in glomeruli samples. Immunohistochemistry showed strong expression of TMEM63C in glomerular podocytes. Furthermore, progressive staining was also observed in the brush border of the proximal tubulus.

Conclusion: The identified U_{Alb} 1-QTL on RNO6 provides a protective effect in the development and progression of U_{Alb} , when exchanged in MWF. Findings on *Tmem63c* indicate a potential causative role for the development of an albuminuric phenotype in the MWF model and support further translational research on its role for the development of chronic kidney disease.

2. Einleitung

2.1 Epidemiologie chronischer Nierenerkrankungen – ein weltweit gesundheitspolitisches Problem

Chronische Nierenerkrankungen, definiert als >3 Monate bestehende, renale strukturelle oder funktionale Anomalien von gesundheitlicher Relevanz [1], gelten als ein globales gesundheitspolitisches Problem. Schätzungsweise leiden etwa 8-16% der Weltbevölkerung an einer dauerhaften Beeinträchtigung der Nierenfunktion [2], davon bedürfen insgesamt über 3 Millionen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz einer Behandlung in Form der Dialyse (~79%) oder eines Nierentransplantates (~21%) [3]. Ein möglicher Grund für die ansteigende Prävalenz ist der Rückgang infektionsbedingter Ursachen zu Gunsten einer zunehmenden Assoziation chronischer Nierenerkrankungen mit den beiden ebenso weitverbreiteten Volkskrankheiten Diabetes mellitus und Hypertonie, den führenden Ursachen einer terminalen Niereninsuffizienz in entwickelten und vielen aufstrebenden Industrienationen [2,4,5].

Die Destruktion der Nieren beginnt meist schleichend und über Jahre hinweg klinisch inapparent. Hypertensive Patienten beispielsweise entwickeln erst nach 10-15 Jahren eine manifeste Nephropathie [6], die sich initial laborchemisch vor allem in einer pathologischen renalen Proteinausscheidung zeigt, gefolgt von einem Absinken der glomerulären Filtrationsrate (GFR) bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz mit Ausbildung arterio-arteriosklerotischer Schrumpfnieren. Klinisch leiden Patienten mit zunehmend progredientem Verlauf chronischer Nierenerkrankungen neben Allgemeinsymptomen wie verminderter körperlicher Leistungsfähigkeit oder Appetitverlust im Zuge der gestörten exkretorischen und inkretorischen Nierenfunktion an peripheren und zentralen Ödemen, renaler Anämie und Osteopathie. Das Endstadium ist gekennzeichnet durch das Sistieren der Urinproduktion, metabolische Azidose, Elektrolytentgleisungen und Akkumulation harnpflichtiger Substanzen mit urämischer Symptomatik, darunter gastrointestinale Beschwerden, Gewichtsverlust, Pruritus, Polyneuropathie und Enzephalopathie. Auf lange Sicht bleiben den betroffenen Patienten als lebensverlängernde Maßnahmen nur die Anbindung an verschiedene Dialyseverfahren mit nicht unerheblichem individuellem Leidensdruck oder die Nierentransplantation. Interessanterweise zeigte sich bei der Analyse von Daten eine

deutliche Diskrepanz zwischen der Prävalenz chronischer Nierenerkrankungen und der Anzahl an sich aufgrund terminaler Niereninsuffizienz in Behandlung befindlicher Patienten [7]. Dies ist weniger auf den Effekt einer augenscheinlich erfolgreichen therapeutischen Intervention zurückzuführen, sondern vielmehr durch die bereits in frühen Stadien chronischer Nierenerkrankungen etwa 8-fach erhöhten kardiovaskulären Mortalität bedingt [8,9]. Das Risiko, an einem kardiovaskulärem Ereignis zu versterben ist dabei höher, als das Stadium der terminalen Niereninsuffizienz zu erreichen [2, 10]. Damit stiegen chronische Nierenerkrankungen weltweit auch unter Einfluss des demographischen Wandels bis zum Jahr 2010 auf Platz 18 der Todesursachenstatistik (1990: Platz 27). Die Anzahl an Todesfällen aufgrund chronischer Nierenerkrankungen ist dabei innerhalb von zwei Jahrzehnten um 82% gestiegen [11]. Zudem ist davon auszugehen, dass die große Mehrheit an Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz aufgrund eingeschränkter medizinischer und ökonomischer Ressourcen in Drittweltländern, aber auch großen Teilen Asiens unbehandelt bleibt und somit einer offiziellen Registrierung entgehen [12].

Obwohl die gesundheitspolitische Problematik chronischer Nierenerkrankungen in den letzten Jahren immer mehr in den Focus der Aufmerksamkeit gerückt und verstärkt verbesserte Behandlungsstrategien wie die medikamentöse Normalisierung des Blutdruckes und Optimierung der Blutzuckerwerte etabliert wurden [8], nimmt die Anzahl an Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz weltweit stetig zu (Wachstumsrate 2012 auf 2013: 6%) [3]. Angesichts des globalen Ausmaßes und der erheblichen Belastung für das Gesundheitssystem [8] sind die Erforschung zugrundeliegender pathophysiologischer Mechanismen für die Entstehung und Progression chronischer Nierenerkrankungen von erheblicher Relevanz und Fundament für künftige Präventions-, Früherkennungs- und Behandlungsstrategien.

2.2 Mikroalbuminurie – Frühwarnsystem für renale und kardiovaskuläre Erkrankungen

Bereits in den frühen 1980er Jahren wurde für Patienten mit Diabetes mellitus die Ausscheidung von Albumin mit dem Urin als Prädiktor für das Auftreten diabetischer Nierenschäden postuliert [13, 14]. Inzwischen hat sich die erhöhte renale Albuminausscheidung (U_{Aib}) als Kardinalsymptom nicht nur als diagnostischer

Parameter zur Früherkennung, sondern vielmehr auch als prognostischer Marker für die Entwicklung sowie den Verlauf einer Nephropathie bei Diabetikern und Hypertonikern etabliert [1]. Die positive Korrelation zwischen der U_{Alb} und dem renalen Risiko wurde in mehreren Studien belegt [15-17]. Ishani et al. konnten beispielsweise im Rahmen der MRFIT (Multiple Risk Factor Intervention Trial)-Studie zeigen, dass Patienten mit nahezu normwertiger GFR und gleichzeitig bestehender U_{Alb} ein wesentlich höheres Risiko aufwiesen, eine terminale Niereninsuffizienz zu entwickeln, als normoalbuminurische Patienten mit einer eingeschränkten GFR < 60 ml/min [18]. Eine mögliche Erklärung für diesen Zusammenhang lieferten tierexperimentelle Studien, in denen eine nephrotoxische Wirkung von tubulär resorbierten Proteinen nachgewiesen werden konnte, die über Freisetzung inflammatorischer Mediatoren zu vermehrten tubulointerstitiellen Schädigungen des Nierenparenchyms führten [19-23]. Definitionsgemäß werden je nach Ausmaß der U_{Alb} verschiedene Schweregrade unterschieden, die zwar international anerkannt und praktikabel, jedoch relativ willkürlich festgelegt sind [1] (Tab. 1). Besonderes Augenmerk gilt dabei dem Bereich der Mikroalbuminurie (MA), die durch Werte zwischen 30 und 300 mg/24h definiert wird und mit einer Prävalenz von bis zu 39% unter Diabetikern bzw. bei durchschnittlich 12% der hypertensiven Patienten vertreten ist [24-27]. Gilt die MA als früher Marker für eine beginnende, klinisch noch inapparente renale Schädigung im Sinne einer Nephropathie, so kennzeichnet das Auftreten einer Makroalbuminurie (>300 mg/24h oder eine Abweichung vom physiologischen Proteinmuster) hingegen meist einen progressiven Funktionsverlust der Nieren bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz.

Tab. 1: Einteilung der Albuminurie gemäß den KDOQI-Guidelines [28].

Aus Gründen der Praktikabilität wird heute die Bestimmung des Albumin/Kreatinin-Verhältnisses, idealerweise im Morgenurin, bevorzugt. Manche Autoren empfehlen aufgrund des höheren Muskelanteils eine geschlechtsspezifische Korrektur mit niedrigeren Grenzwerten für Männer.

Methoden	Normal	Mikroalbuminurie	Makroalbuminurie
24h-Sammelurin (mg/d)	<30	30-300	>300
Spontanurin (mg/l)	<30	30-300	>300
Albumin/Kreatinin-Verhältnis (mg/g)	<17 (m) <25 (w)	17-250 (m) 25-355 (w)	>250 (m) >355 (w)

m, männlich; w, weiblich

Neben der prädiktiven Bedeutung für die Nierenfunktion ließ sich mit Hilfe verschiedener bevölkerungsbasierter Studien auch eine positive Korrelation zwischen der Höhe der U_{Alb} und dem kardiovaskulären Risiko nachweisen. In der PREVEND

(Prevention of REnal and Vascular ENd stage Disease)-Studie, durchgeführt an einer nicht selektierten Kohorte von über 40.000 Frauen und Männern, zeigte sich, dass eine Verdopplung der U_{Alb} als unabhängiger Risikofaktor mit einem Anstieg der kardiovaskulären Mortalität um 29% und der nicht-kardiovaskulären Mortalität um 12% einhergeht [29]. Ähnliche Daten finden sich auch in der WHO-MONICA-, EPIC-Norfolk- oder Framingham-Studie [30-32]. In einer Analyse von Hochrisikopatienten mit Diabetes mellitus oder vaskulären Vorerkrankungen konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der U_{Alb} um den Faktor 2 unabhängig vom ursprünglichen Ausgangswert eine signifikante Zunahme des Mortalitätsrisikos um 48% bedingt [33]. Diercks et al. kamen bei der Analyse von Daten an Patienten mit vorbestehenden ST-Streckenveränderungen zu dem Ergebnis, dass die MA hinsichtlich ihres relativen Risikos für ein kardiovaskuläres Ereignis anderen klassischen Risikofaktoren wie Nikotinabusus, Hypertonie oder Fettstoffwechselstörungen überlegen zu sein scheint [34]. Dabei scheint sich der schädliche Effekt anderer klassischer arteriosklerotischer Risikofaktoren durch das Vorliegen einer zusätzlichen U_{Alb} hinsichtlich des Eintretens ischämischer Herzerkrankungen signifikant zu potenzieren [30]. Als Ursache für die Assoziation der U_{Alb} mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität wird eine generalisierte Endotheldysfunktion angenommen, die frühzeitig Ausdruck in einer vermehrten renalen U_{Alb} findet [35]. Die kausalen Zusammenhänge sind jedoch im Detail noch nicht geklärt. Möglicherweise begünstigt das Zusammenspiel aus gesteigerter Permeabilität mit Akkumulation von Lipoproteinen in die Gefäßwand [36, 37] und prothrombotischer Komponente mit Störung des vaskulären Tonus, der Hämostase und Fibrinolyse [35, 38, 39] das Auftreten makrovaskulärer Ereignisse [30, 40].

Wenngleich die Rolle als prognostischer Marker initial insbesondere für Diabetiker postuliert wurde [41], scheint die MA jedoch auch jenseits spezieller Risikogruppen von Bedeutung zu sein. Bevölkerungsbasierte Studien belegen, dass die MA innerhalb der Gesamtpopulation bei einem von 15 bis 20 Individuen ohne Diabetes mellitus oder Hypertonie prävalent ist [25, 26] und selbst innerhalb einer scheinbar gesunden Bevölkerungsgruppe ohne typisches Risikoprofil auf ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko hinweist [29, 32]. Von besonderer Beachtung ist auch der Umstand, dass selbst eine U_{Alb} unterhalb des festgelegten Schwellenwertes von 30 mg/24h (Low-Grade-Albuminurie) bereits Hinweise auf eine noch subklinische Vaskulopathie liefert und zu

späteren kardiovaskulären Erkrankungen prädisponiert [29, 32, 42]. Im Umkehrschluss konnten in weiteren epidemiologischen Studien übereinstimmend nachgewiesen werden, dass eine Reduktion der U_{Aib} unter antihypertensiver Therapie wesentlich zur Prognoseverbesserung und Prävention kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität beizutragen scheint [15, 16, 43, 44].

All diese in jüngster Vergangenheit gewonnenen Erkenntnisse finden Einzug in den 2013 veröffentlichten und überarbeiteten KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes)-Guidelines für chronische Nierenerkrankungen, in denen im Sinne der Risikostratifizierung der Schweregrad der U_{Aib} erstmals als eigenständiges Kriterium in das Klassifikationssystem mit aufgenommen wurde [1].

2.3 Der renale Filtrations- und Absorptionsapparat – Pathophysiologie der Albuminurie

Am Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere (GFB) sind drei strukturelle Schichten beteiligt (Abb. 1b): das hochspezialisierte, gefensterete und mit einer negativ geladenen Glykokalyx umgebene Endothel der glomerulären Kapillarschlinge, die glomeruläre Basalmembran (GBM) und das durch Podozytenfortsätze gebildete Schlitzdiaphragma [45, 46]. Dieser komplexe Aufbau ermöglicht eine selektive ladungs-, form- und größenspezifische Filtration des zu filtrierenden Stoffes. Während Wasser, Elektrolyte und niedermolekulare Stoffe <40 kDa die Filtrationsmembran frei passieren können, werden zelluläre Substanzen und großmolekulare Proteine unter physiologischen Bedingungen zurückgehalten [45, 47].

Albumin ist ein in der Leber gebildetes Protein und stellt mit etwa 60% den größten Anteil aller Plasmaproteine im Blut. Neben seiner Transportfunktion für Calcium, Magnesium, Bilirubin, Fettsäuren, Hormone oder Arzneistoffe und seiner Pufferfunktion liegt die physiologische Bedeutung des Proteins vor allem in der Aufrechterhaltung des onkotischen Druckes zwischen Plasma und Interstitium [48, 49]. Mit einem Molekulargewicht (MG) von 69 kDa, einem effektiven Radius von 7,5 nm und einer negativen Nettoladung von -15 wird Albumin durch den oben beschriebenen strukturellen Aufbau der GFB effektiv zurückgehalten [45, 48]. Die Analyse von Daten mehrerer Mikropunktionsstudien konnte zeigen, dass die fraktionelle Filtration von

Albumin unter physiologischen Bedingungen lediglich zwischen 0,01% bis 0,06% der Plasmakonzentration (~40 g/l) beträgt (Abb. 1a) [47, 50].

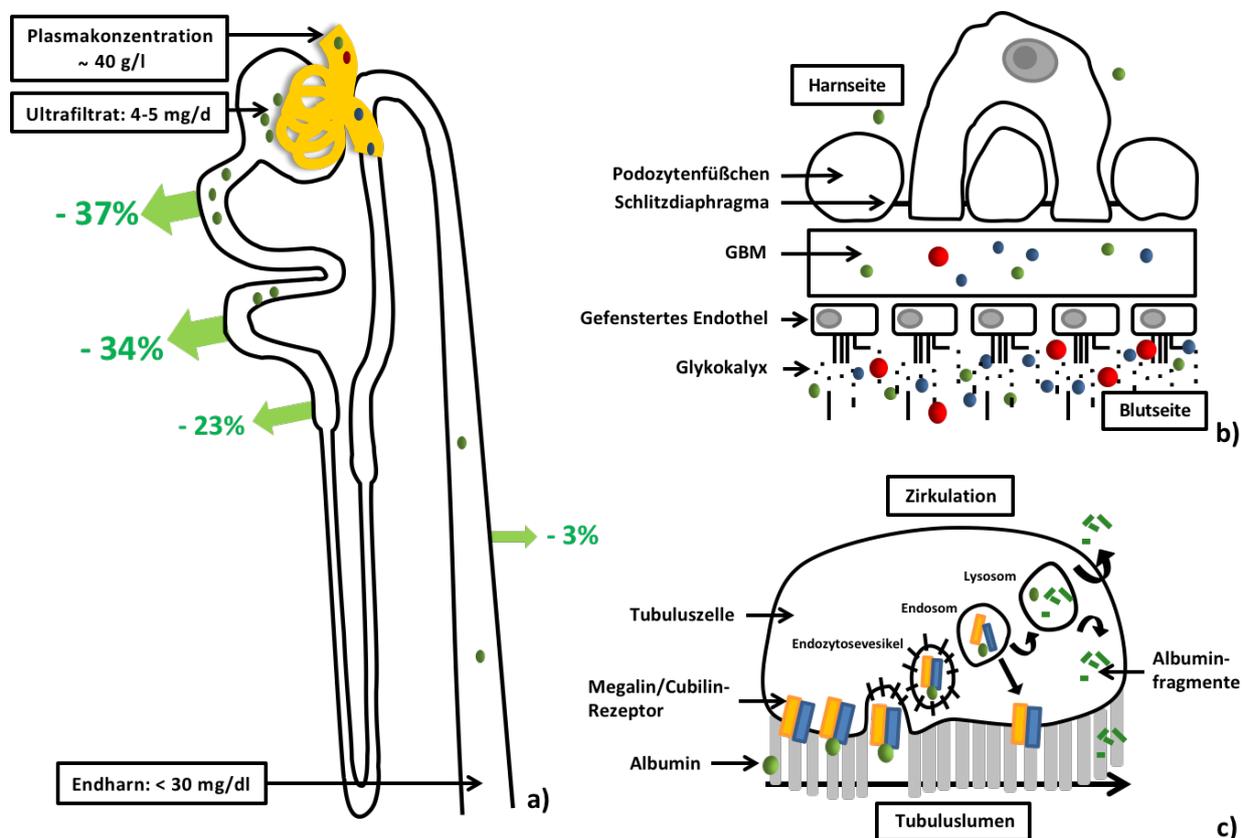


Abb. 1: Schematischer Aufbau des glomerulären Filtrationsapparates und Physiologie der Albuminurie beim Menschen.

a) Albuminfiltration und -resorption. Ausgehend von einer Plasmakonzentration von ~40 g/l und unter Annahme von 180 l Primärharn täglich, werden bei einem Siebkoeffizienten von 0,0001 bis 0,0006 etwa 4-5% der ursprünglichen Plasmakonzentration filtriert. Mehr als 90% des filtrierten Albumins werden im proximalen Tubulus rückresorbiert, kleinere Mengen folgen in distalen Nephronabschnitten, sodass insgesamt ~97% der ursprünglichen Albuminkonzentration im Primärharn rückresorbiert werden. Inwieweit der distale Tubulus physiologisch an der Reabsorption beteiligt ist oder ob die weitere Konzentrationsabnahme auf methodischen Fehlern beruht, ist noch ungeklärt (modifiziert nach [47, 50]).

b) Schematischer Aufbau der GFB. Von außen nach innen: das gefensterte Endothel mit negativ geladener Glykokalyx (200 nm), die GBM (250-400 nm), ein zellloses Maschenwerk aus u.a. Typ IV Kollagen, Laminin, Nidogen und Heparansulfat als restriktiver Raum für die Proteinpassage, und Podozyten, deren fingerförmig ineinandergreifende Fortsätze das Schlitzdiaphragma bilden. Das Zusammenspiel aller drei Schichten bildet einen dynamischen, aber effizienten, form-, ladungs- und größenspezifischen Filter für die überwiegende Anzahl an Plasmaproteinen (modifiziert nach [51]).

c) Reabsorptionsmechanismus des proximalen Tubulus. Nach Bindung an einen Megalin/Cubilin-Rezeptor des tubulären Bürstensaums wird filtriertes Albumin durch Vesikelbildung (coated pits) endozytotisch internalisiert und endolysosomal degradiert. Freie Aminosäuren werden resorbiert und in die Zirkulation freigesetzt, einzelne Peptidfragmente jedoch auch zurück in das Tubuluslumen sezerniert. Megalin und Cubilin dissoziieren pH-abhängig im frühen Endosom und werden erneut in die apikale Tubulusmembran eingebaut (modifiziert nach [22]).

Der überwiegende Anteil des ultrafiltrierten Albumins wird insbesondere im S1 und S2-Segment des proximalen Tubulus mittels eines Megalin/Cubilin (CUBN)-Rezeptorkomplexes endozytotisch aufgenommen und lysosomal in Aminosäuren (AS) zerlegt, so dass letztlich weniger als 3% des filtrierten Albumins mit dem Endharn ausgeschieden werden (Abb. 1c) [47, 50, 52-54].

Die erhöhte U_{Alb} ist somit Ausdruck einer strukturellen oder funktionellen Störung des glomerulären Filtrationsapparates und/oder des tubulären Resorptionsmechanismus. Wenngleich alle drei Schichten des glomerulären Filters essentiell zum selektiven Filtrationsmechanismus beizutragen scheinen [46, 55, 56], so wird den Podozyten eine besonders herausragende Rolle zum Erhalt der Integrität des glomerulären Filters zugesprochen [51]. Einerseits sezernieren Podozyten wichtige Signalstoffe für die Entwicklung und den Erhalt der GBM sowie der Endothelzellen [56, 57], andererseits bilden sie mit ihren Zellfortsätzen unmittelbar eine dichte, strukturelle Barriere für hochmolekulare Stoffe. So führt eine verminderte Anzahl von Podozyten (Apoptose, Ablösung oder Proliferationshemmung), Veränderungen im Aktin-Zytoskelett des Podozyten oder der Verlust diaphragmaler Signalproteine zu einer Störung der Integrität des Schlitzdiaphragmas und somit zu erhöhter Durchlässigkeit [45]. Übersteigt die Konzentration ultrafiltrierter Proteine die tubuläre Resorptionskapazität, resultiert dies konsekutiv in einer pathologischen U_{Alb} .

Der tubuläre Reabsorptionsmechanismus kann jedoch auch primär beeinträchtigt sein. Ein Beispiel hierfür ist das seltene, autosomal rezessive Imlerslund-Gräsbeck-Syndrom, bei dem die betroffenen Patienten aufgrund von Mutationen im CUBN-Gen neben einer Vitamin B12-Malabsorption eine ausgeprägte Proteinurie als Zeichen des molekularen Defektes mit gestörter tubulärer Resorption aufweisen [22]. Auch wenn die Bedeutung des CUBN für die U_{Alb} im Vorfeld bekannt war, konnten Böger et al. erst im Jahre 2011 in einer groß angelegten Assoziationsstudie mit rund 70.000 europäischen und US-amerikanischen Einwohner verschiedener Ethnien erstmals einen Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) im CUBN-Gen in Form einer Missense-Mutation identifizieren, die mit einer erhöhten U_{Alb} assoziiert war [58].

2.4 Die Albuminurie – eine komplexe, multifaktorielle Erkrankung

In Anbetracht der prognostischen Relevanz für renale und kardiovaskuläre Erkrankungen erlangt die Identifizierung kausaler Krankheitsdeterminanten für die U_{Aib} besondere Bedeutung.

Nach aktuellem Kenntnisstand liegt der U_{Aib} eine komplexe, multifaktorielle Genese zu Grunde, bei der sowohl genetische, demographische und ethnische Faktoren als auch diverse Umweltvariablen direkt oder indirekt an der Entstehung und dem Ausprägungsgrad der Erkrankung beteiligt sind [59] (Abb. 2).

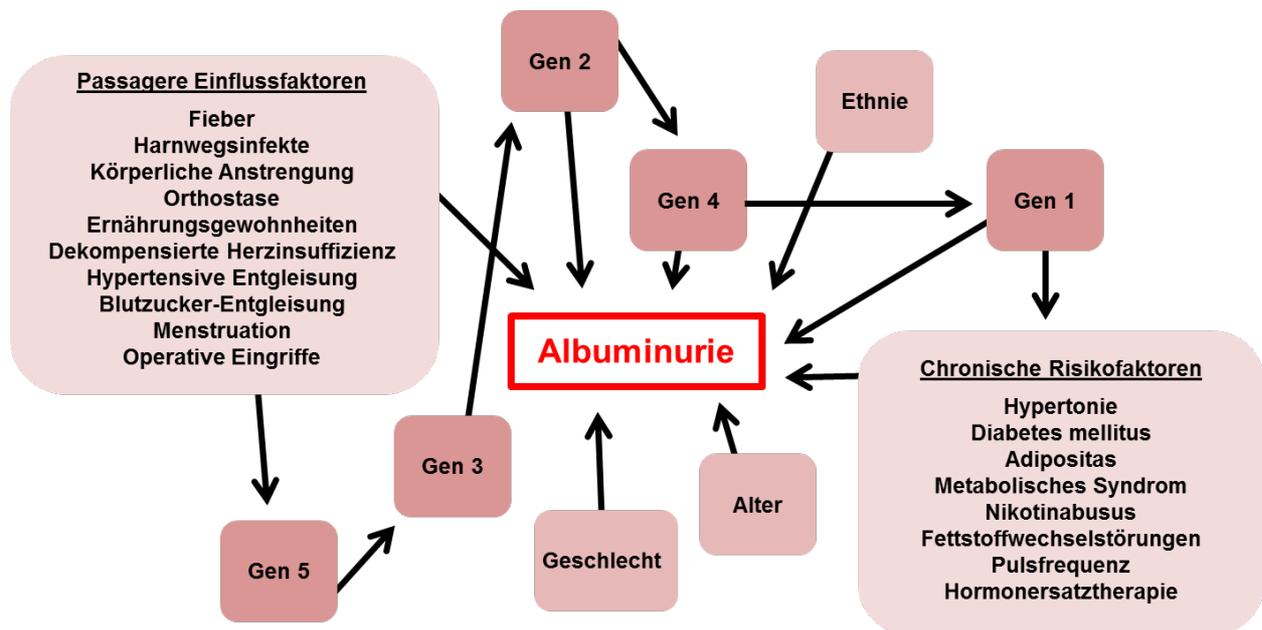


Abb. 2: Schematische Darstellung des multifaktoriellen Einflusses auf die Entwicklung, Ausprägung und Aufrechterhaltung der Albuminurie.

In der Vergangenheit konnte eine Vielzahl pathophysiologisch relevanter und potentiell modifizierbarer Risikofaktoren identifiziert werden, die eine erhöhte U_{Aib} mit verursachen und unterhalten. Die pathophysiologische Relevanz der arteriellen Hypertonie und des Diabetes mellitus ist dabei unbestritten, auch wenn die genauen Mechanismen nicht im Detail geklärt sind [45, 46, 60, 61]. So führen beispielsweise hypertensive Blutdruckwerte auf lange Sicht zu einer Störung der Autoregulation des Vas afferens mit konsekutiver Druckbelastung des glomerulären Kapillarbettes, Destruktion der GFB mit Hyperfiltration von Plasmaproteinen und unter Aktivierung des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System), oxidativem Stress und Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion zu ausgeprägten strukturellen Umbauprozessen bis hin zur Glomerulosklerose, segmentaler Nekrose und tubulointerstitieller Fibrose [62, 63].

Daneben konnten auch der Body-Mass-Index, die Herzfrequenz, Fettstoffwechselstörungen oder Aspekte der individuellen Lebensführung wie Ernährungsgewohnheiten und Nikotinabusus als assoziierte Faktoren identifiziert werden [64-67].

Die Tatsache, dass nur bei einem Anteil der Hochrisikopatienten eine MA prävalent ist, legt die Vermutung nahe, dass genetische Faktoren einen nicht unwesentlichen Anteil zur Prädisposition des Individuums beitragen. Hinweise für den Einfluss einer genetischen Komponente für die U_{Alb} konnten erstmals von Fogarty et al. im Rahmen von Familienanalysen nachgewiesen werden [68, 69]. Mit dem Wissen um die Komplexität des Phänotyps „Albuminurie“ wird jedoch verständlich, dass die Möglichkeiten der Identifizierung kausaler genetischer Determinanten der U_{Alb} im humanen Kontext begrenzt sind. So ist der genetisch determinierte Anteil, wie für quantitative Merkmale typisch, voraussichtlich nicht allein auf die Wirkung eines einzelnen mutierten Genortes zurückzuführen, sondern Resultat multipler Einzelgene, die in ihrer Gesamtheit die Suszeptibilität eines Individuums definieren [59, 70]. Ökogenetische Interaktionen, genetische Heterogenität oder geringe Penetranz sind weitere Phänomene, die eine effiziente genetische Analyse am Menschen behindern [71-73]. Bisher konnten in genomweiten Assoziationsstudien in Abhängigkeit von der untersuchten Population mehrere Genloci für die U_{Alb} auf mehr als der Hälfte aller Chromosomen nachgewiesen werden [74-80]. Die Identifikation einzelner, ursächlich am Phänotyp beteiligter Gene ist auf Grundlage dieser Ergebnisse bisher jedoch noch nicht gelungen.

2.5 Tiermodelle und experimentelle Strategien für die Genidentifizierung komplexer Phänotypen

2.5.1 Methodischer Wert von Tiermodellen in der biomedizinischen Forschung

Für die Erforschung multifaktorieller, polygenetischer Erkrankungen und ihrer komplexen Mechanismen hat sich der Einsatz von murinen Tiermodellen bewährt. Mit Hilfe von ingezüchteten Tierstämmen kann durch selektive Verpaarung merkmalsstragender Tiere (Bruder-Schwester-Verpaarung über >20 Generationen) auf Basis natürlich vorkommender Allelkombinationen der gewünschte Phänotyp genetisch fixiert und unter den Tieren über Generationen hinweg eine genetische Homogenität von über 99% erzielt werden [81]. Durch standardisierte Haltungsbedingungen lässt

sich darüber hinaus der unerwünschte Einfluss exogener, merkmalsbeeinflussender Determinanten minimieren oder vice versa der Einfluss einer Umweltvariablen gezielt untersuchen.

Tiermodelle ermöglichen auf diese Weise eine vereinfachte, reduktionistische Betrachtungsweise komplexer Phänotypen, die es erlaubt, kausale molekulargenetische Grundlagen sowohl am Gesamtorganismus, als auch an isolierten Organsystemen oder auf zellulärer Ebene zu entschlüsseln [82]. Aufgrund gut reproduzierbarer und selbst innerhalb einer kleinen Kohorte statistisch aussagekräftiger und repräsentativ generierbarer Daten können sie so humanen Studien weit überlegen sein.

2.5.2 Die Ratte als Tiermodell

Die Wanderratte (*Rattus norvegicus*), deren wissenschaftliche Nutzung sich auf die 1850er Jahre zurückdatieren lässt, stellt aufgrund einfacher, standardisierter Haltungsbedingungen, einer kurzen Reproduktionsphase, ihrer Körpergröße und der mit dem Menschen vergleichbaren Physiologie ein geeignetes und bewährtes (>1 Mio. Publikationen seit 1966 [83]) Tiermodell in der Forschung dar [84, 85]. Für ein breites Spektrum an neurologischen, kardiovaskulären, endokrinologischen, autoimmunen oder malignen Erkrankungen stehen heute eine Vielzahl an etablierten, physiologisch gut charakterisierten Inzuchtstämmen zur Verfügung ([83], Rat Genome Database (RGD), <http://rgd.mcw.edu/strains>). Durch die Etablierung neuer genomischer Ressourcen rückten jedoch auch zunehmend genetische Fragestellungen in den Mittelpunkt der Forschung. Grundlage hierfür bildete die nahezu vollständige Sequenzierung des Rattengenoms [86], gefolgt von der Entwicklung zahlreicher genetischer Marker, die die Konstruktion einer hochauflösenden genetischen Karte der Ratte und die gezielte Suche nach Kandidatengenen ermöglichten. Zudem steht mit der Erzeugung genetisch veränderter Rattenlinien wie Knockout-, oder transgene Modelle ein potentes Instrument zur Erforschung molekulargenetischer Grundlagen zur Verfügung. Letztlich erlaubt die genetische Homologie von ~90% zwischen Ratte und Mensch [83], die weitere Analyse der Ergebnisse im humanen Kontext.

2.5.3 Die Rattenmodelle MWF und SHR

Die Munich Wistar Frömter-Ratte (MWF) stellt als Sublinie der Munich Wistar-Ratte einen seit 1978 etablierten ingezüchteten Rattenstamm dar, der initial aufgrund seiner phänotypischen Ausprägung von subkapsulär gelegenen Glomeruli in der

normalerweise glomerulifreien Oberfläche des Nierencortex für die Durchführung von Mikropunktionsstudien generiert wurde und sich im Besonderen für die Untersuchung genetischer Grundlagen und pathophysiologischer Mechanismen chronischer Nierenerkrankungen etabliert hat [87-89]. Neben der phänotypischen Besonderheit „subkapsuläre Glomeruli“ zeichnet sich die MWF-Ratte durch eine milde spontane Hypertonie und eine frühzeitig einsetzende U_{Alb} aus [88, 90-92]. Nierenmorphologisch konnten neben einer im Vergleich zu nierengesunden Lewis- und Wistar-Ratten um 27-50% reduzierten Gesamtnephronzahl glomerulosklerotische und interstitielle, fibrotische Veränderungen sowie eine reduzierte Podozytenanzahl nachgewiesen werden [91, 93]. Darüber hinaus ist zwischen weiblichen und männlichen MWF-Tieren ein sexueller Dimorphismus bekannt, der bei Weibchen zu einem insgesamt mildereren albuminurischen Verlauf, einem Ausbleiben der Glomeruloskleroseentwicklung und niedrigeren Blutdruckwerten führt [92, 94-96].

Die Spontan Hypertensive-Ratte (SHR) hat sich als Tiermodell für die Untersuchung kardiovaskulärer Erkrankungen bewährt. Von Wistar-Kyoto (WKY)-Ratten abstammend wurde der SHR-Stamm von Okamoto und Aoki 1969 als hypertensiver Inzuchtstamm etabliert [89, 97, 98]. Phänotypisches Charakteristikum sind die sich frühzeitig manifestierenden, deutlich erhöhten systolischen Blutdruckwerte von 160-200 mmHg [99-101]. Im Gegensatz zum MWF-Stamm weisen SHR-Ratten zeitlebens eine im Wesentlichen gesunde Nierenstruktur auf [102, 103] und zeigen mit zunehmenden Alter eine nur langsame Progression vergleichsweise milder hypertensiver renaler Endorganschäden [104, 105]. Darüber hinaus weisen SHR-Ratten eine physiologische U_{Alb} mit altersentsprechendem, mildem Verlauf auf [93, 106].

2.5.4 Von der Kopplungsanalyse zum Kandidatengen

Eine etablierte Methode für die Identifikation krankheitsassoziiierter Gene stellen Kopplungs- und Kosegregationsanalysen dar. Dabei handelt es sich um statistische Analysen, mit deren Hilfe jene chromosomalen Regionen identifiziert werden können, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in einem kausalen Zusammenhang mit dem gewünschten Phänotypen stehen. Eine chromosomale Region und deren genetische Variation, die an der Ausprägung eines quantitativen Merkmals wie der U_{Alb} beteiligt ist, wird als Quantitative Trait Locus (QTL) bezeichnet. Ausgehend von zwei initial phänotypisch kontrastierenden Inzuchtstämmen können durch ein gezieltes

Verpaarungsschema Individuen generiert werden, die eine breite genetische Variabilität aufweisen und deren Phänotypen mit ihren assoziierten Genotypen kosegregieren. Die Zuordnung eines genetischen Merkmals zu einer chromosomalen Region erfolgt indirekt mit Hilfe genetischer Marker, deren topographische Lage bekannt ist und die als definierte Markierungspunkte im Genom dienen [107, 108]. Bei entsprechender räumlicher Nähe zum gesuchten Genort werden sie gekoppelt mit dem Phänotyp vererbt [70, 109, 110]. Mit Hilfe einer Computersoftware wie MAPMAKER können anschließend an Hand der verwendeten Marker Chromosomenkarten erstellt und jeder Marker auf seine Merkmalskopplung analysiert werden [111].

Ein identifizierter QTL kann im nächsten Schritt durch Etablierung konsomer Rattenstämme validiert werden. Hierfür wird das gesamte, den Locus tragende Chromosom des Donorstammes in den isogenetischen Hintergrund des kontrastierenden Empfängerstammes transferiert [112]. Die Existenz und funktionelle Relevanz des QTL lässt sich nachfolgend in der phänotypischen Untersuchung des konsomen Stammes bestätigen, sofern der erwünschte Phänotyp durch den chromosomalen Austausch induziert beziehungsweise in der Ausprägung minimiert oder eliminiert werden konnte.

Da die initiale chromosomale Kartierung jedoch meist relativ ungenau und der identifizierte Chromosomenabschnitt je nach Markerdichte verhältnismäßig groß und mehrere hundert Gene enthalten kann [71], ist für die gezielte Identifizierung einzelner Kandidatengene eine weitere Eingrenzung des detektierten QTL notwendig. Hierzu werden ausgehend vom konsomen Stamm kongene Linien etabliert, indem mit Hilfe eines markergestützten Zuchtprotokolls sukzessiv kürzere Chromosomenabschnitte des Donorstammes in den Empfängerstamm transferiert und diese anschließend phänotypisch charakterisiert werden (Abb. 3) [113]. Da sich die einzelnen Linien genomisch lediglich in einem kleinen chromosomalen Segment innerhalb eines darüber hinaus einheitlichen Hintergrundgenoms unterscheiden, kann der Effekt des übertragenen QTL-Bereichs auf die phänotypische Ausprägung unmittelbar und unabhängig von potentiellen Einflüssen weiterer Loci analysiert werden [83].

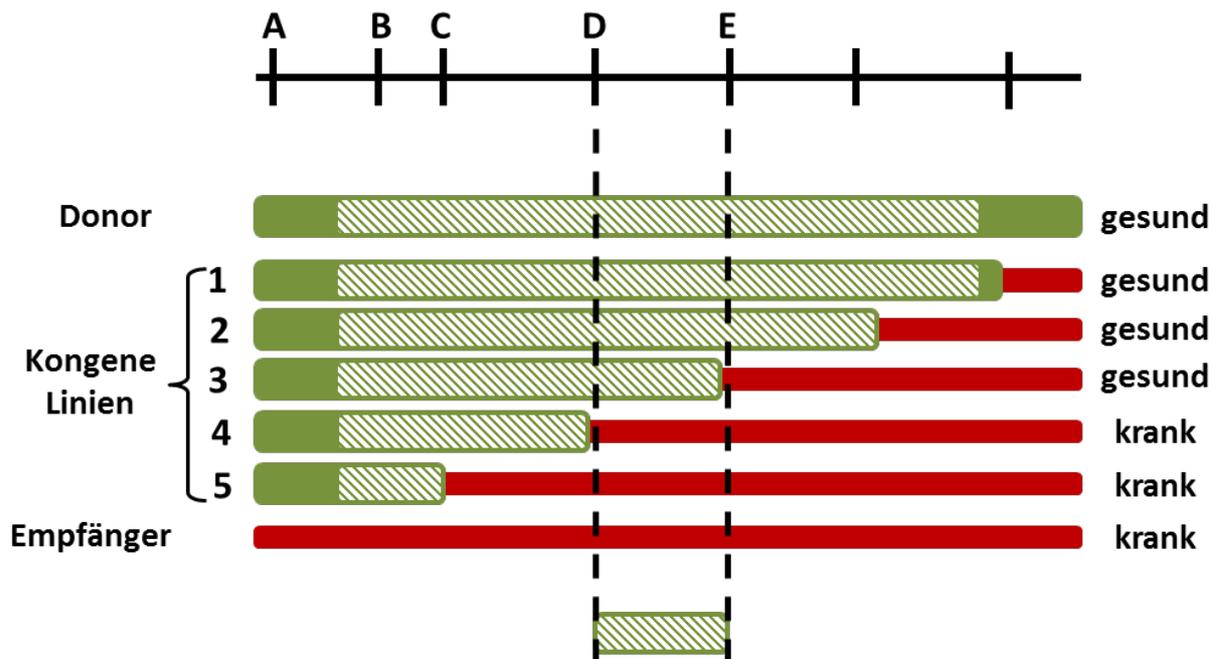


Abb. 3: QTL-Substitution mittels Generierung kongener Linien.

Der initial detektierte QTL-Bereich eines Donorstammes (grün schraffiert) kann unter Bildung kongener Linien näher analysiert werden, indem sukzessiv kleinere Chromosomenfragmente in den isogenetischen Hintergrund des Empfängerstammes (rot) transferiert und die Individuen nachfolgend phänotypisch charakterisiert werden. Während die kongenen Linien 1-3 phänotypisch dem Donorstamm entsprechen (gesund), zeigt Tier 4 durch den Verlust des chromosomalen Anteils zwischen den genetischen Markern D und E die gewünschte Krankheitsausprägung. Dies lässt auf die Lokalisation des oder der krankheitsassoziierten Gene in diesem chromosomalen Abschnitt schließen. Der ursprüngliche QTL kann auf diese Weise eingegrenzt und die Suche nach Kandidatengenen effizienter gestaltet werden (modifiziert nach [70]).

2.6 Identifikation eines bedeutsamen Albuminurie-QTL auf RNO6 der MWF-Ratte

Sämtliche nachfolgend dargestellten genetischen Analysen beziehen sich auf das 2014 durch die Atlas Gruppe am Baylor Human Genome Sequencing Center (HGSC) erstellte Rat Genome Sequencing Consortium (RGSC) Assembly v6.0.

2.6.1 Initiale Kopplungs- und Kosegregationsanalysen und weiterführende Validierungsexperimente

Die Arbeitsgruppe konnte in vergangenen Studien initial über zwei genomweite Kopplungsanalysen einer Backcross-Population zwischen MWF und den kontrastierenden Referenzstämmen Lewis/_{FUB} und SHR/_{Rkb} insgesamt 11 verschiedene QTL auf 10 Chromosomen (RNO1, RNO4, RNO6-RNO9, RNO12, RNO15, RNO17 und RNOX) für die U_{Alb} identifizieren [89, 93, 114]. Dem U_{Alb} -QTL auf RNO6 galt in weiterführenden Untersuchungen besonderes Interesse, da dieser als einziger in

beiden Kopplungsanalysen detektiert werden konnte und im Vergleich die stärkste statistische Kopplung für die U_{Alb} aufwies. Die funktionelle Relevanz des RNO6-QTLs konnte in Vergangenheit durch die Etablierung der konsomen Linie MWF-6^{SHR} bereits validiert werden [115]. Im Vergleich zur nierenkranken MWF-Ratte konnte die U_{Alb} bei männlichen MWF-6^{SHR}-Tieren durch die Substitution von RNO6 von MWF durch SHR in der 8. Woche vollständig auf SHR-Niveau normalisiert und der progressive Anstieg der U_{Alb} im Altersverlauf hochsignifikant supprimiert werden. Darüber hinaus wiesen konsome MWF-6^{SHR}-Ratten eine höhere glomeruläre Dichte und histologisch signifikant geringere nierenpathologische Veränderungen auf [115].

2.6.2 Weitere Eingrenzung und funktionelle Validierung des Albuminurie-QTLs mittels phänotypischer Charakterisierung kongener Rattenlinien

Parallel zu den statistischen Analysen wurde durch die Verpaarung des konsomen Stammes MWF-6^{SHR} mit dem Parentaltierstamm MWF und anschließendem Intercross zwischen F1-Individuen mit der Etablierung kongener Rattenlinien und deren Phänotypisierung begonnen. In Vergangenheit konnten in unserer Arbeitsgruppe insgesamt 13 kongene Stämme etabliert werden, welche sukzessiv kleinere chromosomale RNO6-Fragmente aus SHR in einem darüber hinaus einheitlichen MWF-Hintergrundgenom aufwiesen (Abb. 4). Über anschließende Bestimmung der U_{Alb} bei Tieren der 8. Woche konnte innerhalb des U_{Alb} -QTL auf RNO6 ein chromosomaler Abschnitt, im Folgenden als U_{Alb1} -QTL bezeichnet, identifiziert werden, der insgesamt ~91% der U_{Alb} bedingt (nicht-publizierte Daten der Arbeitsgruppe) (Abb. 4). Der U_{Alb1} -QTL wird definiert durch die beiden kongenen Linien MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*). Während MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*)-Individuen, welche den U_{Alb1} -QTL von MWF tragen, mit 18,1 mg/24h eine mit dem Parentalstamm MWF vergleichbare U_{Alb} aufwiesen, konnte durch den Austausch mit dem korrespondierenden informativen Chromosomenintervall des nierengesunden SHR-Stammes die U_{Alb} bei kongenen MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*)-Ratten signifikant auf 1,5 mg/24h supprimiert werden ($p < 0,0001$).

Um die Grenzen des identifizierten U_{Alb1} -QTL präzise zu kartieren, wurde in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter Leitung von Frau Prof. Dr. Monika Stoll das Genom der beiden Parentalstämme MWF und SHR in diesem chromosomalen Abschnitt im Detail sequenziert (Next generation sequencing, NGS). Auf diese Weise konnte der

feinkartierte U_{Alb} -QTL auf RNO6 neu definiert und letztgültig auf einen Bereich von $\sim 2,5$ cM ($\sim 4,9$ Mb) eingegrenzt werden. Dieser umfasst derzeit 75 sicher kartierte Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>).

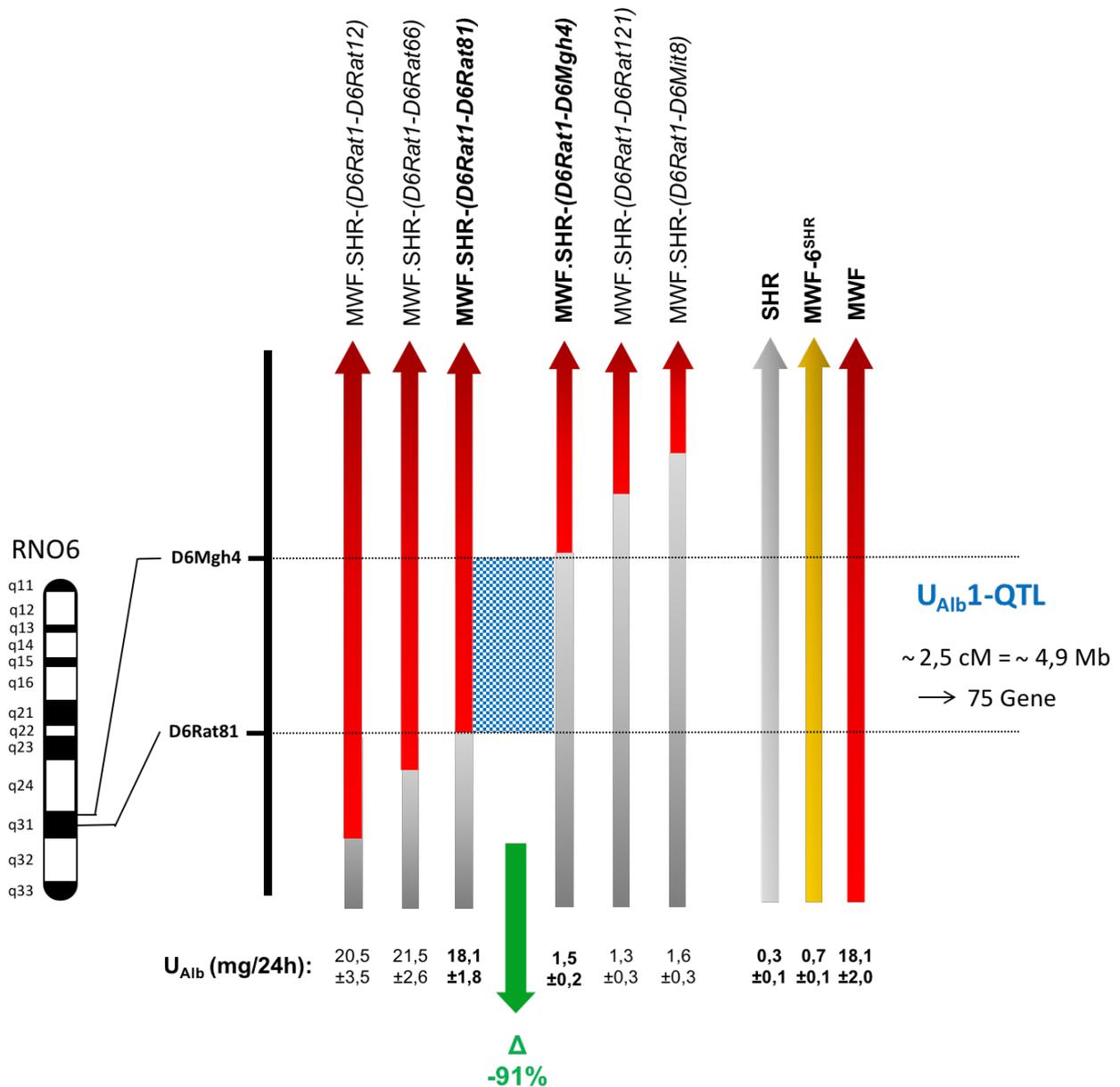


Abb. 4: Feinkartierung des U_{Alb} -QTL auf RNO6 und Phänotypisierung ausgewählter kongener Linien (nach RGSC v6.0).

Von links nach rechts: Transfer sukzessiv kürzerer Chromosomenabschnitte aus MWF (rot) in den isogenetischen Hintergrund von SHR (grau) unter Etablierung kongener Tierstämme. Der diskriminierende chromosomale Bereich (blau) zwischen den kongenen Linien MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat81) und MWF.SHR-(D6Rat1-D6Mgh4) bedingt $\sim 91\%$ der U_{Alb} . Der U_{Alb} -QTL umspannt einen Bereich von $\sim 4,9$ Mb (Basenpaare 106.400.000 – 111.425.000) und beinhaltet derzeit 75 kartierte Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/?org=rattus-norvegicus>). RNO6 modifiziert nach http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Location/Genome.

2.6.3 Positionelle Kandidatengenanalyse im feinkartierten U_{Alb}1-QTL auf RNO6

In orientierenden Expressionsanalysen der innerhalb des U_{Alb}1-QTL kartierten Gene zeigte sich für das zu Beginn dieser Arbeit weitgehend unbekanntes Gen Transmembranprotein 63c (*Tmem63c*), welches zwischen den Basenpaaren 111.049.559 und 111.120.799 auf 6q31 kartiert, zum Zeitpunkt der 8. Woche gegenüber dem Referenzstamm SHR eine über 3-fach erhöhte Expression bei albuminurischen MWF-Individuen (nicht-publizierte Daten der Arbeitsgruppe). Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsrate erschien *Tmem63c* als besonders vielversprechender Kandidat für weiterführende Untersuchungen.

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Angesichts der prognostischen Relevanz der U_{Aib} für renale, kardio- und zerebrovaskuläre Erkrankungen rückt die Erforschung pathophysiologischer Mechanismen der U_{Aib} zunehmend in den Vordergrund. Die Identifizierung krankheitsrelevanter Gene im Tiermodell stellt hierbei einen vielversprechenden Ansatz dar, ein tieferes Verständnis für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der U_{Aib} auf molekulargenetischer Ebene zu erlangen, um künftig neue therapeutische Ansätze für den Menschen entwickeln zu können.

Ziel dieser Arbeit war die weiterführende Validierung des identifizierten $U_{Aib}1$ -QTL auf RNO6 der MWF-Ratte. Hierzu erfolgte die phänotypische Charakterisierung der Parentalstämme MWF und SHR sowie der den $U_{Aib}1$ -QTL definierenden kongenen Tierlinien MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*). Diese Arbeiten umfassten die Bestimmung der U_{Aib} im weiteren Altersverlauf der Tiere sowie invasive und nicht-invasive Blutdruckmessungen zum Ausschluss eines potentiellen blutdruckbedingten Einflusses. Das zwischen den Parentalstämmen MWF und SHR über differentielle Genexpressionsanalysen zum Zeitpunkt der 8. Woche auffällige, innerhalb des $U_{Aib}1$ -QTL kartierende Gen *Tmem63c* sollte über weiterführende mRNA-Expressionsanalysen an den kongenen Linien MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) validiert und unter Berücksichtigung des Altersverlaufs sowie des sexuellen Dimorphismus näher analysiert werden. Die erfolgreiche Translation des Gens sowie stammesabhängige quantitative Unterschiede sollten zudem mittels Western Blot an isolierten Glomeruli eruiert werden. Zusätzliche immunhistochemische Analysen an in Paraffin eingebetteten Nierenschnitten sollten darüber hinaus Aussagen über die genaue Lokalisation des Proteins liefern.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollen in Zukunft neben *Tmem63c* weitere potentielle Kandidatengene des $U_{Aib}1$ -QTL auf RNO6 identifiziert, analysiert und deren funktionelle Relevanz in Hinblick auf pathophysiologische Mechanismen der U_{Aib} näher charakterisiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Firma
Agarose	Invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
BioTherm buffer (10x) ohne MgCl ₂	Rapidozym GmbH
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Merck
Complete mini, Tablette	Roche
dNTPs (2,5 mM)	Rapidozym
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Merck
Glycin	Roth
Isopropanol	Sigma-Aldrich
MgCl ₂ (50 mM)	Rapidozym GmbH
Methanol	J.T. Baker
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Ponceau S	Roth
Rotiphorese Gel 30	Roth
Skim Milk Powder	Fluka
Sodium orthovanadate	Calbiochem
SYBR Green PCR MasterMix	Applied Biosystems
SuperSignal West Pico Chemoluminiszenz-Substrat	Thermo Scientific
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tris base	Roth
Tris-HCl	Roth
Tween 20	Roth

3.1.2 Kits

Substanz	Firma
DC Protein Assay	Bio-Rad
First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas
RNeasy Midi Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen

3.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Bestandteil	Konzentration/Menge
1x PBS	Natriumchlorid	43,8 g
	Kaliumhydrogenphosphat	1,1 g
	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	5,0 g
	Aqua bidest.	ad 1 l, pH 7,4
1x TBST	1x TBS	990 ml
	Tween 20	1 ml
4x 0,5 M Tris-HCl/SDS	Tris base	6,1 g
	HCl	37%
	SDS	0,4 g
	Aqua bidest.	ad 100 ml, pH 6,8
4x 1,5 M Tris-HCl/SDS	Tris base	91 g
	HCl	37%
	SDS	2 g
	Aqua bidest.	ad 500 ml, pH 8,8
5x Lämmli-Probenpuffer	Tris-HCl 0,05 M	1 ml
	SDS 30%	3,3 ml
	DTT 200 mM	0,5 ml
	Glycerol	5 ml
	Bromphenolblau	0,1 ml
	Aqua bidest.	67 µl
10x Lämmli-Laufpuffer	Tris base	75,5 g
	Glycin	360 g
	SDS	25 g
	Aqua bidest.	ad 2500 ml
10x TBS	Tris base	24,4 g
	NaCl	80 g
	HCl	37%
	Aqua bidest.	ad 1 l, pH 7,6
Blotting Puffer	Tris base	7,6 g
	Glycin	37,5 g
	Methanol	500 ml
	Aqua bidest.	2 l
CMR-Puffer	Complete mini	1 Tablette
	Tris-HCl 0,05 M	10 ml
	Sodium orthovanadat 200 mM	0,2 ml
Coomassie-Färbung Färbelösung	Coomassie-Blue G-250	0,2 g
	Methanol 40%	100 ml
	Essigsäure 100%	20 ml
	Aqua bidest.	80 ml
Äquibrierlösung	Essigsäure 100%	10 ml
	Aqua bidest.	190 ml
Fixierlösung	Ethanol 95%	250 ml
	Essigsäure 100%	50 ml
	Aqua bidest.	300 ml

Puffer/Lösung	Bestandteil	Konzentration/Menge
Wasch-/ Entfärbelösung	Ethanol 100%	500 ml
	Essigsäure 100%	100 ml
	Aqua bidest.	400 ml
Eisensuspension	Eisen(II/III)-oxalat Pulver 1x PBS	12,5 g 1000 ml
Heparinlösung (50 U/ml)	Heparin (25000 I.E.)	0,5 ml
	Natriumchlorid-Lösung 0,9%	49,5 ml
Ponceau S-Lösung	Ponceau S	0,5 g
	Essigsäure 100%	1 ml
	Aqua bidest.	ad 100 ml
Sodium orthovanadat 200 mM	Sodium orthovanadat	368 mg
	Aqua bidest.	10 ml

3.1.4 Gele

Gel	Reagenzien	Menge
10% Acrylamid-Trenngel für Western Blot	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	5,0 ml
	Tris-Cl/SDS, pH 8,8	3,8 ml
	Aqua bidest.	6,3 ml
	APS 10%	50 µl
	TEMED	10 µl
3,9% Acrylamid-Sammelgel für Western Blot	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	1,3 ml
	Tris base (pH 6,8)	2,5 ml
	Aqua bidest.	6,1 ml
	APS 10%	50 µl
	TEMED	10 µl
1,5% TAE-Agarosegel für Primertestung	Agarose	0,6 g
	1x TAE	40 ml
	Ethidiumbromid	6 µl

3.1.5 Primer

Gensymbol	Name	Sequenz 5' → 3'	Exon
Hmbs	PBGD-TQ-F	TGAAAACCTTGTACCCTGGCATA	16
	PBGD-TQ-R	TCCAATCTTAGAGAGTGCAGTATCAAGA	17
<i>Tmem63c</i>	Forward	TCAACACCATCGACATGTACA	3
	Reverse	TAGGAAAGCGGAGAAGTAGAC	4+5

3.1.6 Enzyme

Enzym	Aktivität	Firma
Taq-Polymerase	5 U/µl	BioTherm

3.1.7 Antikörper und Blockierungspeptide

	Spezies	Katalog-Nr./ Bezeichnung	Hersteller
Primärantikörper			
anti-Tmem63c	Kaninchen	SAB2103855	Sigma-Aldrich
	Ziege	sc-249033	Santa Cruz
	Kaninchen	HPA030657	Sigma-Aldrich
	Kaninchen	Anti-TMEM63C-1	Thermo Fisher Scientific
anti-beta-actin	Maus	A1978	Sigma-Aldrich
Sekundärantikörper			
anti-mouse	Ziege	A4416	Sigma-Aldrich
anti-rabbit	Ziege	sc-2004	Santa Cruz
anti-goat	Esel	sc-2020	Santa Cruz
Blockierungspeptid			
anti-SAB2103855		AAP49506	Aviva Systems Biology
anti-sc-249033		sc-249033 P	Santa Cruz

3.1.8 Medikamente und Arzneimittel

Medikament	Firma
Atipamezol	Pfizer
Carprofen	Pfizer
Flumazenil – hameln	Inresa
Fentanyl	Janssen – Cilag
Medetomidin	Pfizer
Midazolam	Ratiopharm
Naloxon	Delta Select
S - Ketamin (KetamestS®)	Pfizer
Xylazin (Rompun®) 2%	Bayer
Bepanthen Augensalbe	Bayer

3.1.9 Software

Software	Firma
Bio-1D, Version 12.12	Peqlab Biotechnologie
Lab-Chart, Version 7	ADInstruments
OLIGO, Version 4.1	National Biosciences
Origin, Version 8.1	OriginLab
Powerlab	ADInstruments
PrimerExpress, Version 2.0.0	Applied Biosystems
Revelation G3.04	Dynatech
SPSS, Version 22	IBM

3.1.10 Geräte

Artikel	Firma
ABI prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystem
Blutdrucktransducer direkt	ADInstruments
Blutdrucktransducer Tail-Cuff (Blutdruck-Monitor Mehrkanal System)	TSE
Brigde Amplifier	ADInstruments
Dri-Block®	Techne
Elektrophoresesystem Mini-PROTEAN® 3	Bio-Rad
Elektrophoresesystem Mini Trans-Blot®	Bio-Rad
Feinwaage	Sartorius
Fusion FX7	Peqlab Biotechnologie
GeneGenius Imaging System	Syngene
Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatch
Magnetrührer Combimag RCT	IKA
Mikrozentrifuge DW-41	Qualitron Systems inc.
MRX Microplate Reader	Dynex
NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnologie
PCR-Cycler	MJ Research
pH-Meter	Knick
Präparationsbesteck	Aesculap
Schüttler KM2	Edmund Bühler GmbH
Spannungsgeber PowerPac 300	Bio-Rad
Taumel-Rollenmischer RM5	CAT
Tierwaage	Sauter
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Ultraschallbad Sonorex RK 510	Bandelin
Ultra Turrax T25	Janke & Kunkell
Wärmebox	Werkstatt Charité, CBF

3.1.11 Tierbedarf

Artikel	Firma
Alleinfuttermittel für Ratten	Ssniff
Lochzange für Labortiere	Aesculap
Makrolonkäfig Typ III und Typ IV	Ebeco
Restrainer	Ebeco
Stoffwechsellkäfige für Ratten	Tecniplast

3.1.12 Sonstiges Material

Artikel	Firma
96-Well Mikrotiterplatte	VWR International
Blotting-Papier	GE Healthcare Life Science
DNA Ladder 100 bp	New England BioLabs
Einwegspritzen aus Kunststoff	Braun
Falcon Tubes	Becton, Dickinson and Company
Histoacrylgewebekleber	Braun
Kanülen	Braun
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
MicroAmp® Optical Film Compression Pad	Applied Biosystems
Multipipette plus	Eppendorf
Nahtmaterial	Ethicon
Nitrozellulose-Membran 0,45 µm	GE Healthcare Life Science
PCR-Tubes 0,2 ml	Biozym
Polyethylenschlauch für invasive Blutdruckmessung 0,58 (ID) x 0,96 mm (OD), 0,28 x 0,61 mm	Smith Medical Deutschland GmbH
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional
Precision Plus Protein, All Blue Standards	Bio-Rad
RNAse AWAY	Molecular BioProducts
Safe-Lock Tubes 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
Schrumpfschlauch für invasive Blutdruckmessung	Conrad
Skalpell Gr. 20	Feather
Stahlsieb 71 µm, 125 µm	Retsch GmbH
Standardpipetten	Eppendorf
Standardtips 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Szintillationsgefäße aus Kunststoff	Packard
Verpackungsfolie	Saran
Wattestäbe	Heinz Herenz

3.2 Methoden

3.2.1 Tierhaltung und Zucht

3.2.1.1 Tierhaltung

Die Haltung und Zucht der Ratten erfolgte in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin gemäß den Tierschutzvorschriften des Landesamtes für Gesundheit und Soziales, Berlin.

Jeweils vier adulte Tiere wurden nach Geschlecht getrennt in einem mit Weichholzgranulat ausgelegten und mit Haus, Holzstangen und Zellulosepapier ausgestatteten Makrolonkäfig vom Typ IV vorschriftsgemäß gehalten. Futter und Wasser standen ad libidum zur Verfügung. Zu den standardisierten Bedingungen gehörten ein automatisierter 12h Tag-/Nachtrhythmus und eine konstante Raumtemperatur von 22°C bei 60% Luftfeuchtigkeit. Die Nummerierung der Tiere erfolgte standardgemäß fortlaufend über eine Ohrstanze.

3.2.1.2 Parentaltierstämme und weiterführende Zuchten

Der Parentalrattenstamm MWF wurde ursprünglich aus der Kolonie MWF/Ztm des zentralen Tierlaboratoriums der Medizinischen Hochschule Hannover bezogen und wird seit 1996 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhold Kreutz unter der Stammbezeichnung MWF/_{FubRkb} geführt. Der Parentalstamm SHR entstammt aus der Kolonie SHR/Mol der Firma M&B, Bomholtvej Dänemark, und wurde im Jahr 1997 als eigene Kolonie SHR/_{Rkb} der Arbeitsgruppe eingeführt. Bei beiden Stämmen handelt es sich um etablierte Inzuchtstämme. Die Etablierung konsomer und kongener Rattenlinien erfolgte in umfangreichen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe mit Hilfe eines markergestützten Zuchtprotokolls und anschließender Genotypisierung mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker [114-116]. Die Erhaltungszucht wurde über gezielte Bruder-Schwester-Verpaarung sichergestellt.

3.2.2 Phänotypische Charakterisierung

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen an Ratten wurden unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und durch das Landesamtes für Gesundheit und Soziales, Berlin, genehmigt (Anzeigenummern: G 0255/09 und T 0189/02).

3.2.2.1 Blutdruckmessung

Erhöhte Blutdruckwerte stellen einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung und das progressive Voranschreiten der U_{Aib} dar [117]. Um einen möglichen blutdruckabhängigen Effekt auf die U_{Aib} auszuschließen, wurde der Blutdruck der den identifizierten U_{Aib} 1-QTL auf RNO6 flankierenden kongenen Tierlinien vergleichend mit den Parentalstämmen MWF und SHR und dem konsomen MWF-6^{SHR}-Individuen analysiert. Die Blutdruckwerte wurden bei männlichen Tieren mittels invasiver intraarterieller und nicht-invasiver Messverfahren aus Gründen der Praktikabilität im Alter von 14 Wochen erhoben (Tab. 2).

Tab. 2: Blutdruckanalyse – Stammübersicht und Tieranzahl.

Stamm	Tieranzahl	
	nicht-invasiv	invasiv
SHR	9	9
MWF.SHR-(<i>D6Rat1-D6Rat81</i>)	8	8
MWF.SHR-(<i>D6Rat1-D6Mgh4</i>)	8	8
MWF-6 ^{SHR}	9	6
MWF	10	7

3.2.2.1.1 Messung des Systolischen Blutdrucks mittels plethysmographischer Blutdruckmessung

Der systolische Blutdruck (SBD) wurde am wachen Tier mittels der nicht-invasiven, plethysmographischen Tailcuff-Methode bestimmt [92]. Hierbei handelt es sich um ein mit Riva-Rocci vergleichbares Messverfahren, bei dem eine Blutdruckmanschette über der Schwanzwurzel angebracht und Pulswellen über einen distal davon platzierten piezoelektrischen Drucksensor registriert werden. Die Messung erfolgte mit Hilfe der Powerlab-Software von ADInstruments über eine automatisierte, computergestützte, oszillatorische Technik, bei der Durchblutungsschwankungen in systolische Blutdruckwerte umgesetzt werden.

Um die Messbedingungen zu optimieren, wurden die Tiere zur Ruhigstellung in einen sogenannten Restrainer aus Polyacryl gesetzt und die Messung in einer auf maximal 32°C temperierten Wärmebox durchgeführt, um eine ausreichende Hyperämisierung der Schwanzarterie zu erreichen. Zur Schonung der Tiere wurde der Messvorgang auf maximal 20 min beschränkt. Nach Gewöhnung der Tiere an die Messbedingungen erfolgten mindestens je drei repräsentative Messungen an drei aufeinanderfolgenden Tagen unter Berücksichtigung der zirkadianen Rhythmik. Die Messdaten wurden anschließend arithmetisch gemittelt.

3.2.2.1.2 Invasive Blutdruckmessung des mittleren arteriellen Drucks

Die Messung des mittleren arteriellen Drucks (MAD) erfolgte mittels Implantation eines Femoralkatheters [118].

a) Materialvorbereitung

Der für die invasive Blutdruckmessung benötigte Katheter wurde nach in Abb. 5 gezeigtem Schema im Vorfeld angefertigt. Zwei Polyethylenschläuche unterschiedlichen Durchmessers wurden über einen Schrumpfschlauch miteinander verschweißt sowie in gleicher Weise ein zuvor dreiecksförmig eingeschnittener Schrumpfschlauch unter Ausbildung einer Lasche angebracht. Die Durchlässigkeit sowie Dichtheit des Katheters wurde mittels Spülung mit isotonischer Kochsalzlösung überprüft.



Abb. 5: Schematische Darstellung des Katheters für die invasive Blutdruckmessung.

b) Katheterimplantation

Für das Einbringen des Katheters wurden die Tiere mittels subkutaner Injektion von 0,005 mg/kg Körpergewicht (KG) Fentanyl, 2 mg/kg KG Midazolam und 0,15 mg/kg KG Medetomidin narkotisiert. Nacken- und Leistenbereich wurden rasiert und mit Braunol desinfiziert. Der Eingriff erfolgte in Rückenlage unter Sicherung der Atemwege und Austrocknungsschutz der Augen mittels Bepanthen-Salbe.

Bei ausreichender Narkosetiefe erfolgten ein rechtsseitiger Leistenschnitt und die stumpfe Präparation des subkutanen Fettgewebes. Nach Darstellung des Gefäß-Nervenstranges wurde die A. femoralis vorsichtig mittels Splitterpinzette von N. und V. femoralis freigelegt und jeweils proximal und distal mit chirurgischem Nahtmaterial unter Spannung reversibel abgebunden. Die Arterie wurde mittels einer Irisschere in einem Winkel von 45° zu etwa einem Drittel eröffnet, mit Hilfe einer Mikropinzette vom Uhrmachertyp geweitet, der Katheter vorsichtig eingeführt und nach proximal bis in die Aorta abdominalis vorgeschoben. Der Katheter wurde anschließend proximal und distal der Einschnittsstelle mit Einzelknopfnähten an der Arterie fixiert und dessen Position zusätzlich über eine Naht an der Beinmuskulatur gesichert. Im Folgenden wurde das distale Katheterende mit Hilfe einer Knopfsonde subkutan in dorsokraniale Richtung vorgeschoben und über eine Inzision am Nacken ausgeführt. Die Fixation an der Austrittsstelle erfolgte über die dafür vorgesehene Lasche aus Schrumpfschlauch über

eine Einzelknopfnah. Abschließend wurde die Durchgängigkeit des Katheters mittels Heparinspülung geprüft, der Katheter auf eine Länge von etwa 10 cm gekürzt und verschweißt. Die Wundränder in der Nacken- und Leistenregion wurden mit Histoacrylgewebekleber adaptiert.

Um die Auskühlung der narkotisierten Tiere zu minimieren, wurde zur Antagonisierung der Narkose eine Kombination aus 0,12 mg/kg KG Naloxon, 0,2 mg/kg KG Flumazenil und 0,75 mg/kg KG Atipamezol subkutan injiziert. Zur Schmerzbehandlung wurden noch in der Narkosephase 5 mg/kg KG Carprofen subkutan verabreicht und über eine erneute Injektion alle 24 Stunden für drei Tage sichergestellt. Nach der Katheterimplantation wurden die Tiere isoliert in Makrolonkäfigen vom Typ III gehalten.

c) Blutdruckmessung

Jedes Tier wurde im Wachzustand am Tag der Katheterimplantation und an zwei Folgetagen einer direkten Blutdruckmessung unterzogen. Hierfür wurde der Katheter mit 50 I.E./ml Heparinlösung gespült, mit einem Drucksensor verbunden und der Blutdruck über die Software Powerlab über mindestens 90 sec gemessen. Durch Aufzeichnung der Pulsdruckamplitude konnte anschließend der MAD ermittelt werden. Die erhobenen Werte wurden abschließend gemittelt.

3.2.2.2 Urinuntersuchungen

3.2.2.2.1 Uringewinnung

Für die Uringewinnung wurden die Tiere (Tab. 3) nach einer Gewöhnungsphase jeweils einzeln für 24 h in einen dafür vorgesehenen Stoffwechsellkäfig aus Makrolon gesetzt. Dabei kann der gesamte, in dieser Zeit produzierte Urin getrennt von den Fäzes aufgefangen werden. Futter und Wasser waren frei zugänglich.

Zur Unterbindung von Albuminadhäsionen wurde der gesammelte Urin in Szintillationsgefäße aus Kunststoff dekantiert. Das Volumen wurde durch Auswiegen bestimmt (1 ml = 1 g). Mögliche Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation bei 900 Upm für 10 min bei Raumtemperatur (RT) sedimentiert, der Überstand wurde abpipettiert und bis zu weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Tab. 3: Albuminurie – Stammübersicht und Tieranzahl.

Stamm	Tieranzahl	
	14. Woche	24. Woche
SHR	11	6
MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat81)	7	5
MWF.SHR-(D6Rat1-D6Mgh4)	8	6
MWF-6 ^{SHR}	10	6
MWF	9	9

3.2.2.2 Messung der Albuminkonzentration im Urin

Die Höhe des Albumingehaltes im 24 h-Sammelurin wurde mit Hilfe eines bereits in Vergangenheit eigens in der Arbeitsgruppe etablierten rattenspezifischen Albumin-ELISAs (enzyme linked immunosorbent assay) bestimmt [92, 114]. Dabei konkurrieren das am Mikrotiterplattenboden fixierte Rattenalbumin und freies Rattenalbumin des gesammelten Urins konzentrationsabhängig um die Bindung eines Peroxidase-markierten Anti-Albumin-Antikörpers. Die Peroxidaseaktivität führt unter Zugabe von 3,5',5,5'-Tetramethylbenzidine zu einem blauen Farbumschlag, der sich im Sinne einer Inversreaktion indirekt proportional zur Albuminkonzentration verhält. Die Messung erfolgte photometrisch bei 450 nm im ELISA-MRX-Plate-Reader als Doppelbestimmung anhand einer standardisierten Eichgeraden. Die Albuminkonzentration wurde mit dem Computerprogramm Dynex Revelation G3.04 berechnet und abschließend in mg/24h angegeben.

3.2.3 Organentnahme und Glomeruli-Isolation

Wie bereits einleitend unter 2.3 dargestellt, unterliegt die U_{Alb} einem komplexen Zusammenspiel aus funktionellen Filtrations- und Absorptionsmechanismen. Obwohl die Bedeutung der Reabsorptionskapazität des Tubulusapparates lange Zeit unterschätzt wurde, gilt die Störung der Integrität der GFB und Podozyten weiterhin als Hauptursache für die Entwicklung einer U_{Alb} . Daher erfolgten die Western Blot- und PCR- Analysen an Glomeruli-Isolaten von Tieren der 4., 8. und 24. Woche.

3.2.3.1 Präparation bei 8 und 24 Wochen alten Tieren

Für die Glomeruli-Isolation wurden die Tiere mittels peritonealer Injektion von 87mg/kg KG S-(+)-Ketamin und 13 mg/kg KG Xylazin gewichtsadaptiert narkotisiert. Nach Sicherstellung einer ausreichenden Narkosetiefe wurde das Abdomen über einen medianen Längsschnitt eröffnet. Beide Nieren wurden entnommen, Hilusgefäße und Nierenkapsel entfernt und unter Spülung mit PBS vorsichtig durch ein 125 μ m

großporiges Stahlsieb gerieben, um die Glomeruli von groben Parenchymanteilen zu trennen. Die gewonnene, Glomeruli enthaltene Suspension wurde aufgefangen und in einem weiteren Schritt mittels eines 71 µm-Siebes von restlichen Gewebsbestandteilen getrennt. Die zurückgehaltenen Glomeruli wurden unter Spülung mit PBS in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und bei 15.000 Upm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach Transfer des sedimentierten Pellets in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß erfolgte ein weiterer, analoger Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt [119].

3.2.3.2 Präparation bei 4 Wochen alten Tieren

Bei 4 Wochen alten Tieren erfolgte die Glomeruli-Isolation mit Hilfe einer Eisenperfusion [119]. Hierzu wurde nach Eröffnung des Bauchraumes die Aorta mittels einer Kanüle punktiert und die Nieren mit insgesamt 10 ml 1x PBS, gefolgt von 20 ml Eisensuspension perfundiert. Hierbei erfolgte ein Entlastungsschnitt an der V. portae. Anschließend wurden die Nieren entnommen, entkapselt und unter Spülung mit PBS durch ein 125 µm Sieb gerieben. Die in der aufgefangenen Suspension befindlichen und mit Eisenpartikeln beladenen Glomeruli konnten nun mit Hilfe eines Magneten selektiert und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt werden. Die Proben wurden ebenso in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.4 Differentielle Genexpressionsanalysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels sensitiver RT-qPCR unter Einsatz eines für *Tmem63c* spezifischen Primerpaares weiterführende Expressionsanalysen durchgeführt werden (Tab. 4 und 5). Hierzu zählte initial die Ausweitung der Analyse auf die den U_{Alb1} -QTL flankierenden kongenen Linien MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) sowie auf den konsomen Stamm MWF-6^{SHR}. Zusätzlich wurde im Sinne eines „age of onset“-Effektes die Expression im Altersverlauf evaluiert, die Genexpression weiblicher Tiere aufgrund des bekannten sexuellen Dimorphismus untersucht sowie der konsome Stamm SHR-6^{MWF} analysiert, bei dem vice versa das gesamte RNO6 aus MWF in SHR transferiert wurde.

Tab. 4: RT-qPCR – Stammübersicht, Geschlecht und Tieranzahl bei Tieren des MWF-Hintergrundes.

Stamm	Tieranzahl					
	4. Woche		8. Woche		24. Woche	
	m	w	m	w	m	w
SHR	7	7	6	8	7	5
MWF.SHR-(D6Rat1-D6Mgh4)	8	-	7	-	-	-
MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat81)	7	-	6	-	-	-
MWF-6 ^{SHR}	6	7	6	8	8	7
MWF	8	6	7	7	7	7

Tab. 5: RT-qPCR – Stammübersicht und Tieranzahl bei männlichen Tieren des SHR-Hintergrundes.

Stamm	Tieranzahl	
	4. Woche	8. Woche
SHR	8	7
SHR-6 ^{MWF}	7	11
MWF	7	7

3.2.4.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus den Glomeruliprobe der 8. und 24. Woche erfolgte mit Hilfe des RNeasy Midi Kit von Qiagen gemäß Herstellerprotokoll. Das Prinzip beruht auf einer Bindung der durch mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte mit verschiedenen Puffern isolierten RNA an eine Kieselgelmembran. Die Anreicherungsmenge beläuft sich dabei auf maximal 1 mg RNA mit einer Mindestlänge von 200 bp.

Um einen unerwünschten Verdau der RNA zu vermeiden, wurden zu Beginn Arbeitsflächen und Gerätschaften sorgfältig mit RNase free gereinigt. Zur Lysierung des Glomerulipellets wurden die Proben in 12 ml Greiner Röhrchen überführt, mit Lysepuffer RLT, der initial mit 10 µl β-Mercaptoethanol/ml RLT angereichert wurde, versetzt und durch mehrmaliges Aufziehen durch eine G20 Kanüle homogenisiert. Das eingesetzte Puffervolumen richtete sich dabei nach der Gewebeart und -Menge des zur RNA-Isolierung verwendeten Organs. Im Falle der Glomerulipräparate von Tieren der 8. und 24. Woche bewährte sich der Einsatz von 4 ml Lysepuffer. Durch Zentrifugation wurden verbliebene Zellüberreste abgetrennt und der Überstand in ein 15 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zusatz von 4 ml 70% Ethanol und Lösung der Präzipitate durch kräftiges Schütteln wurde die Probe auf die RNeasy Mini-Säule pipettiert und die enthaltene RNA in einem nachfolgenden Zentrifugationsschritt (5 min bei 5.000 Upm) an die silicagelbasierte Matrix gebunden. Durch mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte mit RW1-Waschpuffer und RPE-Puffer wurde die RNA

aufgereinigt. Die an der Kieselgelmembran gebundene RNA wurde abschließend mit 150 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation (3 min bei 5.000 Upm) eluiert.

Analog hierzu erfolgte die RNA-Isolation aus Glomeruliprobe von Tieren der 4. Woche mit Hilfe des RNeasy Mini Kit von Qiagen. Die maximale Anreicherung der RNA belief sich hierbei auf 100 µg. Das initiale Volumen des mit 2 M Dithiothreitol (DDT) versetzten Lysepuffers betrug 600 µl.

3.2.4.2 Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung isolierter RNA

Die gewonnene RNA wurde photometrisch bei 260 nm (Absorptionsmaximum RNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum Protein) mittels Bestimmung der Optischen Dichte (OD) mit dem Nanodrop auf Reinheit und Quantität geprüft (Optimum OD_{260}/OD_{280} : ~2,0). Für die Konzentrationsbestimmung wurden die einzelnen Proben gegebenenfalls mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Als Leerwert diente Aqua bidest. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

3.2.4.3 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Die weitere molekularbiologische Untersuchung mittels PCR, die auf der Funktionsweise einer DNA-abhängigen Taq-Polymerase beruht, erfordert zunächst die Umschreibung der extrahierten mRNA in komplementäre DNA (cDNA). Die Umschreibung erfolgte mit Hilfe des First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas Life Sciences, welcher als RNA-abhängige DNA-Polymerase die klonierte reverse Transkriptase moloney murine leukemia virus (M-MuLV-RT) enthält.

Initial wurden 2 µg RNA mittels Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 10 µl ergänzt und mit 1 µl Random Hexamer Primer im PCR-Cycler 5 min auf 70°C erhitzt und anschließend 5 min bei 4°C inkubiert (Primerhybridisierung). Im Anschluss wurde der initiale Reaktionsansatz auf Eis mit 4 µl 5x Reaction-Buffer, 1 µl RNase-Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP-Mix und 2 µl M-MuLV versetzt. Die reverse PCR erfolgte im Thermocycler nach folgendem Protokoll: 10 min 25°C, 60 min 37°C, 10 min 70°C, 10 min 4°C. Die cDNA wurde abschließend in einem 1:1-Verhältnis mit Aqua bidest. verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.4.4 Quantitative Real-Time PCR mit SYBR-Green

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte über die quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR), ein Standard-Verfahren, das sich besonders für die präzise Untersuchung einzelner Gene und zur Validierung von Ergebnissen aus Mikroarray-Experimenten

eignet [120]. Mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes kann die Amplifikation in Echtzeit verfolgt werden. Da die Intensität des Farbstoffes sich nahezu proportional zu den in der exponentiellen Phase neu synthetisierten PCR-Produkten verhält, kann so die Ausgangsmenge des Templates präzise bestimmt werden [121].

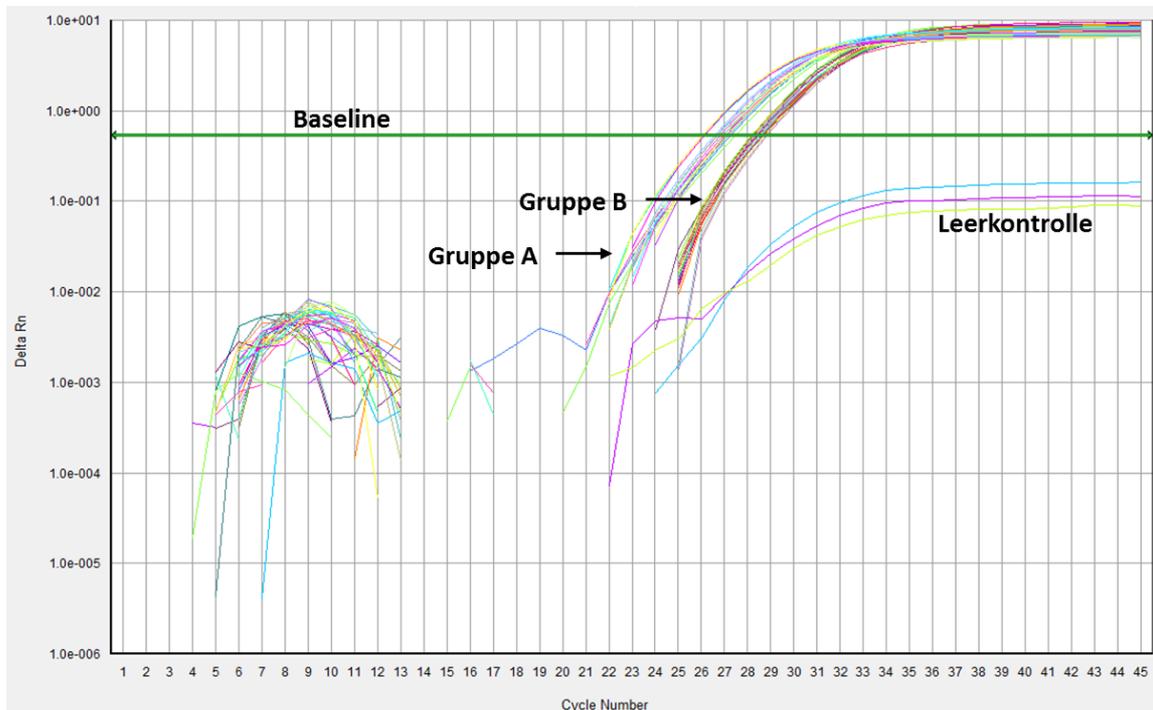


Abb. 6: Exemplarische Darstellung eines RT-qPCR-Laufes.

Gezeigt ist eine RT-qPCR mit Auftrag mehreren Proben zweier zu vergleichenden, in ihrer Expression differierenden Gruppen A und B. Der Kurvenanstieg repräsentiert die exponentielle Amplifikation der Zielsequenz des Gens. Je niedriger der C_T -Wert (Schnittpunkt Baseline), desto höher ist die in den einzelnen Proben enthaltene Genmenge.

Der Grenzwert, bei dem ein deutlicher Anstieg des Fluoreszenzsignals erfasst wird, wird als Fluoreszenz-Schwelle bezeichnet. Idealerweise befinden sich an diesem Punkt alle PCR-Reaktionen in der exponentiellen Phase. Je mehr Kopien des gewünschten Genomabschnittes zu Beginn in der eingesetzten Probe vorhanden sind, desto früher wird ein signifikanter Signalanstieg erfasst. Die entsprechende Zyklusnummer, bei der dieser festgesetzte Schwellenwert erreicht wird, wird durch den C_T -Wert (cycle threshold) angegeben (Abb. 6).

Die RT-qPCR wurde unter Verwendung des SYBR-Green PCR MasterMix durchgeführt. Bei SYBR-Green handelt es sich um ein interkalierendes Fluorophor, das sich unspezifisch an doppelsträngige DNA anlagert und sich durch nahezu universelle Anwendbarkeit und hohe Signalstärke auszeichnet [122]. Der Reaktionsansatz bestand aus 23 μ l Ansätzen mit je 3 μ l cDNA, 12,5 μ l Sybr Green Mastermix Puffer, 11,4 μ l

nukleasefreiem Wasser und je 0,05 µl forward und reverse Primer (Endkonzentration je 300 nM). Die Expressionsanalyse erfolgte für jede Probe anhand einer Dreifachbestimmung in mit selbsthaftender Folie verschlossenen 96 Loch-Platten unter Mitführung einer Leerkontrolle (Aqua bidest.).

Die RT-qPCRs wurden mit Hilfe des ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems durchgeführt. Aufgrund der durch die unspezifische Amplifikatbindung des Farbstoffes möglichen artifiziellen Detektion fehlerhafter PCR-Produkte wurde abschließend eine Schmelzkurvenanalyse zur Qualitätskontrolle angeschlossen. Tab. 6 gibt einen Überblick über den Ablauf und die gewählten Thermocycler-Einstellungen der RT-qPCR.

Tab. 6: Standardprotokoll für die Durchführung der RT-qPCR.

Phase	Reaktion	Zyklusanzahl und –Dauer	Temp. (°C)
Initiale Phase	Aktivierung der Taq-Polymerase	1 x 10 min	95
PCR	Denaturierung der doppelsträngigen cDNA mit Aufspaltung in Einzelstränge.	45 x 15 sec	95
	Annealing und Elongation Primerhybridisierung und exponentielle Vermehrung. Der Farbstoff bindet an das doppelsträngige Amplifikat, resultierend in einem Anstieg des Fluoreszenzsignals.	45 x 1 min	60
Schmelzkurven-analyse	Spaltung von DNA-Doppelsträngen entsprechend ihrer Schmelzpunkte durch schrittweisen Temperaturanstieg.	1 x 15 sec	95
		1 x 20 sec	60
		1 x 15 sec	95

3.2.4.4.1 Primerdesign und -testung

Die entsprechend des zu amplifizierenden Genprodukts eingesetzten Primer wurden mit Hilfe der Software OLIGO, Version 4.1, sowie PrimerExpress, Version 2.0.0, designt und von der Firma TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) bezogen. Die Gensequenzen wurden der in der Ensembl-Datenbank hinterlegten Rattenreferenzsequenz entnommen (<http://www.ensembl.org>) und die Genspezifität der Primer mittels einer BLAST-Analyse sichergestellt.

Die Funktionalität der Primer wurde mittels PCR validiert. Hierfür wurde je 1 µl cDNA mit 49 µl Mastermix, bestehend aus 5 µl 10x PCR-Puffer, 1,5 µl MgCl₂, 5 µl dNTP, 0,8 µl Taq-Polymerase, je 1,5 µl sense und antisense Primer sowie 33,5 µl nukleasefreies Wasser, versetzt. Die PCR erfolgte im Thermocycler nach in Tab. 7 gelistetem Standardprotokoll. Die Amplifikate wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem GeneGenius Imaging System von Syngene visualisiert.

Tab. 7: Standard PCR-Protokoll für die Primertesting.

Die Annealing-Temperatur (kursiv) wurde ggf. in Abhängigkeit der gewählten Primer modifiziert.

Zyklusanzahl	Dauer	Temperatur (°C)
1	5 min	95
	45 sec	94
39	45 sec	60
	45 sec	72
1	10 min	72

3.2.4.4.2 Datenanalyse und statistische Auswertung

Als interne Referenz zur Expressionsrate des Zielgens wurde für jede eingesetzte Probe in einem zweiten Ansatz die Expression der ubiquitären Hydroxymethylbilan-Synthase (Hmbs) (Synonym: Porphobilinogen-Desaminase, PBGD; GenBank Accession-Nr. NM_013168) bestimmt, welches konstant in Geweben expimiert wird [123]. Durch Division der Kopienzahl des Zielgens durch die Kopienzahl des Referenzgens können globalmethodische Fehler ausgeglichen und eine Normierung der Expressionsrate gesuchter Gene ermöglicht werden.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der ABI Prism 7300 Sequence Detection Software SDS 1.3.1 nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Diese liefert als Ergebnis die relative Quantifizierung zwischen einem normalisierten Signalwert der Probe und einem normalisierten Signalwert der Referenz. Zum Vergleich der relativen Expression diente der nierengesunde SHR-Stamm als Kontrollstamm und wurde bezüglich der Expressionsrate auf 100% gesetzt. Die erhobenen Werte der einzelnen zu vergleichenden Gruppen wurden gemittelt und prozentual zur Kontrolle angegeben.

3.2.5 Proteinbiochemie

3.2.5.1 Proteinextraktion aus Glomeruliprüben

Zur Gewinnung des Proteinlysates wurden die Glomerulipellets unter Zugabe von 500 ml CMR-Puffer auf Eis mittels Ultraturrax resuspendiert und das homogene Lysat anschließend für 20 min im Ultraschallbad bei 35.000 Hz aufgeschlossen. Die Proben wurden daraufhin weitere 30 min mit 5.000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in mehrere Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2.5.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Lowry-Methode [124] unter Verwendung des Bio-Rad DC Protein Assays. Das Prinzip beruht auf der Reaktion von Proteinen mit Cu^{2+} -Ionen, die im alkalischen Milieu zu Cu^+ -Ionen reduziert werden (Biuretreaktion). Diese führen wiederum zur Reduktion des gelben Folin-Reagenz zu Molybdänblau. Die Proteinmenge kann anschließend spektrometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 750 nm quantifiziert werden.

Die Proteinbestimmung erfolgte in 96 Loch-Mikropipettierplatten. Pro Loch wurden 5 μl Protein eingesetzt und mit den Reagenzien entsprechend des Herstellerprotokolls versetzt. Als Standard diente 30%iges bovines Serumalbumin (BSA), das mittels Extraktionspuffer als Verdünnungsmedium unter Bildung einer Eichkurve eingesetzt wurde. Die messbare Proteinkonzentration betrug 0,0 mg/ml bis maximal 3,0 mg/ml. Die Messung erfolgte im Falle des Standards in einer Zweifach-, für die einzelnen Proben in einer Dreifachbestimmung. Die fertig pipettierte Platte wurde für 15 min bei RT inkubiert und die Proteinkonzentration anschließend photometrisch gegen Luft als Leerwert im Dynex Plattenphotometer bestimmt.

3.2.5.3 Western Blot

Der Western Blot, ursprünglich konzipiert von Towbin et al., stellt eine Methode zur semiquantitativen Darstellung von Proteinen dar, die mittels Elektrophorese nach Ladung, Form und Größe aufgetrennt, auf eine adsorbierende Membran transferiert und mit spezifischen Antikörpern indirekt detektiert werden können [125]. Für die einzelnen Arbeitsschritte wurden zahlreiche Modifikationen entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten nach umfangreichen optimierenden Vorversuchen unter den nachfolgend beschriebenen Bedingungen die besten Resultate erzielt werden.

3.2.5.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte nach der sogenannten diskontinuierlichen, denaturierenden Methode mittels SDS-PAGE nach Lämmli [126]. Hierbei werden die aufgetragenen Proben mit dem negativ geladenen SDS-haltigen Puffer versetzt, wodurch die Überdeckung der Eigenladung von Proteinen erzielt werden kann. Zudem ermöglicht die Behandlung mit Hitze oder der Zusatz eines Reduktionsmittels wie DDT oder Mercaptoethanol die Denaturierung von Proteinen mit

Verlust übergeordneter Faltstrukturen, so dass die Auftrennung letztlich nur noch an Hand des MGs erfolgt.

Für die SDS-PAGE wurde nach Säuberung der Glasplatten mit 70%igem Ethanol ein 10%-iges Polyacrylamid-Trenngel als Trägermatrix mit 1,5 mm Dicke gegossen und für einen gleichmäßigen Abschluss mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Gels und Abgießen des Isopropanols wurde das Trenngel mit einem 3,9%-igen Sammelgel überschichtet und ein 10- oder 15-fächiger Kamm unter Vermeidung von Luftblasenbildung eingelassen. Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung des Mini-PROTEAN® 3 Elektrophoresesystems. Das erhärtete Gel wurde eingesetzt und die Taschen nach Entfernen des Kammes mit Laufpuffer gespült. Je Tasche wurden 40 µg Protein aufgetragen sowie bei jedem Lauf 15 µl eines molekularen Größenmarkes mitgeführt. Die Elektrophorese wurde unter einer aufsteigenden Spannung von 80-120 V durchgeführt und beendet, sobald die Lauffront das Gelende erreicht hatte oder eine ausreichende Auftrennung der Proteinbanden erzielt wurde.

3.2.5.3.2 Probenvorbereitung

Für die Beladung der Geltaschen wurde den einzelnen Proben jeweils ein 5-fach-Laufpuffer, CMR-Puffer und Aqua bidest. hinzugefügt. Die einheitliche Endkonzentration der Proteinproben betrug dabei 1 µg /1 µl. Die Proben wurden vor dem Auftragen bei 37°C für 20 min inkubiert.

3.2.5.3.3 Blotting

Nach Laufende wurde das Gel aus den Glasscheiben gelöst und zunächst für 10 min in Blotting-Puffer äquilibriert, um Reste des Elektrophoresepuffers zu entfernen und die Formkonstanz des Gels während des nachfolgenden Transferprozesses sicherzustellen. Anschließend erfolgte die Übertragung der aufgetrennten Proteine des Gels auf Nitrozellulosemembranen mittels Nass-Transfer, bei dem die Elektroelution über eine vollständige Immersion des Blot-Sandwiches im Transferpuffer erfolgt. Die Blotting-Kammern wurden mit kaltem Transferpuffer gefüllt und die Kühlung mit Hilfe eines Kühlaggregates aufrechterhalten. Mittels Blottingpapieren und entsprechenden Schwammpolstern wurde ein luftblasenfreier und stabiler Kontakt von Membran und Gel in der Blotkassette gewährleistet („Sandwich“), sodass ein exaktes Replikat des

Proteinmusters auf die Membran resultierte. Die Transferzeit belief sich auf 70-80 min unter einer kontinuierlichen Spannung von 100 V.

Nach dem Blotten wurde die Effizienz des Transfers durch Inkubation der Membran in Ponceau S-Lösung für 1-2 min überprüft. Dieser Farbstoff ermöglicht eine reversible, unspezifische Färbung aller gebundenen Proteine und wurde nach Dokumentation des Blots durch zweimalige Spülung mit je 100 ml TBS für 10 min wieder vollständig entfernt.

3.2.5.3.4 Blocken und Waschen

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran anschließend für 60 min unter leichtem Schütteln in 100 ml 5%iger TBST-Milch bei RT inkubiert und anschließend mehreren Waschschritten unterzogen (3 x 10 min in 50 ml TBST, 2 x 10 min in 50 ml TBS).

3.2.5.3.5 Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern – Immunoblot

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in einem Falconröhrchen über Nacht bei 4°C auf dem Rollenmischer oder alternativ für 1h bei RT. Pro Membran wurde je eine Antikörperkonzentration von 1:1.000 gelöst in 5 ml 0,5%iger TBST-Milch eingesetzt.

Um den nichtgebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran nachfolgend mehreren Waschschritten unterzogen (2 x 10 min in 50 ml TBST, 2 x 10 min in 50 ml TBS). Anschließend erfolgte für 60 min die Inkubation der Membran mit dem entsprechenden horseradish peroxidase (HRP) markierten Sekundärantikörper im Verhältnis 1:3.000-1:30.000 bei RT. Überschüssiger Antikörper wurde analog zum Primärantikörper in mehreren Waschschritten entfernt (2 x 10 min in 50 ml TBST, 2 x 10 min in 50 ml TBS).

Die Spezifität der Antikörper SAB2103855 und sc-249033 wurde zusätzlich durch Einsatz des jeweils kommerziell erhältlichen Blockierungspeptides überprüft. Dabei handelt es sich um synthetisierte Peptide, welche über spezifische Epitopbindung zur Absättigung des eingesetzten Antikörpers führen. Die Detektion von Banden, die auf einer spezifischen Antigen-Antikörperreaktion beruht, bleibt somit im nachfolgenden Immunoblot aus, wohingegen verbleibende Signale auf unspezifischen Bindungen beruhen. Hierfür erfolgte eine Vorinkubation des jeweiligen Primärantikörpers mit dem korrespondierenden Blockierungspeptid nach Angaben des Herstellers.

3.2.5.3.6 Detektion

Die Detektion erfolgte unter Verwendung einer Chemilumineszenzlösung SuperSignal West Pico bzw. Dura Chemiluminescent Substrate nach Angaben des Herstellers. Grundlage ist die chemische Reaktion des zyklischen Diacylhydrazides Luminol, das in Anwesenheit von peroxidhaltigem Puffer und HRP zu einem lichtemittierenden Intermediat oxidiert. Die Lumineszenz beschränkt sich dabei auf den Bereich der immunologisch markierten Proteinbande.

Die Membran wurde für 5 min in insgesamt 4 ml Lösung inkubiert und der Blot mit dem Peqlab Fusion Dokumentationssystem digital entwickelt. Die Belichtungszeit belief sich auf 30 sec bis 6 min.

3.2.5.3.7 Semiquantitative Auswertung

Die Auswertung der Proteinexpression erfolgte unter Normierung der spezifischen Proteinmenge auf das Referenzprotein beta-Actin, das in allen Geweben homogen exprimiert wird. Hierdurch konnten eine gleichmäßige Beladung überprüft und durch die Normierung methodische Fehler ausgeglichen werden. Die Inkubation der Membran erfolgte mit einem primären mouse anti-beta-Actin- und sekundären goat anti-mouse-Antikörper mit einer Konzentration von je 1:5.000 für 1 h bei RT.

Die Bandenintensität wurde mit der Software Bio-1D 12.12 von Peqlab quantifiziert. Für jede Probe wurde der Quotient aus der Proteinmenge TMEM63C und beta-actin ermittelt und die Werte innerhalb eines Rattenstammes gemittelt.

3.2.5.4 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Untersuchung im Rahmen der Proteinanalyse wurde von der Firma Proteome Factory AG (Berlin, Deutschland) mittels nanoHPLC-ESI-MS/MS-Technologie durchgeführt. Hierfür erfolgte eine SDS-PAGE nach den unter Abschnitt 3.2.5.3 genannten Bedingungen. Die Proteinbanden der Gelmatrix wurden nachfolgend mit Coomassie unspezifisch gefärbt, die zu analysierenden Banden ausgeschnitten und in Eppendorf-Gefäße zur Analyse eingeschickt. Die für die Färbung notwendigen Schritte sind in Tab. 8 gelistet.

Tab. 8: Durchführung der Coomassie-Färbung.

Schritt	Bedingung
Fixierung	1 h bei RT, Schüttler
Waschung	über Nacht bei RT, Schüttler
Färbung	2-3 h bei RT, Schüttler
Entfärbung	1 h bei RT, Schüttler
Äquilibrierung	1 h bei RT, Schüttler

3.2.5.5 Herstellung des polyklonalen Antikörpers Anti-TMEM63C-1

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein zusätzlicher gegen TMEM63C gerichteter Antikörper für die Western Blot Analyse generiert. Die Immunisierung und Aufreinigung erfolgte über die Firma Thermo Fisher Scientific. Als Wirt dienten Kaninchen, aus denen im Vorfeld zwei Individuen ausgewählt wurden, deren Präimmunseren im Western Blot zu keiner oder einer möglichst geringen, unspezifischen Bandendetektion führten. Beide Kaninchen wurden anschließend mit einem für TMEM63C spezifischen Peptid (Sequenz: GLRGFARELDPAQFQEGLE) grundimmunisiert und erneut nach 14, 42, 56, und 60 Tagen insgesamt vier weitere Male geboostet, um eine ausreichende Immunreaktion zu induzieren. Durch die Kürze des gewählten Epitops sollte das Risiko einer möglichen Kreuzreaktivität verringert werden. Die Spezifität für TMEM63C wurde über BLAST-Recherchen sichergestellt.

Um den Erfolg der Immunisierung zu protokollieren, wurde den Tieren im Verlauf dreimalig Blut entnommen und die spezifische Antikörperproduktion mittels ELISA ermittelt. Die Titer betragen hierbei jeweils 1:200.000. Final wurde das Blut eines Kaninchens entnommen und das Serum affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die gewonnene spezifische IgG-Antikörperkonzentration betrug 1,69 mg/ml. Der Antikörper wird im Folgenden als Anti-TMEM63C-1 bezeichnet.

3.2.5.6 Immunhistochemische Analyse

Ergänzend zu den Western Blot-Analysen sollte mittels der Immunhistochemie neben der Frage der Quantität auch die Lokalisation des Proteins TMEM63C näher charakterisiert werden. Die immunhistologischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Pathologie des Leiden University Medical Center, Niederlande, unter Leitung von Assistenz-Professorin Dr. Marion Scharpfenecker durchgeführt. Die Analysen erfolgten an deparaffinisierten, 4 µm dünnen Nierenschnitten von 4, 8 und 24 Wochen alten MWF- und SHR-Tieren unter Verwendung des Antikörpers Anti-TMEM63C-1 (1:1600) (Tab. 9).

Tab. 9: Immunhistochemie – Stämme, Analysezeitpunkte und Tieranzahl.

Stamm	4. Woche	8. Woche	24. Woche
SHR	5	6	4
MWF	9	7	8

Als Sekundärantikörper diente der goat anti-rabbit Dako EnVision. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Bildanalyseprogrammes ImageJ. Je histologischem Schnitt wurde die Signalintensität von je 15 willkürlich ausgewählten Glomeruli bestimmt und abschließend der Mittelwert aus den erhobenen Daten berechnet.

3.2.6 Graphik und statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm SPSS, Version 22. Die Signifikanz wurde im Falle eines Mehrgruppenvergleiches mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) sowie dem Bonferroni POST-HOC-Test, im Zweigruppenvergleich mittels t-Test oder Mann-Whitney-U-Test überprüft. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert <0,05 angenommen. Die erhobenen Albuminwerte im Urin wurden vor der statistischen Auswertung logarithmiert. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Für die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Origin, Version 8.1 verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Phänotypische Charakterisierung

Um den phänotypischen Einfluss des U_{Alb1} -QTL auf RNO6 zu überprüfen, wurden im Altersverlauf zu definierten Zeitpunkten die U_{Alb} sowie Blutdruckwerte nach einem standardisierten Versuchsprotokoll ermittelt. Die nachfolgend dargelegten Ergebnisse der U_{Alb} zum Zeitpunkt der 8. Woche beruhen auf im Vorfeld dieser Arbeit generierten Daten (siehe 2.6.2 und 2.6.3) und werden im Folgenden aus Gründen der Verlaufsbeurteilung aufgeführt.

4.1.1 Entwicklung der Albuminexkretion im Altersverlauf und vergleichende Analyse

Die Entwicklung der U_{Alb} im Altersverlauf ist in Abb. 7 graphisch dargestellt. Wie bereits unter Punkt 2.6.2 dargelegt, weisen MWF-Männchen bereits in der 8. Lebenswoche eine mit $18,1 \pm 2,0$ mg/24h erhöhte Albuminkonzentration im Urin auf, die durch den Austausch von RNO6 bei männlichen Individuen des MWF-6^{SHR}-Stammes auf SHR-Niveau normalisiert werden konnte ($p < 0,0001$) [115]. Durch die Substitution des U_{Alb1} -QTL von MWF durch den entsprechenden Chromosomenabschnitt aus SHR konnte die U_{Alb} der kongenen Linie MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) um 16,6 mg/24h gesenkt werden, was einem prozentualen Anteil von 91% entspricht ($18,1 \pm 2,0$ mg/24h vs. $1,5 \pm 0,2$ mg/24h; $p < 0,0001$). Um die funktionelle Relevanz des identifizierten U_{Alb1} -QTL auf RNO6 auch im Altersverlauf zu analysieren, wurden die Albuminkonzentrationen im Urin im Rahmen dieser Arbeit bei 14 und 24 Wochen alten Tieren ermittelt.

Zum Zeitpunkt der 14. Woche konnte bei MWF-Männchen im Vergleich zur 8. Woche mit $39,4 \pm 3,6$ mg/24h ein weiterer Anstieg der U_{Alb} verzeichnet werden, der gegenüber SHR, MWF-6^{SHR} und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) hoch signifikant erhöht war ($p < 0,0001$). Durch die Substitution des U_{Alb1} -QTL-tragenden Intervalls aus SHR konnte bei kongenen MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*)-Tieren die U_{Alb} gegenüber MWF um 89% auf $4,3 \pm 1,0$ mg/24h supprimiert werden ($p < 0,0001$), wohingegen MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*)-Männchen mit MWF vergleichbare Albuminkonzentrationen im Urin aufwiesen ($50,7 \pm 7,3$ mg/24h vs. $39,4 \pm 3,6$ mg/24h).

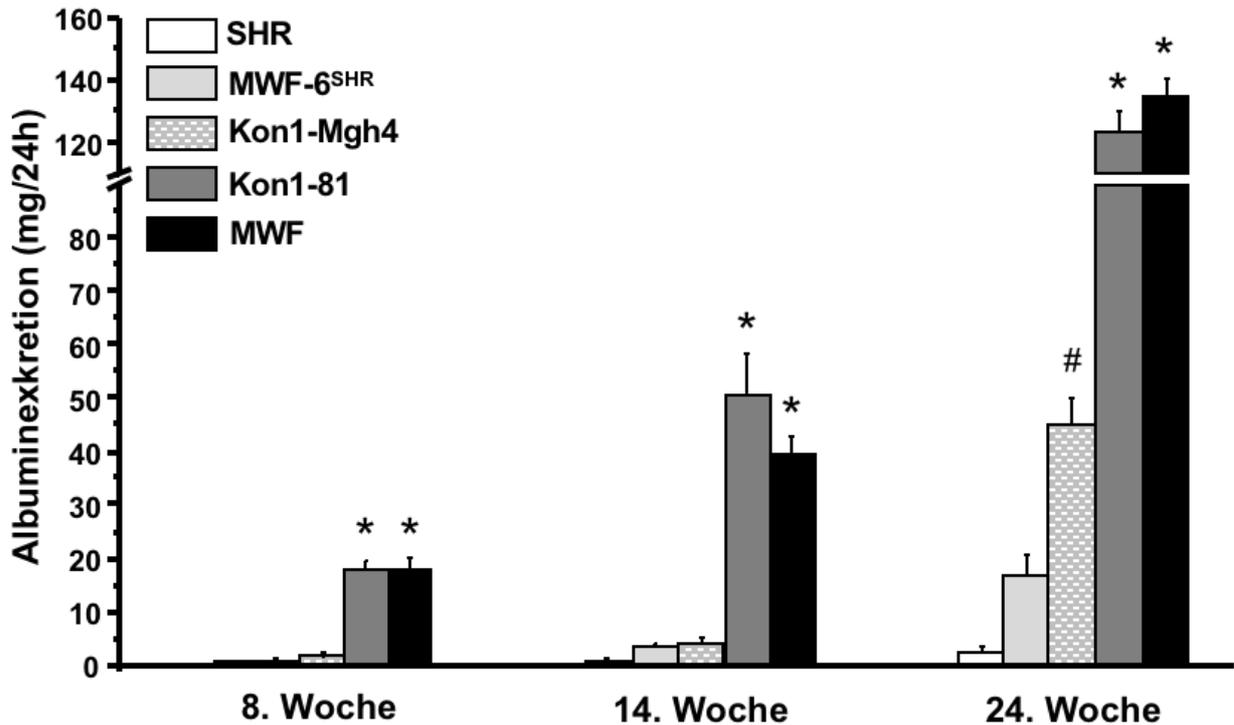


Abb. 7: Vergleich der Albuminexkretion im Urin im Altersverlauf bei männlichen Tieren.

8. und 14 Woche: * $p < 0,0001$ vs. SHR, Kon1-Mgh4, MWF-6^{SHR}.

24. Woche: * $p < 0,0001$ vs. SHR, MWF-6^{SHR}, # $p < 0,05$ vs. MWF, SHR, Kon1-81.

Kon1-81, MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*), Kon1-Mgh4, MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*).

Im weiteren Altersverlauf zeigten MWF- und kongene MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*)-Männchen einen hoch nephrotischen Verlauf mit $139,1 \pm 7,9$ mg/24h bzw. $126,5 \pm 7,1$ mg/24h in der 24. Woche und damit eine 54-fache bzw. 49-fache Steigerung gegenüber SHR mit $2,6 \pm 1,1$ mg/24h ($p < 0,0001$). Durch Substitution des U_{Alb1} -QTL konnte die U_{Alb} kongener MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*)-Individuen im Vergleich zum Parentalstamm MWF um 68% reduziert werden ($139,1 \pm 7,9$ mg/24h vs. $45,2 \pm 4,9$ mg/24h; $p < 0,0001$). Durch Substitution des gesamten RNO6 konnte beim konsomen Stamm MWF-6^{SHR} mit $17,0 \pm 3,6$ mg/24h numerisch die stärkste Suppression gegenüber MWF ($p < 0,0001$), jedoch keine vollständige Normalisierung auf SHR-Niveau erzielt werden ($p < 0,0001$).

Tab. 10 gibt einen Überblick über die prozentuale Beteiligung des feinkartierten U_{Alb1} -QTL auf RNO6 an der Ausprägung der U_{Alb} . Ausgehend von einer in der 8. Woche nachgewiesenen Beteiligung von ~91%, konnte in der 14. Woche für den identifizierten chromosomalen Abschnitt eine ebenfalls hohe Krankheitsassoziation von ~89% ermittelt werden. Auch bei 24. Wochen alten Individuen zeigte der U_{Alb1} -QTL mit ~68% funktioneller Relevanz einen hohen, wenn auch etwas rückläufigen Effekt auf die U_{Alb} .

Tab. 10: Prozentuale Beteiligung des $U_{\text{Aib1-QTL}}$ auf RNO6 an der Albuminurie im Altersverlauf.

Angegeben ist die prozentuale Reduktion der U_{Aib} durch den Transfer des $U_{\text{Aib1-QTL}}$ aus SHR in MWF gegenüber dem nierenkranken Parentalstamm MWF.

	8. Woche	14. Woche	24. Woche
$U_{\text{Aib1-QTL}}$	91%	89%	68%

4.1.2 Analyse des Blutdruckverhaltens

Da sich Blutdruck und Nierenfunktion wechselseitig beeinflussen, wurde das Blutdruckverhalten der einzelnen Stämme aus Gründen der Praktikabilität bei 14 Wochen alten Tieren analysiert. Dabei wurden sowohl der SBD nicht-invasiv mittels Tail-Cuff-Methode, als auch der MAD direkt mittels invasiver intraarterieller Kathethertechnik bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abb. 8 graphisch dargestellt.

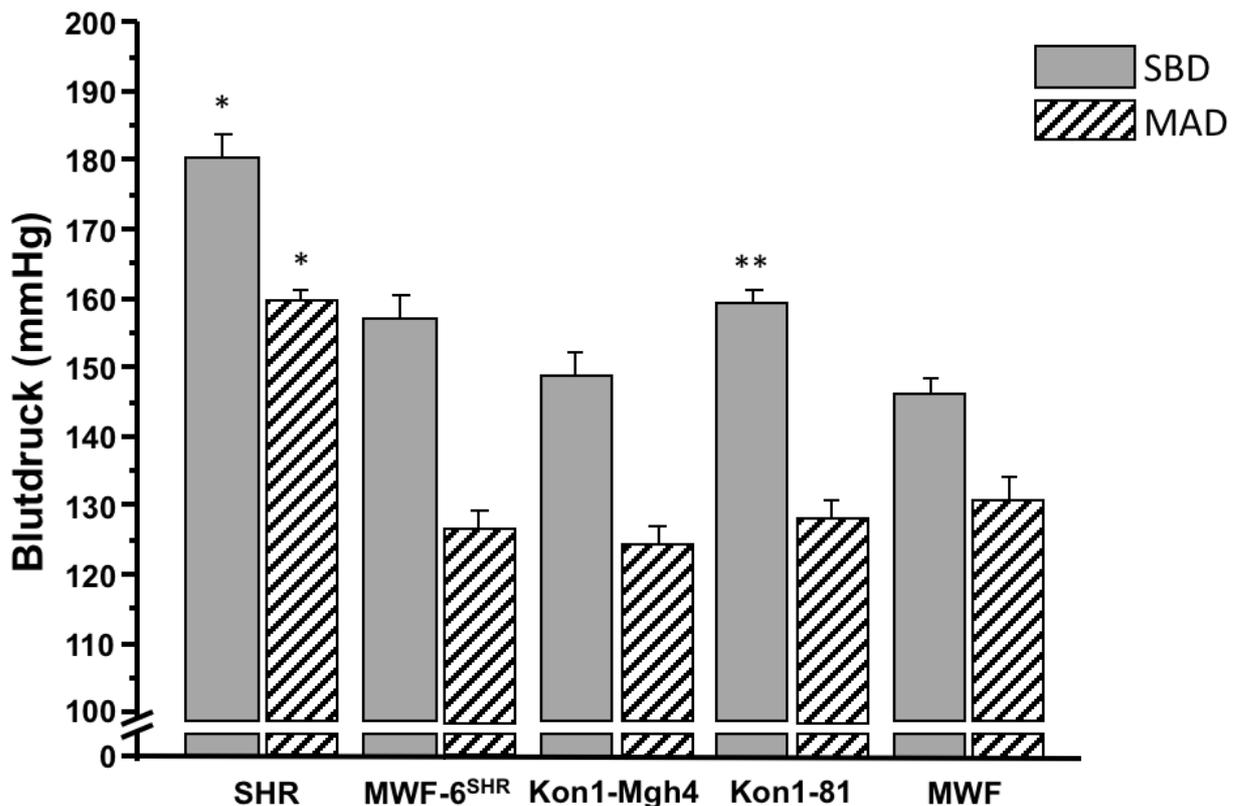


Abb. 8: Vergleichende Analyse des systolischen und des mittleren arteriellen Blutdruckes zum Zeitpunkt der 14. Woche.

SBD: * $p < 0,0001$ vs. MWF, MWF-6^{SHR}, Kon1-Mgh4; ** $p < 0,001$ vs. SHR.

MAD: * $p < 0,0001$ vs. alle Stämme.

Kon1-Mgh4, MWF.SHR-(D6Rat1-D6Mgh4); Kon1-81, MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat81); SBD, systolischer Blutdruck; MAD, mittlerer arterieller Blutdruck.

4.1.2.1 Vergleich des systolischen Blutdruckes

Entsprechend der Erwartung konnten bei beiden Parentalstämmen hypertensive Blutdruckwerte erhoben werden, jedoch wies der Referenzstamm SHR einen gegenüber MWF deutlich signifikant erhöhten Mittelwert auf ($180,4 \pm 3,6$ vs. $146,3 \pm 2,4$ mmHg; $p < 0,0001$). Der kongene Stamm MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) erreichte mit $149,1 \pm 3,1$ mmHg ein mit dem Parentalstamm MWF vergleichbares Blutdruckniveau. Der konsome Stamm MWF-6^{SHR} sowie kongene MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*)-Tiere verhielten sich mit $157,5 \pm 3,4$ mmHg bzw. $159,5 \pm 2,0$ mmHg intermediär zu den Parentaltieren MWF und SHR ($p < 0,001$ vs. SHR). Der Stamm MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*) wies dabei eine nicht signifikante Blutdruckdifferenz von 10,4 mmHg gegenüber Tieren der kongenen Linie MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) auf.

4.1.2.2 Vergleich des mittleren arteriellen Blutdruckes

Bei der Analyse des MAD zeigte sich ein zu den SBD-Ergebnissen analoges Bild. SHR-Tiere erzielten gegenüber allen untersuchten Stämmen mit $160,0 \pm 1,4$ mmHg die höchsten Blutdruckwerte ($p < 0,0001$). MWF, MWF6-^{SHR} und der kongene Stamm MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*) verhielten sich untereinander ähnlich ($130,9 \pm 3,5$, $127,3 \pm 2,6$ mmHg und $128,6 \pm 2,7$ mmHg). Der niedrigste MAD konnte mit $124,4 \pm 2,7$ mmHg bei Tieren des kongenen Stammes MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) ermittelt werden. Die gemittelte Blutdruckdifferenz zwischen den beiden kongenen Stämmen MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*) betrug 2,9 mmHg.

4.2 Differentielle Genexpressionsanalyse

4.2.1 Vergleichende Genexpressionsanalyse im Altersverlauf bei männlichen Tieren

Abb. 9 zeigt die unterschiedliche Genexpression von *Tmem63c* der zu untersuchenden Stämme in Abhängigkeit vom Lebensalter.

Bereits im Alter von 4 Wochen wiesen MWF-Ratten im Vergleich zu SHR-Tieren eine etwa 3-fache Expressionssteigerung auf ($100,0 \pm 8,4$ vs. $311,7 \pm 41,3\%$, $p < 0,001$) (Abb. 9A). Durch den Transfer des gesamten RNO6 aus SHR in MWF zeigte sich beim konsomen Stamm MWF-6^{SHR} ein mit $119,9 \pm 20,1\%$ mit SHR vergleichbares Expressionsniveau. Die differente Expression blieb auch im weiteren Altersverlauf in

vergleichbarer Höhe erhalten. Männliche MWF-Individuen zeigten in der 8. und 24. Woche mit $334,0 \pm 22,7\%$ und $296,2 \pm 18,5\%$ gegenüber dem kontrastierenden Stamm SHR eine signifikant erhöhte Expression ($p < 0,0001$). Der konsome Stamm MWF-6^{SHR} verhielt sich analog zu SHR ($121,2 \pm 8,5\%$ und $134,1 \pm 9,9\%$).

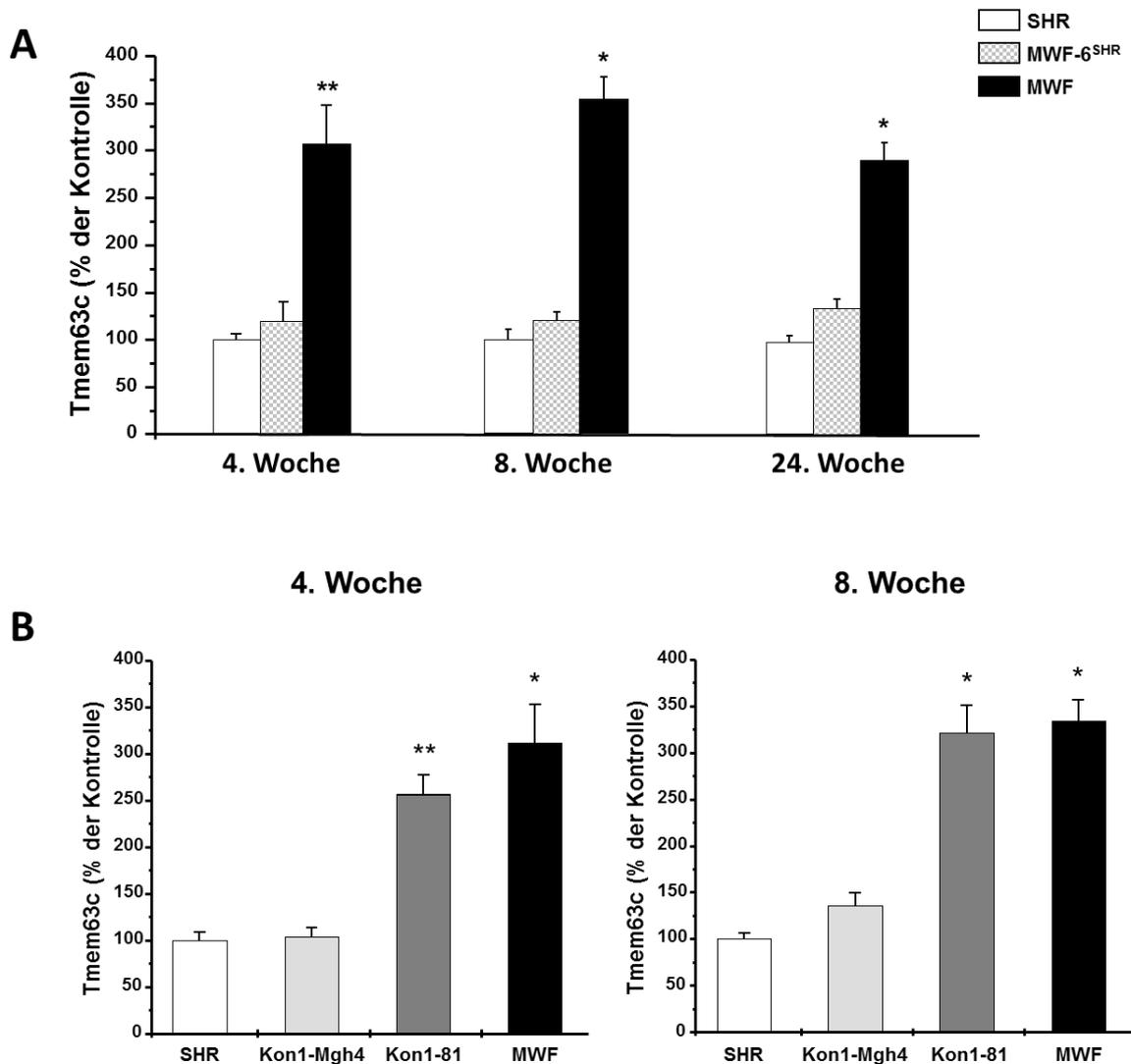


Abb. 9: Differentielle mRNA-Genexpression des Gens *Tmem63c* bei männlichen Individuen im Altersverlauf.

A: * $p < 0,0001$ vs. SHR, MWF-6^{SHR}, gleiche Woche; ** $p < 0,001$ vs. SHR, MWF-6^{SHR}, gleiche Woche.

B: * $p < 0,0001$ vs. SHR, Kon1-Mgh4, gleiche Woche; ** $p < 0,01$ vs. SHR, Kon1-Mgh4, gleiche Woche.

Kon1-Mgh4, MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*); Kon1-81, MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*).

Auf Grund der hohen funktionellen Relevanz des U_{Aib1} -QTL im jungen Lebensalter konzentrierten sich weiterführende Expressionsanalysen an den das informative Intervall definierenden kongenen Stämmen MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) auf die frühen Zeitpunkte der 4. und 8. Woche (Abb. 9B). Tiere des kongenen Stammes MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) erzielten in der 4. Woche entsprechend der zu erwartenden allelischen Regulation ein mit SHR vergleichbares ($100,0 \pm 8,4\%$ vs. $103,0 \pm 10,6\%$), in der 8. Woche ein gegenüber MWF um etwa 60% reduziertes Expressionsniveau ($135,9 \pm 13,1\%$ vs. $334,0 \pm 22,7\%$). Jungtiere des MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*)-Stammes verhielten sich zu beiden Zeitpunkten wie MWF (4. Woche: $256,3 \pm 20,6\%$ vs. $311,7 \pm 41,3\%$; 8. Woche: $321,4 \pm 28,8\%$ vs. $334,0 \pm 22,7\%$). Der Expressionsunterschied zwischen den den U_{Aib1} -QTL flankierenden kongenen Linien betrug in der 4. und 8. Woche je das etwa 2,5-fache zu Gunsten des Stammes MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*) ($103,0 \pm 10,6\%$ vs. $256,3 \pm 20,6\%$ bzw. $135,9 \pm 13,1\%$ vs. $321,4 \pm 28,8\%$, $p < 0,0001$).

4.2.2 Vergleichende Genexpressionsanalyse im Altersverlauf bei weiblichen Tieren

Aufgrund des bekannten sexuellen Dimorphismus beim Rattenstamm MWF wurde die mRNA-Genexpression von *Tmem63c* ergänzend bei weiblichen Tieren im Altersverlauf untersucht. Diese zeigten innerhalb ihres Geschlechts ein zu altersgleichen Männchen vergleichbares Expressionsmuster (Abb. 10A). Auch MWF-Weibchen erzielten eine etwa 2,3-fach bis 3,7-fach erhöhte Expression gegenüber SHR-Tieren ($372,0 \pm 77,8\%$, $229,6 \pm 18,4\%$ und $324,1 \pm 25,3\%$, $p < 0,001$ vs. SHR). Entsprechend der allelischen Regulation konnte das Transkriptniveau beim konsomen Stamm MWF-6^{SHR} mit $178,5 \pm 20,5\%$, $122,8 \pm 5,4\%$ und $199,3 \pm 14,4\%$ gegenüber MWF signifikant supprimiert, wenngleich in der 24. Woche nicht vollständig auf SHR-Niveau normalisiert werden ($p < 0,05$).

Im direkten Vergleich zwischen stamminternen männlichen und weiblichen Individuen zum Zeitpunkt der 8. Woche zeigte sich für den Rattenstamm SHR eine um etwa 50% gesteigerte Expression zu Gunsten der weiblichen Tiere. Bei MWF-Weibchen ließ sich nur eine tendentielle Zunahme nachweisen, welche jedoch nicht signifikant war (Abb. 10B).

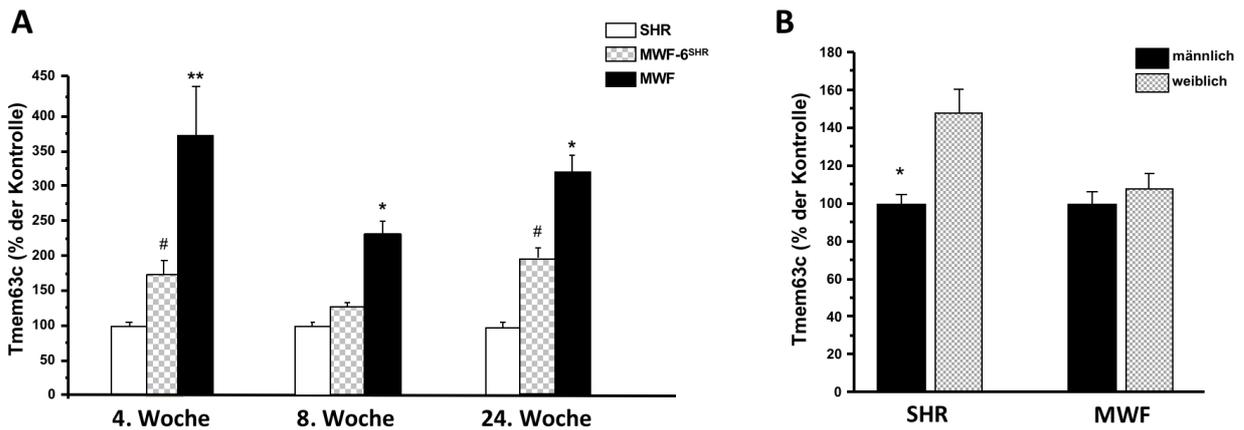


Abb. 10: Differentielle mRNA-Genexpression des Gens *Tmem63c* bei weiblichen Tieren im Altersverlauf.

A: Differentielle, allelische Genexpression bei den Parentaltieren MWF und SHR sowie dem konsomen Stamm MWF-6^{SHR} zum Zeitpunkt der 4., 8. und 24. Woche.

4. Woche: ** $p < 0,001$ vs. SHR, # $p < 0,05$ vs. MWF. 8. Woche: * $p < 0,0001$ vs. MWF, MWF-6^{SHR}. 24. Woche: * $p < 0,0001$ vs. MWF, MWF-6^{SHR}, # $p < 0,05$ vs. SHR.

B: Geschlechtsspezifische Expressionsanalyse der Parentalstämme MWF und SHR zum Zeitpunkt der 8. Woche. Die Männchen wurden als Referenzgeschlecht auf 100% normiert. Weibliche Tiere wurden jeweils auf die stamminternen männlichen Tiere in Bezug gesetzt.

* $p < 0,0001$ vs. SHR-Weibchen.

4.2.3 Vergleichende Genexpressionsanalyse im SHR-Hintergrund

Um zu überprüfen, ob die Expression von *Tmem63c* auch durch den Transfer von RNO6 aus MWF nach SHR vice versa induziert werden kann, wurde zudem eine Expressionsanalyse an männlichen SHR-6^{MWF}-Tieren durchgeführt (Abb. 11). Durch die Überführung von RNO6 konnte beim konsomen Stamm SHR-6^{MWF} die Expression in der 4. Woche um etwa 60% gegenüber SHR gesteigert werden (100±6,0 vs. 161,5±25,1%). Der Expressionsunterschied erreichte in der 8. Woche mit 236,1±29,6% einen signifikanten Wert ($p < 0,001$ vs. SHR).

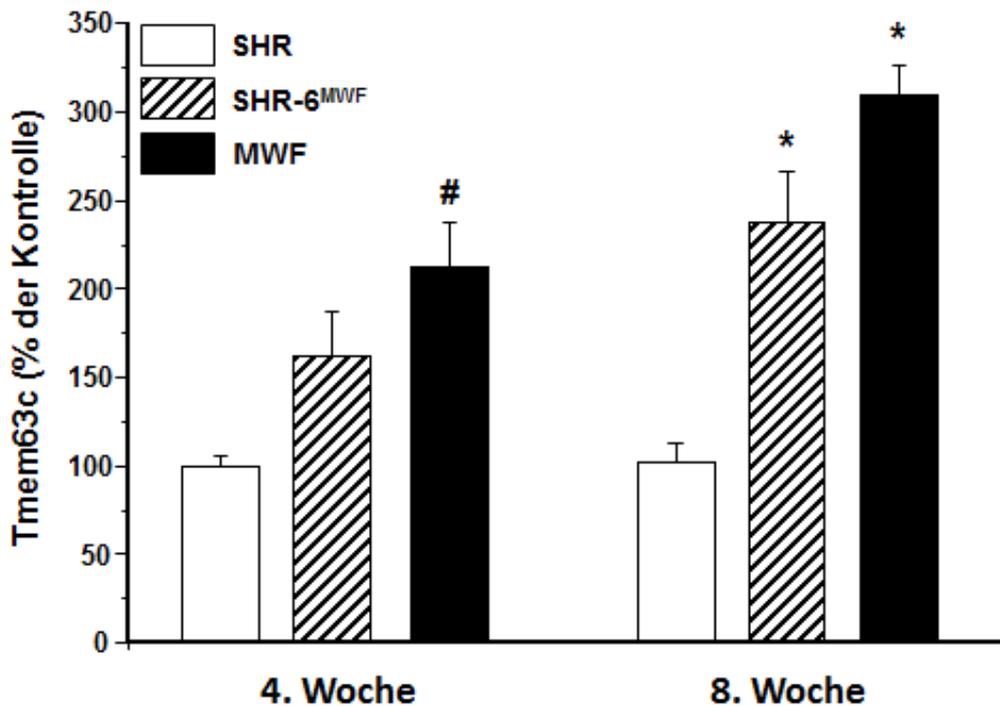


Abb. 11: Differentielle mRNA-Genexpression des Gens *Tmem63c* im SHR-Hintergrund. # $p < 0,05$ vs. SHR, gleiche Woche; * $p < 0,001$ vs. SHR, gleiche Woche.

4.3 Proteinbiochemische Analysen

4.3.1 Western Blot

Der Nachweis des identifizierten Kandidatengens *Tmem63c* auf Proteinebene erfolgte an Hand des Western Blots. Hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere kommerziell erhältliche sowie ein eigens in Auftrag gegebener Antikörper verwendet. Das biostatistisch errechnete MG für TMEM63C beträgt ~93 kDa.

4.3.1.1 Vorstudien mit kommerziellen Antikörpern

Tab. 11 zeigt die für die Western Blot-Analyse eingesetzten kommerziellen Antikörper und stichpunktartig die hierunter erzielten Resultate. Sämtliche Antikörper waren zu Beginn der Analysen erst kurzzeitig auf dem Markt erhältlich. Bislang konnte für keinen dieser Antikörper eine positive Referenz nachgewiesen werden.

Tab. 11: Ergebnisübersicht der kommerziellen Antikörper in Western Blot-Experimenten.

	Antikörper		
	SAB2103855	sc-249033	HPA030657
Epitop	EEEIQTVFDMEPSST SSTPTSLLYVATVLQ EPELNLTASSPARH TYGTM	Firmeninterne Information. Etwa 15-20 bp, mappend innerhalb der AS 250-300	GSVTRVHFCYDVRNLIDLDD QRRHAMRGRFLFYTAKAKKTG KVMIRIHPCARLCFCCKWTCF KEVDAEQYYSELEEQLTDEFN AELNRVPLKRLDLIFVTFQDSR MAKRVRKDYKYVQCGVQPQQ SSVTTIVKSYYWRVTMA
Resultat	Bandendetektion bei ~72 kDa, 98 kDa, 104 kDa und 125 kDa	Starker Hintergrund, Detektion multipler Banden	sehr schwache Bande bei ~55 kDa
Blocking- peptid	spezifisch geblockte Banden 104 kDa und 125 kDa	spezifisch geblockte Bande 55 kDa	Kein erhältliches Blockingpeptid

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die eingesetzten Antikörper trotz optimierter Bedingungen partiell nur zu qualitativ unbefriedigenden Ergebnissen und im Vergleich untereinander zu stark differenten Resultaten führten. Bei keinem der kommerziellen Antikörper konnte eine Bande im Bereich des für TMEM63C zu erwartenden MG von ~93 kDa detektiert werden. Da es sich bei dem angegebenen MG lediglich um eine theoretische, aus der Aminosäuresequenz errechnete Größe handelt und zahlreiche modifizierende Faktoren, wie beispielsweise die posttranslationale Prozessierung, das reale MG beeinflussen, wurde nachfolgend die Spezifität der eingesetzten Antikörper unter Verwendung des entsprechenden Blockingpeptides überprüft. Hierunter konnten insgesamt drei spezifische Banden bei ~55 kDa, 104 kDa und 125 kDa identifiziert werden.

4.3.1.2 Massenspektrometrische Analyse

Um die als spezifisch detektierten Proteinbanden als das gesuchte Protein TMEM63C zu identifizieren, wurden nachfolgend massenspektrometrische Analysen in Auftrag gegeben. Für alle Proben konnten eine Vielzahl an Proteinen mit durchweg guter Sicherheit nachgewiesen werden. TMEM63C konnte hierunter jedoch nicht identifiziert werden.

4.3.1.3 Western Blot unter Verwendung des institutseigenen Antikörpers

In Anbetracht der fraglichen Resultate unter Verwendung der kommerziell erworbenen Antikörper wurde im Verlauf über die Firma Thermo Scientific ein weiterer polyklonaler Antikörper, Anti-TMEM63C-1, generiert.

4.3.1.3.1 Qualitätsanalyse der Immunisierung und Aufreinigung

Zur internen Überprüfung eines effizienten Immunisierungs- und Aufreinigungsprozesses wurden die Seren der Tage 0 (Präimmunserum), 28, 56 und 72 vergleichend mit dem finalen Antikörper im Western Blot unter Verwendung von Glomeruli-Isolaten getestet (Abb. 12).

Ausgehend vom Prä-Immunsrum mit allenfalls zwei diskreten Banden bei ~86 und ~95 kDa in einem darüber hinaus blandem Hintergrund, zeigten sich im Verlauf durch die Injektion des entsprechenden Antigens drei neue Banden, die bis zum finalen Antikörperserum erhalten blieben: Zwei distinke Proteinbanden bei ~93 kDa sowie ~75 kDa sowie eine signalschwächere Fluoreszenz bei ~110 kDa. Die durch unspezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen detektierten Banden von Tag 0, die im weiteren Zeitverlauf noch verfolgbare sind, konnten durch die abschließende Affinitätschromatographie effektiv unterbunden werden.

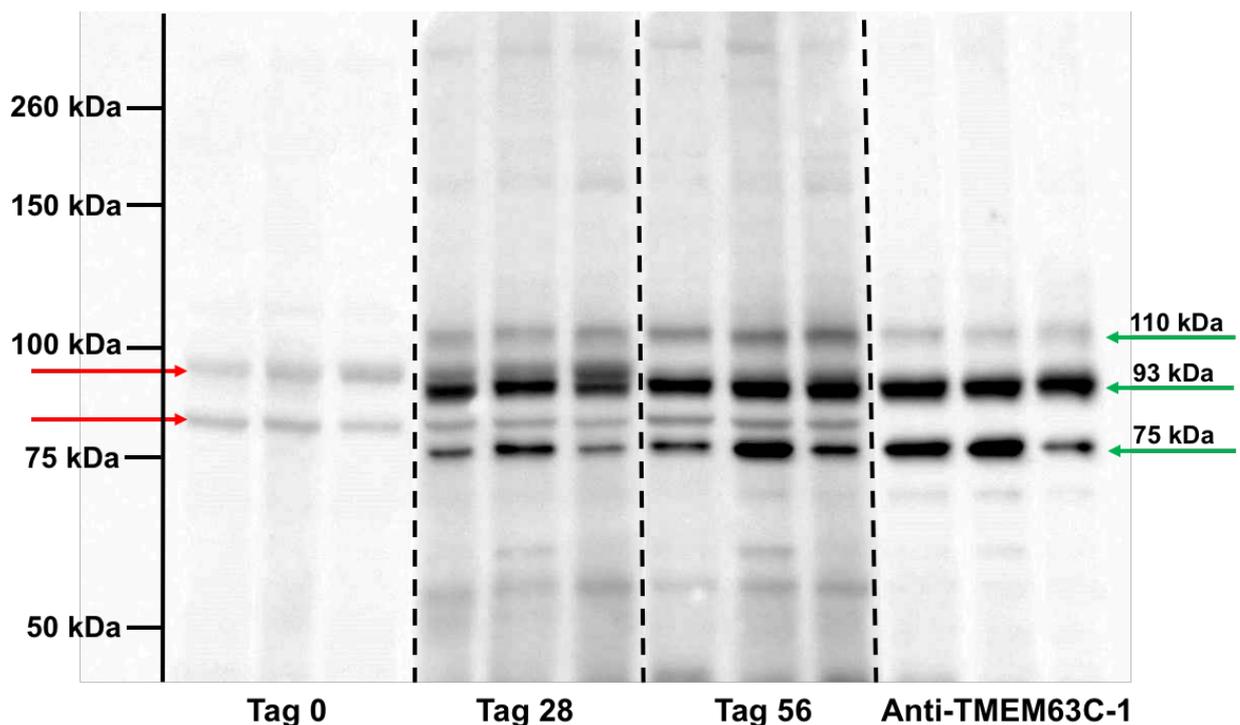


Abb. 12: Qualitätskontrolle des polyklonalen Antikörpers Anti-TMEM63C-1.

Gezeigt ist ein Western Blot mit vergleichender Analyse der Kaninchenserum und des finalen aufgereinigten Antikörperserums zu definierten Zeitpunkten. Je Serum wurden drei verschiedene, zwischen den Seren identische Glomeruli-Isolate aufgetragen (G1-G3). Roter Pfeil, unspezifische Banden; grüner Pfeil, spezifische Banden infolge des Immunisierungsprozesses.

4.3.1.3.2 Vergleichende Proteinquantifikation

Unter Verwendung des eigens generierten Antikörpers Anti-TMEM63C-1 konnte im Western Blot eine stabile, signalstarke Bande bei 93 kDa detektiert werden, die dem zu erwartenden MG des primären Translationsproduktes von *Tmem63c* entspricht. Abb. 13 zeigt einen repräsentativen Western Blot von Glomerulilysaten männlicher Individuen der Parentalstämme MWF und SHR zum Zeitpunkt der 8. Woche.

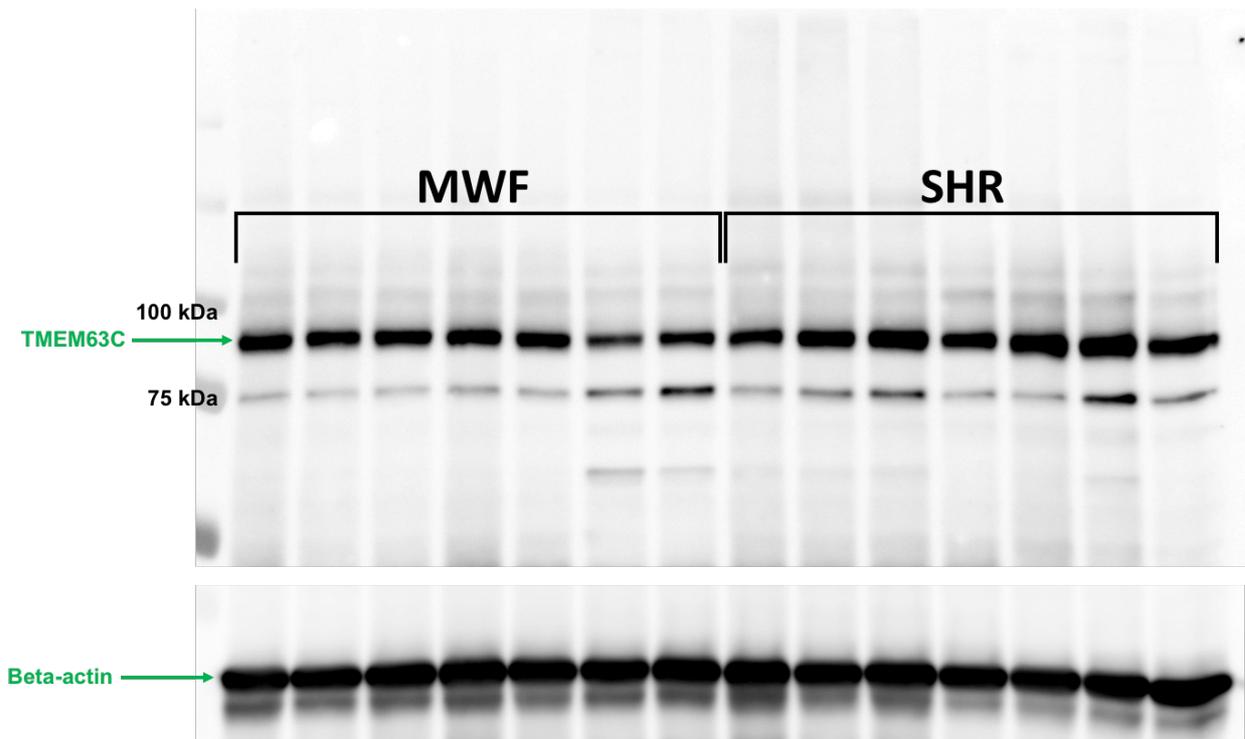


Abb. 13: Repräsentativer Western Blot von Glomerulilysaten der Parentalstämme MWF und SHR zum Zeitpunkt der 8. Woche.

Es zeigen sich zwei distinkte Banden bei 93 kDa, dem errechneten MG des gesuchten Proteins TMEM63C, sowie bei 75 kDa. Beta-actin diente als interne Ladekontrolle (42 kDa).

Bei der semiquantitativen Auswertung (Abb. 14) der 93 kDa-Bande zum Zeitpunkt der 8. Woche zeigte sich eine Überexpression des Proteins zu Gunsten des SHR-Stammes. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($0,13 \pm 0,01$ vs. $0,10 \pm 0,01$). Um die Expression analog zur Transkriptionsrate im Altersverlauf zu beurteilen, wurden ergänzende Western Blots in der 4. und 24. Woche durchgeführt (nicht abgebildet). In der 4. Woche konnte bei männlichen MWF-Tieren eine gegenüber SHR-Ratten um etwa 24% erniedrigte Expression nachgewiesen werden ($0,17 \pm 0,01$ vs. $0,13 \pm 0,01$, $p < 0,05$). In der 24. Woche zeigten beide Stämme ein vergleichbares Expressionsniveau ohne signifikanten Unterschied ($0,19 \pm 0,01$ vs. $0,22 \pm 0,01$) (Abb. 14).

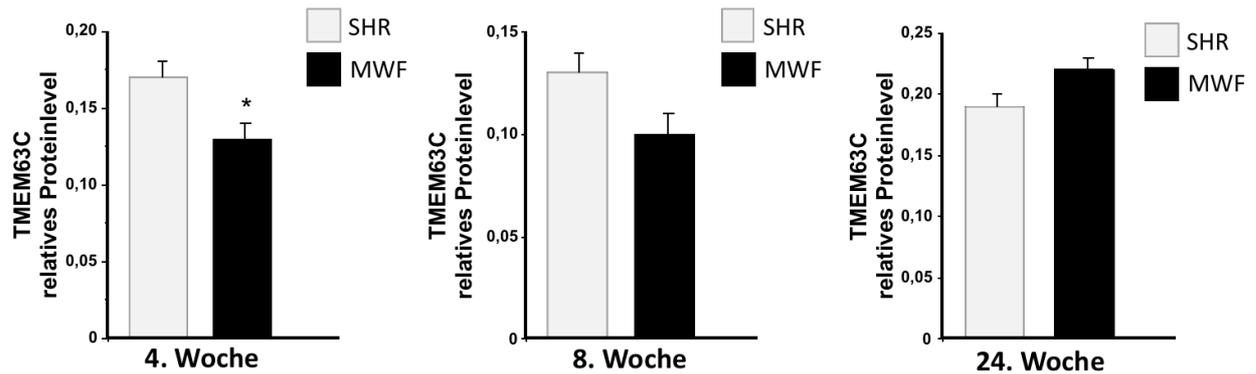


Abb. 14: Semiquantitative Western Blot Analyse der TMEM63C-Proteinexpression in Glomerulilysaten.

Vergleichend graphisch dargestellte, mittels Western Blot Analysen ermittelte relative Proteinlevel der Parentalstämme SHR und MWF zum Zeitpunkt der 4., 8. und 24. Woche eines repräsentativen Western Blots je Zeitpunkt.

4. und 8. Woche: MWF, n=7; SHR, n=7. 24. Woche: MWF, n=6; SHR, n=6.

*p<0,05 vs. SHR.

4.3.1.3.3 Expressionsanalyse an humanen Podozyten

Ergänzend zu den Versuchen an Rattenglomeruli wurde die Proteinexpression von TMEM63C im Western Blot auch an humanen Podozyten (immortalized human podocytes) untersucht, welche unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von Dr. Moin Saleem der Academic and Children's Renal Unit der Universität in Bristol zur Verfügung gestellt und in unserer Arbeitsgruppe weiter etabliert wurden. Dabei konnte ein zu den eingesetzten Glomeruli-Lysaten analoges Bandenmuster detektiert werden (Abb. 15).

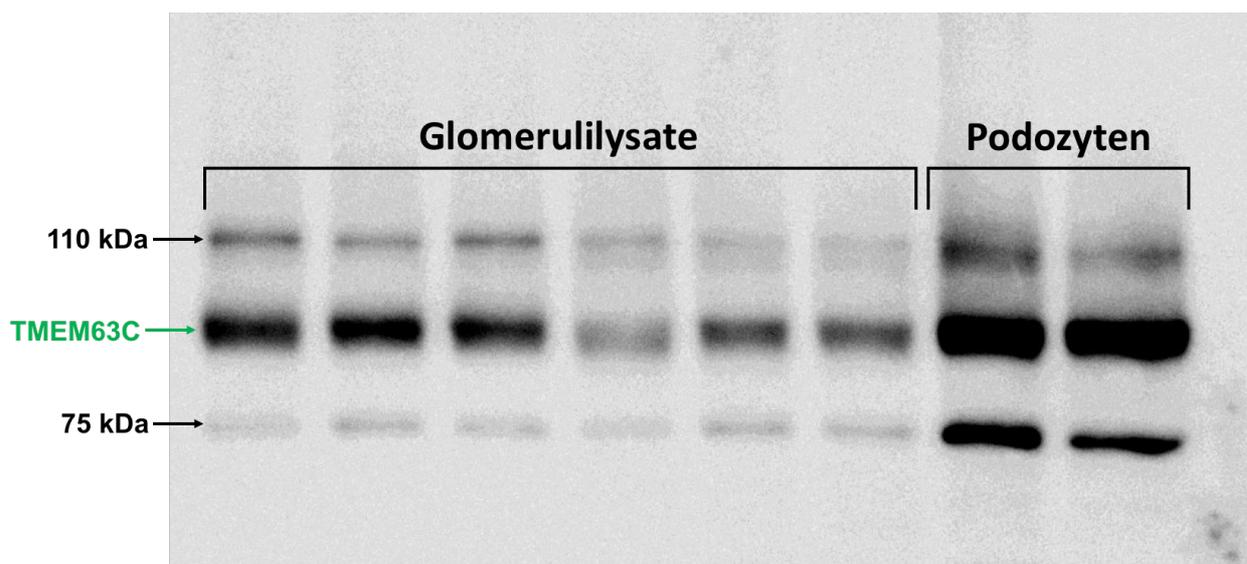


Abb. 15: Nachweis der TMEM63C-Expression in humanen Podozyten im Western Blot.

Proteinextrakte humaner Podozyten zeigen ein zu den aus Rattenglomeruli gewonnenen Lysaten analoges Bandenmuster.

4.3.2 Immunhistochemie

Abb. 16 zeigt repräsentative Ausschnitte der in Kooperation durchgeführten immunhistochemischen Färbung des Proteins TMEM63C an Nierenschnitten der Parentalstämme MWF und SHR.

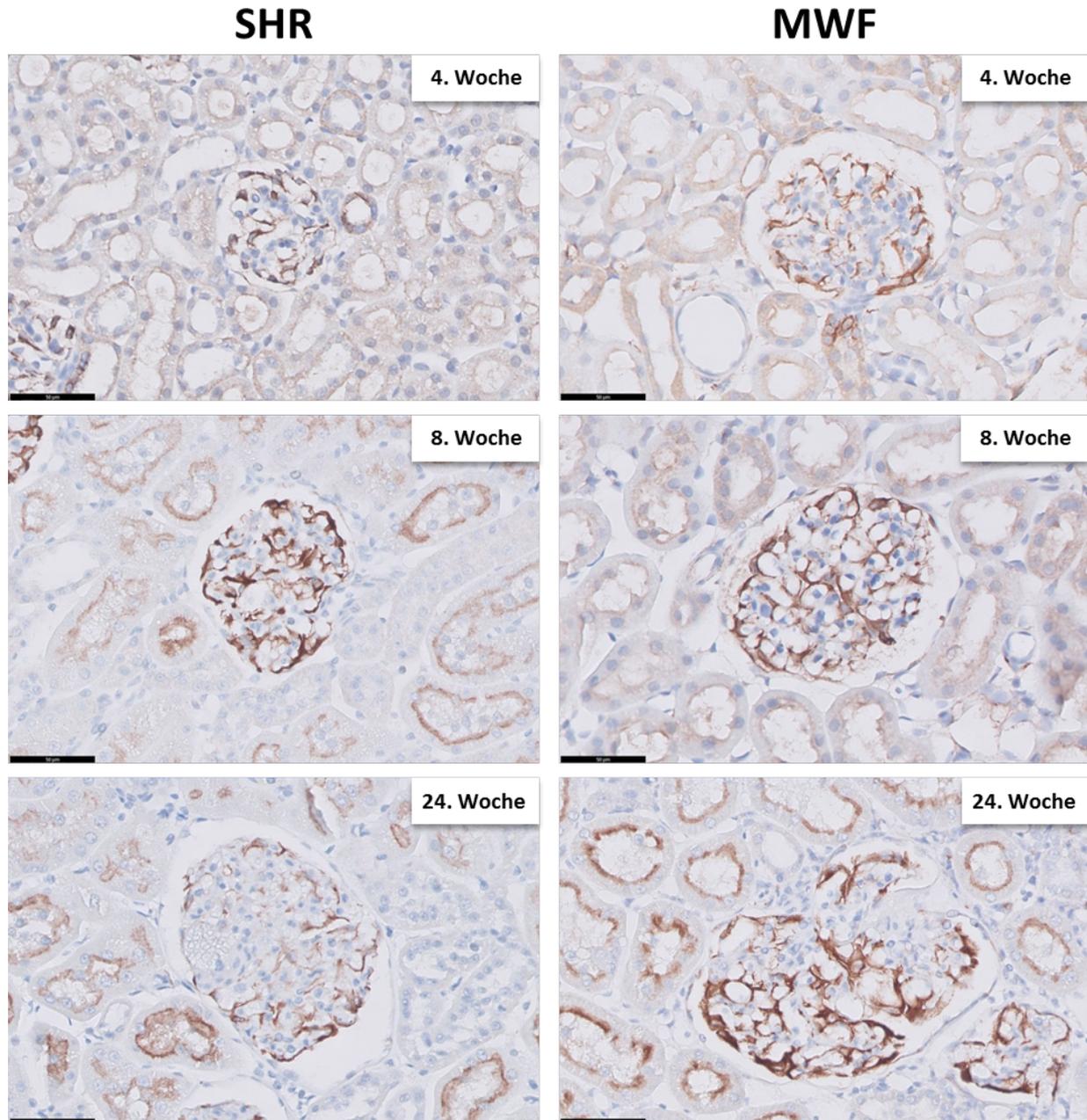


Abb. 16: Immunhistochemische Färbung des Proteins TMEM63C.

Gezeigt sind repräsentative Nierenschnitte der Parentalstämme SHR und MWF zum Zeitpunkt der 4., 8. und 24. Woche unter Verwendung des Antikörpers Anti-TMEM63C-1. Spezifisch angefarbte Strukturen sind braun gefärbt. Darstellung in je 50-facher Vergrößerung. Maßstabsbalken 50 μ m.

Morphologisch ist beim nierenkranken MWF-Stamm bereits in der 4. Woche eine glomeruläre Hypertrophie/-plasie zu erkennen, welche bis zur 24. Woche sukzessive zunimmt. Führend in beiden Parentalstämmen ist eine distinkte Anfärbung der Podozyten des Glomerulus zu allen gewählten Zeitpunkten. Beide Stämme zeigen in der 4. Woche eine vergleichbare Signalintensität (Abb. 17). Während bei SHR-Individuen die Expression von TMEM63C in der 8. Woche signifikant zunimmt ($p < 0,05$), zeigen MWF-Ratten zunächst eine zur 4. Woche analoge Expressionsrate ($p < 0,01$ vs. SHR), welche erst in der 24. Woche deutlich ansteigt ($p < 0,0001$). Beim nierengesunden SHR-Stamm reduziert sich die Signalintensität zum Zeitpunkt der 24. Woche hingegen wieder auf das Ausgangsniveau der 4. Woche. In der Verlaufsanalyse zeigt sich in der 4. Woche bei beiden Stämmen zudem eine deutliche Färbung der Macula densa der Pars recta des distalen Tubulus, welche in der weiteren Betrachtung sukzessive abnimmt und in der 24. Woche nicht mehr nachweisbar ist. Korrelierend hierzu lässt sich ein zunehmender Anstieg der Expression von TMEM63C im Bürstensaum des proximalen Tubulus nachweisen, welcher bei SHR in der 8. und 24. Woche, bei MWF in hingegen nur in der 24. Woche nachweisbar war. Die medullären Strukturen ließen zu keinem Zeitpunkt eine Färbung erkennen.

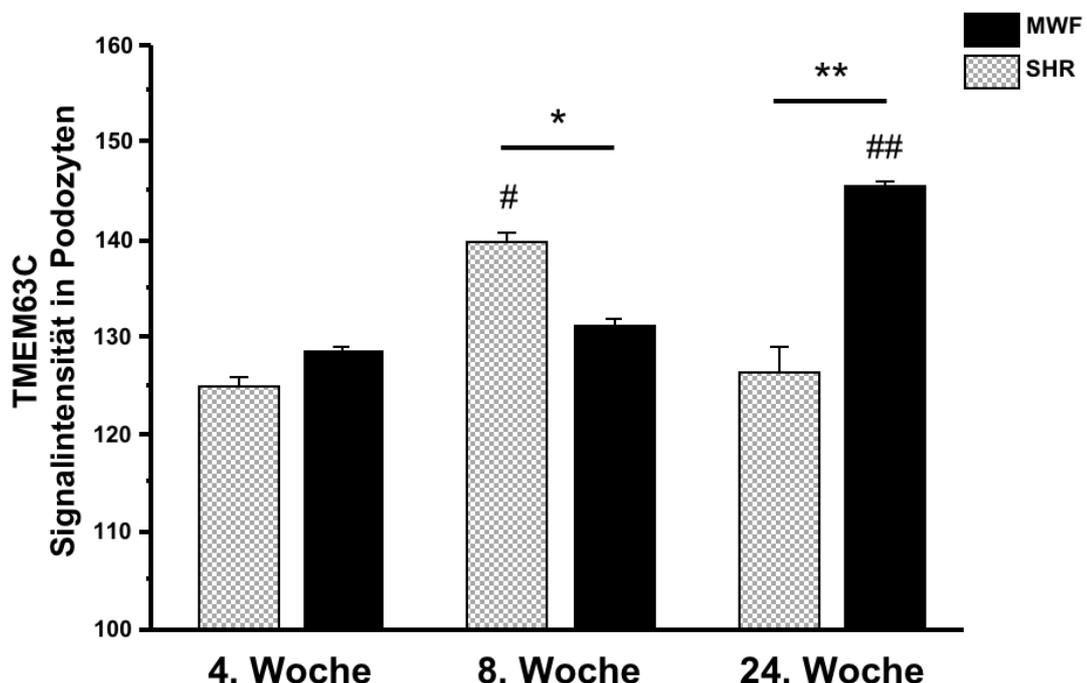


Abb. 17: Vergleichende semiquantitative Immunhistochemie-Analyse der TMEM63C-Expression in Podozyten der Parentalstämmen SHR und MWF.

* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, ## $p < 0,0001$ vs. MWF 4. und 8. Woche, # $p < 0,05$ vs. SHR 4. und 24. Woche.

4.3.3 Massenspektrometrische Analyse

Zur Validierung des eingesetzten Antikörpers Anti-TMEM63C-1 wurden ebenso massenspektrometrische Analysen der detektierten Banden durchgeführt. Der Abgleich der generierten MS-Spektren mit einer Proteindatenbank führte jedoch zu keiner positiven Detektion von TMEM63C.

5. Diskussion

In jüngster Vergangenheit konnte in mehreren bevölkerungsbasierten Studien gezeigt werden, dass die U_{Alb} einen unabhängigen Risikofaktor für die Progression renaler Erkrankungen sowie die Entwicklung kardio- und zerebrovaskulärer Ereignisse darstellt [18, 29-32]. In Anbetracht der gesundheitspolitischen Relevanz dieser Krankheitsbilder rückt die Erforschung kausaler pathophysiologischer Mechanismen der U_{Alb} zunehmend in den Vordergrund. Die Identifikation krankheitsassoziierter Gene und deren Krankheitsmechanismen eröffnet dabei die Möglichkeit, nicht symptomorientiert, sondern frühzeitig kausaltherapeutisch zu intervenieren. Vor dem Hintergrund der multifaktoriellen Komplexität des Phänotyps „Albuminurie“ wird verständlich, dass die molekulargenetischen Grundlagen der U_{Alb} bis heute noch nicht im Detail geklärt sind.

Um eine ursächliche Beteiligung einzelner Gene an der phänotypischen Ausprägung quantitativer Merkmale nachzuweisen, hat sich daher der Einsatz molekulargenetisch determinierter Inzuchtmodelle bewährt [85]. Ein für die Erforschung von Herz/Kreislauf- und Nierenerkrankungen geeignetes Tiermodell repräsentiert dabei die MWF-Ratte, zu deren Charakteristika als Zeichen eines Nierenschadens insbesondere die progressive Entwicklung einer ausgeprägten U_{Alb} und Proteinurie mit Werten weit jenseits des nephrotischen Grenzbereichs zählt [115, 127]. In einer initialen in der Arbeitsgruppe durchgeführten genomweiten Kopplungs- und Kosegrationsanalyse an Hand einer (MWF x SHR)-Backcross-Population konnten mehrere wahrscheinliche und signifikante U_{Alb} -QTL auf verschiedenen Chromosomen identifiziert werden, wobei der QTL auf RNO6 bereits im Alter von 8. Wochen die signifikanteste Kopplung aufwies [93]. Interessanterweise konnte bei einer früheren Kopplungsanalyse ein kolokalisierter QTL auf RNO6 auch an Hand einer MWF- und normotensiven, nierengesunden Lewis-Ratten-Backcross-Population sowie zwischen salzsensitiven Dahl- und SHR-F2-Tieren identifiziert werden [89, 106, 114]. Diese überschneidenden Ergebnisse innerhalb eines unterschiedlichen Rattengenoms deuten darauf hin, dass es sich bei dem U_{Alb} -QTL auf RNO6 um eine konservierte Region handelt, der eine generelle molekulargenetische Bedeutung in der Entwicklung der U_{Alb} zukommt. Die funktionelle Relevanz des identifizierten U_{Alb} -QTL auf RNO6 konnte durch die Etablierung des konsomen Stammes MWF-6^{SHR} validiert werden [115] und der informative Chromosomenabschnitt mittels Etablierung und phänotypischer Charakterisierung der kongenen Linien

MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) in der 8. Woche als U_{Aib1} -QTL näher definiert werden.

Gene und deren Regulation unterliegen oftmals einem „age of onset“-Effekt. Es ist bekannt, dass sie in Abhängigkeit ihrer funktionellen Relevanz zu unterschiedlichen Zeitfenstern aktiviert oder abgeschaltet werden bzw. in ihrer Genaktivität differieren können. Um die funktionelle Relevanz des identifizierten U_{Aib1} -QTL auf RNO6 im weiteren Altersverlauf beurteilen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Entwicklung der U_{Aib} bei Tieren der 14. und 24. Woche eruiert. Die Analysen zeigen, dass der U_{Aib1} -QTL auch mit fortschreitendem Lebensalter funktionell bedeutsam, insbesondere jedoch im frühen bzw. mittleren Lebensalter von erheblicher Relevanz zu sein scheint und damit zu einem Zeitpunkt, zu dem noch keine relevanten altersabhängigen, pathophysiologischen Degenerationen zu erwarten sind. Es ist anzunehmen, dass die innerhalb des U_{Aib1} -QTL kartierten Gene vor allem mit der frühzeitigen Entwicklung einer erhöhten U_{Aib} sowie deren progressiven Anstieg im weiteren Altersverlauf assoziiert sind. Interessanterweise wiesen konsome MWF-6^{SHR}-Individuen zum Zeitpunkt der 24. Woche eine signifikant geringere U_{Aib} gegenüber dem kongenen, den U_{Aib1} -QTL aus SHR tragenden MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*)-Stamm auf ($p < 0,05$). Möglicherweise liegen außerhalb des identifizierten U_{Aib1} -QTL weitere renoprotektive Faktoren auf RNO6, welche vor allem im höheren Lebensalter phänotypisch zum Tragen kommen. Die funktionelle Relevanz weiterer potentieller informativer Intervalle für die U_{Aib} könnte in Form einer Altersverlaufsstudie an Hand der in der Arbeitsgruppe bereits etablierten kongenen Linien näher eruiert werden.

Es ist hinlänglich bekannt, dass der Blutdruck einen nicht unwesentlichen Risikofaktor für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der U_{Aib} darstellt und selbst nur moderat erhöhte Blutdruckwerte über die Zeit kumulativ zu einem progressiven Voranschreiten der U_{Aib} führen [117]. Um einen möglichen zusätzlichen protektiven Effekt geringerer Blutdruckwerte der den identifizierten U_{Aib1} -QTL flankierenden Linien auf die Ausbildung der U_{Aib} auszuschließen, wurde das Blutdruckverhalten der kongenen Tierlinien vergleichend mit den Parentalstämmen MWF und SHR und dem konsomen MWF-6^{SHR}-Individuen in der 14. Woche analysiert. Tatsächlich zeigte sich zwischen den kongenen Linien MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) eine

mittlere Blutdruckdifferenz von 10,4 mmHg (SBD) bzw. 2,9 mmHg (MAD). Auch wenn die erhobenen Blutdruckwerte zwischen beiden Stämmen statistisch nicht signifikant waren, kann ein zusätzlicher renoprotektiver Effekt aufgrund des im Mittel niedrigeren systemischen Blutdruckes nicht ausgeschlossen werden, sodass die hohe Varianz des U_{Alb1} -QTL auf die U_{Alb} anteilig auch den normalisierten Blutdruckwerten zugeschrieben werden muss. Interessanterweise konnte der progressive Anstieg der U_{Alb} beim konsomen Stamm MWF-6^{SHR} im Altersverlauf im Vergleich zum kongenen Stamm MWF.SHR-(*D6Rat1-D6RatMgh4*) signifikant supprimiert werden ($p < 0,05$), obwohl gleichzeitig ein um bis zu 5% erhöhter systolischer Blutdruck vorlag. Dieser Befund unterstreicht die Existenz krankheitsassoziiertes, genetischer Determinanten innerhalb des identifizierten U_{Alb1} -QTL auf die Ausbildung einer pathologischen U_{Alb} und dies unabhängig vom Risikofaktor Hypertonie.

Der zwischen den kongenen Linien MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) identifizierte U_{Alb1} -QTL auf RNO6 weist derzeit 75 sicher kartierte Gene auf. In orientierenden Voranalysen der Arbeitsgruppe zeigte sich für männliche Tiere der Parentalstämme MWF und SHR für das Gen *Tmem63c*, welches randständig am 3'-Ende des U_{Alb1} -QTL lokalisiert ist, in der 8. Woche ein differentes Expressionsprofil zu Gunsten einer signifikanten Überexpression bei nierenkranken MWF-Individuen ($p < 0,0001$). Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Genexpression bei den den U_{Alb1} -QTL flankierenden kongenen Linien MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) sowie des konsomen Stamms MWF-6^{SHR} konnte das differente Expressionsprofil bestätigt und die allelische Regulation des Gens *Tmem63c* bestätigt werden. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass trotz der zahlreichen Möglichkeiten der Gen-Gen-Interaktion die regulativen Mechanismen des Gens *Tmem63c* nicht oder nur unwesentlich dem Einfluss des MWF-Hintergrundgenoms unterliegen.

Die Gründe für ein differentes Expressionmuster zwischen zwei kontrastierenden Populationen sind vielfältig. Polymorphismen beispielsweise in Promoterregionen, kodierenden Bereichen oder auch innerhalb weiter entfernt lokalisierten Enhancer-Elementen können direkt Einfluss auf die Genexpression nehmen. Auch Störungen in der Funktion des translatierten Proteinproduktes können retrograd im Sinne eines kompensatorischen Regulationsmechanismus mit Änderungen der Transkriptionsrate

einhergehen. In einer kooperativ durchgeführten vergleichenden Sequenzierung des U_{Alb1} -QTL mittels NGS konnte zwischen den Parentaltieren MWF und SHR eine Punktmutation innerhalb des nicht-kodierenden Introns 18 (Basenpaar 111.101.251) an einer potentiellen alternativen Splicestelle identifiziert werden (nicht-publizierte Daten der Arbeitsgruppe). Inwiefern diese einen relevanten molekularen Defekt darstellt und Einfluss auf den nachfolgenden Transkriptionsprozess ausübt, bleibt vorerst jedoch ungeklärt.

Sexuelle Dimorphismen beruhen auf dem Einfluss der auf den Geschlechtschromosomen kartierten Gene sowie auf einer hormonell bedingten, geschlechtsspezifischen Genexpression autosomaler Gene [128]. Geschlechtsabhängige, differente Expressionsmuster, die zu gravierend unterschiedlichen (patho-)physiologischen Abläufen zwischen den Geschlechtern führen können, konnten in Vergangenheit in vielen somatischen Geweben nachgewiesen werden, [129-131]. Da beim nierenkranken Rattenstamm MWF ein sexueller Dimorphismus bekannt ist, der bei Weibchen zu einer signifikant milderen Albuminurieentwicklung führt [92, 94-96], wurde die *Tmem63c*-Expression zusätzlich an weiblichen Individuen im Altersverlauf untersucht. Dabei zeigte sich ein für männliche Tiere vergleichbares Transkriptmuster. Die Regulation des Gens scheint somit auf mRNA-Ebene innerhalb eines Geschlechts ähnlichen physiologischen Mechanismen zu unterliegen. Beim direkten Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Individuen der Parentalstämme zeigten SHR-Weibchen gegenüber männlichen SHR-Tieren eine Steigerung des *Tmem63c*-Transkriptes um etwa 50%, wohingegen weibliche MWF-Individuen gegenüber den MWF-Männchen lediglich eine tendentielle Zunahme ohne Erreichen des Signifikanzniveaus aufwiesen. Somit scheint für *Tmem63c* zum Zeitpunkt der 8. Woche ein stammesabhängiges, geschlechtsspezifisches mRNA-Expressionsprofil vorzuliegen, welches jedoch in einer Altersverlaufsstudie validiert werden müsste. Aussagen über mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede auf Proteinebene können an dieser Stelle jedoch nicht getroffen werden und bedürfen der weiteren Untersuchung.

Differentielle Expressionsanalysen sind ein wichtiges Instrument bei der Identifikation potentieller krankheitsassoziiertes Kandidatengene. Eine kausale Beteiligung über- oder

unterexprimierter Gene an einem gewünschten Phänotypen bleibt jedoch zunächst rein spekulativ. Werden Expressionsdaten der mRNA auf Proteinebene extrapoliert, so zeigt sich, dass das Expressionsprofil eines Gens nicht immer unmittelbar mit der translatierten Proteinmenge im untersuchten Gewebe korreliert [132, 133]. Die Gründe für diese fehlende Korrelation sind vielfältig und umfassen neben komplexen posttranslationalen Regulationsmechanismen auch unterschiedliche Halbwertszeiten von mRNA und Protein in vivo sowie intrazelluläre Lokalisation und Komplexbildung, welche die nachfolgenden methodischen Analysen erschweren [134]. Da letztlich nicht Gene, sondern das Proteom einer Zelle bzw. eines Gewebes den Phänotypen bedingen, sind weiterführende Untersuchungen auf Proteinebene zwingend notwendig. Zur Analyse des Gens *Tmem63c* auf Proteinebene wurden zunächst Western Blot-Analysen unter Verwendung von Glomeruli-Isolaten männlicher Individuen zu definierten Zeitpunkten durchgeführt. Unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Antikörper konnte keine Bande im Bereich des anhand der Aminosäuresequenz errechneten MG von ~93 kDa detektiert werden. Zudem erwies sich das unter den eingesetzten Antikörpern resultierende Bandenmuster untereinander als nicht konform, sodass angesichts der divergierenden Ergebnisse berechnete Zweifel an der Spezifität der Antikörper bestanden. Das Problem nicht geeigneter bzw. nicht ausreichend validierter, kommerziell erhältlicher Antikörper ist indes hinreichend bekannt [135, 136]. Berglund et al. kamen in einer 2008 veröffentlichten Arbeit im Rahmen des Human Protein Atlas-Projektes zu dem Ergebnis, dass nur knapp 50% der > 2500 getesteten, kommerziellen Antikörper erfolgreich in Western Blot- oder Immunhistochemie-Experimenten eingesetzt werden konnten [137]. Nach aktuellem Kenntnisstand liegen derzeit bisher keine erfolgreich publizierte Ergebnisse unter Verwendung der in dieser Arbeit aufgeführten kommerziellen Antikörper vor, die eine Interpretation hinsichtlich ihrer Funktionalität erleichtern würden. Erschwerend kommt hinzu, dass nach wie vor nur unzulängliche Informationen bzw. gesicherte Erkenntnisse über das primäre Translationsprodukt des Gens *Tmem63c* und dessen mögliche Prozessierung vorliegen. Auch der Einsatz der Blockingpeptide erbrachte keine ausreichende Sicherheit in Hinblick auf die funktionelle Validierung der Antikörper, da TMEM63C massenspektrometrisch nicht identifiziert werden konnte und das Risiko einer fälschlichen Proteindetektion aufgrund von möglichen Kreuzreaktivitäten die Spezifität der Antikörper für *Tmem63c* weiterhin in Frage stellte.

Angesichts der fraglichen Resultate wurde daher für die Proteinanalyse die Generierung eines eigenen TMEM63C-spezifischen Antikörpers initiiert, dessen effiziente Bildung unter Einsatz entsprechender Pre-Seren nachvollzogen werden konnte. Unter Verwendung des Antikörpers Anti-TMEM63C-1 konnte im Immunoblot erstmals eine distinkte und reproduzierbare Bande bei dem erwarteten MG von ~93 kDa detektiert werden. Daneben fanden sich eine weitere stabile Bande bei ~75 kDa und eine deutlich signalschwächere Fluoreszenz bei ~110 kDa, welche jedoch in Abhängigkeit von unter anderem Beleuchtungszeit oder aufgetragener Proteinmenge stark variierte.

Die unerwartete Detektion multipler Banden ist ein bekanntes Phänomen bei Western Blots und vielfältig im Ursprung. So führen methodische Fehler, wie der Einsatz zu hoher Antikörperkonzentrationen zu unspezifischen Bandendetektionen. Auch eine unzureichende Proteindenaturierung während der Probenaufbereitung oder wiederholtes Ein- und Auftauen der Proben mit folglichem Degradierung des Proteins resultieren in der artifiziellen Detektion von Banden zu hohen oder zu niedrigen MGs [138]. Viele Gene werden jedoch nicht nur in ein einziges Protein translatiert, sondern über alternatives Splicing in mehrere Proteinvarianten unterschiedlicher MG überführt. Posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung oder Phosphorylierung führen zu einer weiteren Diversität von Proteinen und resultieren im Western Blot in einer Abweichung vom zu erwarteten MG. Ob es sich bei den beiden zusätzlich detektierten Banden beispielsweise um komplexierte TMEM63C-Proteine, degradierte Proteinfragmente, Isoformen oder posttranslational prozessierte Formen handelt, bleibt vorerst unklar. Weitere alternative Transkripte des Proteins TMEM63C, wie sie auch beim Menschen auf Grundlage potentieller alternativer Splicevarianten postuliert werden (<http://www.ensembl.org>), sind jedoch nicht auszuschließen. Dass es sich bei den beiden weiteren Banden wahrscheinlich um keine artifizielle Fluoreszenz, sondern um einen realen Befund handelt, untermauert auch das Ergebnis der Western Blots an humanen Podozytenkulturen. Hier konnte ein zu den Glomeruli-Lysaten analoges Bandenmuster detektiert werden.

Trotz der im Western Blot entsprechend des zu erwarteten MGs von TMEM63C bei ~93 kDa detektierten Bande wurde zur zusätzlichen Validierung der Spezifität des Antikörpers Anti-TMEM63C-1 eine massenspektrometrische Untersuchung veranlasst, in der das translatierte Proteinprodukt jedoch nicht identifiziert werden konnte. TMEM63C stellt als Membranprotein eine besondere Herausforderung für die MS-

basierte Proteomanalyse dar. Zunächst ist kritisch zu beleuchten, dass die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen zwar ein etabliertes Standardverfahren zur Proteintrennung darstellt, die eindimensionale Gelelektrophorese jedoch nur eine grobe Auftrennung komplexer Proteingemische erlaubt [139]. Membranproteine zeichnen sich durch eine hohe Hydrophobizität aus, welche ihre Solubilisierung in wässrigen Lösungen stark limitiert, und zeigen im Allgemeinen nur eine geringe Abundanz in Proteingemischen [140, 141]. Erschwerend kommt hinzu, dass nicht alle Detergenzien, welche für die Extraktion der Proteine aus der Gelmatrix benötigt werden, mit MS-Methoden kompatibel sind und Lysin-/Arginin-Schnittstellen für Trypsin, dem Standardenzym für die Degradation des Proteins, aufgrund des hydrophoben Charakters von Membranproteinen unterrepräsentiert sind [140]. Da das MS-Signal mit der Menge des zu analysierenden Proteins korreliert, kann das gesuchte Protein durch eine geringe Konzentration im Hintergrundrauschen maskiert oder durch eine relative Überrepräsentation anderer Peptidfragmente fälschlicherweise nicht identifiziert werden. Ein ausbleibender positiver Nachweis des entsprechenden Proteins darf daher keineswegs zwangsläufig als Beweis für seine Abwesenheit gewertet werden. Möglicherweise hätten an dieser Stelle leistungsstärkere multidimensionale Auftrennungs- und Proteinkonzentrierungsverfahren die Wahrscheinlichkeit einer massenspektrometrischen Detektion des Proteins TMEM63C erhöht.

Neben den Western Blot-Analysen wurden in Kooperation immunhistochemische Untersuchungen an in Paraffin eingebetteten Nierenschnitten von 4, 8 und 24 Wochen alten MWF- und SHR-Tieren unter Verwendung des Antikörpers Anti-TMEM63C-1 durchgeführt. Hierbei konnte zu allen Zeitpunkten eine starke Expression des Proteins in den Podozyten der Glomeruli nachgewiesen und damit der Befund des Western Blots bestätigt werden. Daneben zeigte sich eine im Altersverlauf zunehmende Expression im Bürstensaum der proximalen Tubuli. Wie bereits einleitend dargestellt, ist die erhöhte U_{Alb} Ausdruck einer strukturellen oder funktionellen Störung des glomerulären Filtrationsapparates und/oder des tubulären Resorptionsmechanismus. Die Ergebnisse legen nahe, dass TMEM63C mindestens in einen dieser beiden Mechanismen involviert ist. Des Weiteren zeigten beide Stämme korrelierend zur zunehmenden Expression des Proteins im Bürstensaum eine abnehmende Expression in der Macula densa der Pars recta des distalen Tubulus. Die Macula densa ist Teil des juxtaglomerulären Apparates,

welcher über den tubuloglomerulären Feedbackmechanismus über die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems Einfluss auf die Regulierung des Salz- und Wasserhaushaltes sowie den Blutdruck nimmt. Bei Blutdruckabfall oder einer erniedrigten NaCl-Konzentration im Tubuluslumen wird vermehrt Renin aus den Zellen der Macula densa freigesetzt, welches über mehrere Zwischenschritte zur gesteigerten Bildung von Angiotensin II führt. Angiotensin II wiederum steigert direkt die Vasokonstriktion des Vas efferens des Glomerulums, erhöht somit die GFR und führt indirekt über die Stimulation von Aldosteron aus der Nebenniere zu einer vermehrten Natriumretention im distalen Nephron. Daneben führt eine langandauernde Stimulation des RAAS jedoch auch zu pathophysiologischen Prozessen, welche direkt oder indirekt zur Entwicklung der Proteinurie beitragen. Podozyten exprimieren an ihrer Oberfläche unter anderem Angiotensin II-, Mineralkortikoid- und Proreninrezeptoren, über deren Stimulation entscheidende Funktionen, wie Kontraktilität, Apoptose, Autophagozytose oder die zytoskelettale Organisation reguliert werden [142]. So bewirken erhöhte Angiotensin II-Spiegel eine Abnahme negativ geladener Proteoglykane der glomerulären Filtrationsmembran und die Suppression von Nephrin mit folglich gesteigerter Apoptose der Podozyten [143]. Somit steht eine Reihe von Ansatzstellen zur Verfügung, in welche TMEM63C aufgrund seines Expressionsmusters eingreifen könnte. In welche dieser diversen pathophysiologischen Mechanismen TMEM63C anteilig jedoch am meisten involviert ist, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung.

Mittels Immunhistochemie und Western Blot-Analysen konnte der Nachweis der Translation von *Tmem63c* auf Proteinebene erbracht werden. Quantitativ konnte im Western Blot zwischen den kontrastierenden Parentalstämmen MWF und SHR keine überzeugenden Unterschiede bezüglich der *Tmem63c*-Expression nachgewiesen werden. Lediglich zum Zeitpunkt der 4. Woche zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu Gunsten des nierengesunden SHR-Stammes ($p < 0,05$), welcher in der quantitativen Analyse der Immunhistochemie bei hier vergleichbaren Expressionslevel beider Parentalstämme nicht bestätigt werden konnte. Hier zeigten 8 Wochen alte MWF-Individuen im Vergleich zum gesunden SHR-Stamm eine signifikant niedrigere Proteinexpression ($p < 0,01$), welche sich in der 24. Woche zu Gunsten des MWF-Stammes umkehrte ($p < 0,001$).

Die intermodalen Differenzen in den quantitativen Resultaten zwischen Immunhistochemie und Western Blot sind vielfältig. Grundlegend ist zu erwähnen, dass es sich bei beiden Verfahren lediglich um semiquantitative Methoden handelt. Obwohl der Western Blot zu den etablierten Methoden in der Proteomanalyse zählt, ist insbesondere die Aussagekraft der Densitometrie in jüngster Vergangenheit zunehmend kritisch beleuchtet worden. Gassmann et al. analysierten unterschiedliche Quantifizierungsmethoden des Western Blots und kamen zu dem Ergebnis, dass sich aus den gleichen Daten je nach Analyseverfahren sich widersprechende, jedoch jeweils signifikante Resultate generieren lassen [144]. Da TMEM63C unter anderem auch im proximalen Bürstensaum exprimiert wird, können Verunreinigungen der Glomeruli-Isolate während der Probengewinnung mit Tubulusfragmenten bzw. am Glomerulum noch residuell anteiligen proximalen Tubulusabschnitten zu einer relevanten Verschiebung der Proteinkonzentration führen, wohingegen die Immunhistochemie eine selektive Anfärbbarkeit unterschiedlicher Zellen ermöglicht. Zudem wurde bei der semiquantitativen Auswertung des Western Blots lediglich die Bande bei ~93 kDa, dem erwarteten MG von TMEM63C, berücksichtigt. Wie bereits erwähnt, bleibt aktuell unklar, inwieweit die beiden anderen Banden bei ~110 kDa und 75 kDa modifizierte oder degradierte Proteinformen darstellen und somit in die Auswertung hätten einfließen müssen. Von Seiten der Immunhistochemie könnten Unterschiede in der Morphologie, insbesondere die starke glomeruläre Hypertrophie/-plasie des nierenkranken MWF-Stammes mit einer konsekutiven Intensitätsabnahme des einzelnen Podozytensignals zu einer Verfälschung der ermittelten Proteinexpression beitragen.

Eine mögliche Interpretation der immunhistochemischen Befunde wäre, dass bei MWF-Individuen im Gegensatz zu SHR die gegenüber der 4. Woche gesteigerte Expression des Proteins in der 8. Woche ausbleibt und kompensatorisch verzögert erst bis zur 24. Woche erfolgt, wenn bereits irreversible glomeruläre Defekte mit einer massiven U_{Aib} eingetreten sind. Dieser Befund steht auch im Einklang mit der funktionellen Relevanzanalyse, bei der sich ein hoher Impact des $U_{Aib}1$ -QTL vor allem im frühen und mittleren Lebensalter zeigte. An dieser Stelle sind jedoch weitere spezifischere Untersuchungen, beispielsweise an aus den Parentalstämmen MWF und SHR mittels Durchflusszytometrie isolierten Podozyten zur Validierung des Ergebnisses sicherlich wünschenswert. Ergänzend sei zu erwähnen, dass ein quantitativer Unterschied,

sowohl eine Über-, als auch Unterexpression, nur eine mögliche Erklärung für die Entwicklung eines pathologischen Phänotypen darstellt und keine Aussage über die Funktionalität des translatierten Proteins erlaubt.

Die funktionelle Relevanz des U_{Alb} 1-QTL auf RNO6 konnte durch die phänotypische Charakterisierung des konsomen Stammes MWF-6^{SHR} und der den U_{Alb} 1-QTL flankierenden kongenen Linien MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat81*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mgh4*) bewiesen werden. Zwar konnte durch die Etablierung der kongenen Rattenstämme das informative Intervall deutlich eingengt werden, der Einfluss zusätzlicher Loci bzw. weiterer innerhalb des identifizierten chromosomalen Abschnittes kartierender Gene auf die U_{Alb} kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Für den Nachweis einer unmittelbaren kausalen Beteiligung des Kandidatengenes *Tmem63c* am Phänotyp „Albuminurie“ sind aus diesem Grunde letztlich Analysen an genetisch veränderten Tierlinien notwendig. Hierfür geeignete transgene Linien stellen beispielsweise Knockout-Modelle dar, bei denen das zu analysierende Gen im Genom des Individuums vollständig abgeschaltet wird. Da zum Zeitpunkt der Arbeit keine entsprechenden Rattenmodelle für *Tmem63c* etabliert waren und deren Entwicklung zeitintensiv und durch die potentielle Avitalität der Nachkommen mit einem ungewissen Ausgang verbunden war, wurden in unserer Arbeitsgruppe nach Abschluss dieser Arbeit funktionelle Analysen an einem transgen veränderten Zebrafisch (*fabp10a:gc-EGFP*) durchgeführt. Dieser exprimiert ein Vitamin D-bindendes Protein, welches aufgrund mit Albumin vergleichbaren Eigenschaften die Analyse der glomerulären Filtration erlaubt und gekoppelt an das grün fluoreszierende Protein EGFP (enhanced green fluorescent protein) mittels Fluoreszenzmikroskopie in Blut und Fischwasser quantifiziert werden kann. Ein Knockdown von *Tmem63c* mittels Morpholino- und CRISPR/Cas9-Technologie resultierte in einem signifikanten Verlust des Vitamin D-bindenden Proteins im Blut der Fische mit korrespondierendem Anstieg der Konzentration im Fischwasser (nicht-publizierte Daten der Arbeitsgruppe). Diese Ergebnisse belegen eine unmittelbare kausale Beteiligung des Proteins TMEM63C an der Entwicklung der U_{Alb} und lassen vermuten, dass das Protein essenziell für die Aufrechterhaltung und Integrität der GFB ist.

Zuletzt bleibt die Frage, in welche pathophysiologischen Mechanismen das Protein TMEM63C involviert ist. Das Protein gilt bis heute als nur wenig charakterisiert. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit ließen sich erste Gen- bzw. Proteincharakteristika lediglich anhand computerbasierter Analysesysteme postulieren, wie beispielsweise die mutmaßlich transmembrane Lokalisation des Proteins. Ein weiterer Ansatz für die funktionelle Charakterisierung des Proteins stellen die Präsenz der Proteindomänen DUF221, DUF4463 sowie Pfam13967 dar. Domänen repräsentieren definierte Funktionseinheiten innerhalb eines Proteins. Da sie evolutionär meist hoch konservierten Proteinregionen entsprechen, lassen homologe Sequenzen in unterschiedlichen Proteinklassen auf eine ähnliche Proteinfunktion hinweisen. Erste Anhaltspunkte auf die Funktion des Proteins lieferten Hou et al. in einer 2014 veröffentlichten Arbeit. Die Autoren untersuchten mehrere integrale Transmembranproteine der Pflanzenart *Arabidopsis thaliana* und identifizierten das Gen At4G22120, dessen Überexpression unter Induktion hyperosmolaren Stresses zu einem vermehrten intrazellulären Calziumeinstrom führte. Das Gen enthält die bis dahin funktionell noch unbekannt Domäne DUF221, weswegen die Autoren Proteinen mit dieser Domäne Kalzium-permeable Kanalfunktionen zuschrieben [145]. Interessanterweise entspricht das untersuchte Gen At4G22120 dem Pflanzen-Ortholog zu *Tmem63c* bei Säugetieren. *Tmem63c* wird seither basierend auf dieser Arbeit auch unter der Bezeichnung „Calcium Permeable Stress-Gated Cation Channel 1“ geführt. Die Bedeutung des Calziumhaushaltes für die Aufrechterhaltung der GFB zeigen Analysen der TRPC (transient receptor potential canonical)-Kanäle, welche in den letzten Jahren zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen haben. Dabei handelt es sich um eine Familie von sieben Mitgliedern, welche in Form von Homo- oder Heterotetrameren nichtselektive Kationenkanäle bilden und über einen G-Protein-gekoppelten Signalweg oder über Tyrosinkinase wesentlich an der Regulation des Calziumeinstroms teilnehmen. Genetische Stammbaumanalysen mehrerer Studien konnten zeigen, dass Mutationen im TRPC6-Gen mit der familiären fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) kosegregieren [146, 147]. Reiser et al. zeigten, dass TRPC6 insbesondere in den Podozytenfortsätzen in enger Assoziation zum Schlitzdiaphragma exprimiert wird und postulierte eine essentielle Bedeutung für die strukturelle und funktionelle Integrität von Podozyten [146]. Nähere Erkenntnisse erbrachten Möller et al. in einer Folgestudie. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, das die TRP-Kanäle in

enger Assoziation zum Zytoskelett der Podozyten stehen und eine Überexpression mit einem Verlust von Fibrillenbündeln einhergeht, welche von essentieller Bedeutung für die Motilität der Podozytenfüßchen sind [148]. In ersten Arbeiten zur in vivo Multiphotonenmikroskopie konnte der dynamische Calciumstrom in Podozyten von Mäusenieren visualisiert werden. Hierunter zeigte sich, dass erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen mit einem unmittelbaren temporären Albuminaustritt in die Bowmansche Kapsel einhergingen [149].

Die hier vorgestellten Arbeiten zeigen, wie einzelne Kandidatengene komplex polygenetisch determinierter Phänotypen wie der Albuminurie über Feinkartierung, molekulare Analysen und Proteinuntersuchungen erfolgreich identifiziert werden können. Mit *Tmem63c* steht ein bislang erstmals beschriebenes und somit völlig neuartiges, vielversprechendes Kandidatengen für die U_{Alb} zur Verfügung. Ein nächster bedeutender Schritt für die weitere Charakterisierung des Gens *Tmem63c* bzw. seines translatierten Proteins stellt sicherlich die Etablierung eines Knockdown-Rattenstammes dar, anhand dessen beispielsweise morphologische Nierenveränderungen auf zellulärer Ebene im Detail aufgearbeitet werden können. Von besonderem Interesse dürften zukünftig auch Funktionsanalysen zur Charakterisierung der genauen pathophysiologischen Mechanismen, in die *Tmem63c* involviert ist und die Validierung der bisher in der Literatur zu findenden Hinweise auf die Beteiligung des Gens im Calciumstoffwechsel sein. Auch die Identifizierung von übergeordneten Pathways und epistatischen Interaktionen wäre für weiterführende Analysen wünschenswert. Desweiteren bedarf es noch näheren Untersuchungen auf molekularer Ebene, beispielsweise das Screening nach Genvarianten über vergleichende Sequenzierung zur Entschlüsselung von Mutationen oder alternativen Splicevarianten. Nicht zuletzt ermutigen die bisherigen Erkenntnisse im Tiermodell auch zur zukünftigen translationalen Erforschung des Gens im humanen Kontext. Unabhängig vom identifizierten Kandidatengen *Tmem63c* bietet der identifizierte U_{Alb} 1-QTL zudem noch weitere kartierte Gene mit bislang unbekannter Relevanz für Nierenerkrankungen, welche jedoch potentiell an der Pathogenese der U_{Alb} beteiligt sein können und somit Grundlage weiterer Forschung bieten.

6. Literaturverzeichnis

1. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl.* 2013; 3(1):1-150.
2. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet* 2013;382:260-72.
3. Fresenius Medical Care: ESRD Patients in 2013. A Global Perspective. Fresenius Medical Care Deutschland GmbH, Bad Homburg 2014.
4. Frei U, Schober-Halstenberg HJ. Nierenerstanztherapie in Deutschland, Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007: Quasie-Niere gGmbH 2008.
5. United States Renal Data System, 2014 USRDS annual data report: An overview of the epidemiology of kidney disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2014.
6. Wang XC, Liu CH, Chen YJ, Wu Y, Yang LS, Liu HM, Liao HL. Clinical and pathological analysis of the kidney in patients with hypertensive nephropathy. *Exp Ther Med.* 2013 Nov;6(5):1243-1246. pp. 1243-1246.
7. Keith DS, Nichols GA, Gullion CM, Brown JB, Smith DH. Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch Intern Med.* 2004 Mar 22;164(6):659-63.
8. Couser WG, Remuzzi G, Mendis S, Tonelli M. The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. *Kidney Int.* 2011 Dec;80(12):1258-70.
9. Jha V, Wang AY, Wang H. The impact of CKD identification in large countries: the burden of illness. *Nephrol Dial Transplant.* 2012 Oct;27 Suppl 3:iii32-8.
10. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest.* 2006 Feb;116(2):288-96.
11. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012; 380(9859):2095-128.
12. Eggers PW. Has the incidence of end-stage renal disease in the USA and other countries stabilized? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011 May;20(3):241-5.

13. Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N Engl J Med*. 1984 Jul 12; 311(2):89-93.
14. Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*. 1982 Jun 26; 1(8287):1430-2.
15. Atkins RC, Briganti EM, Lewis JB, Hunsicker LG, Braden G, Champion de Crespigny PJ, DeFerrari G, Drury P, Locatelli F, Wiegmann TB, Lewis EJ. Proteinuria reduction and progression to renal failure in patients with type 2 diabetes mellitus and overt nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2005 Feb;45(2):281-7.
16. de Zeeuw D, Remuzzi G, Parving HH, Keane WF, Zhang Z, Shahinfar S, Snapinn S, Cooper ME, Mitch WE, Brenner BM. Proteinuria, a target for renoprotection in patients with type 2 diabetic nephropathy: lessons from RENAAL. *Kidney Int*. 2004 Jun;65(6):2309-20.
17. Ruggenenti P, Perna A, Remuzzi G; GISEN Group Investigators. Retarding progression of chronic renal disease: the neglected issue of residual proteinuria. *Kidney Int*. 2003 Jun;63(6):2254-61.
18. Ishani A, Grandits GA, Grimm RH, Svendsen KH, Collins AJ, Prineas RJ, Neaton JD. Association of single measurements of dipstick proteinuria, estimated glomerular filtration rate, and hematocrit with 25-year incidence of end-stage renal disease in the multiple risk factor intervention trial. *J Am Soc Nephrol*. 2006 May;17(5):1444-52.
19. Remuzzi G, Bertani T. Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules? *Kidney Int*. 1990 Sep; 38(3):384-94.
20. Remuzzi G. Abnormal protein traffic through the glomerular barrier induces proximal tubular cell dysfunction and causes renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1995 Jul;4(4):339-42.
21. Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol*. 2006 Nov; 17(11):2974-84.
22. Birn H, Christensen EI. Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int*. 2006 Feb; 69(3):440-9.
23. Ruggenenti P, Remuzzi G. The role of protein traffic in the progression of renal diseases. *Annu Rev Med*. 2000; 51:315-27.
24. Parving HH, Lewis JB, Ravid M, Remuzzi G, Hunsicker LG; Jun, DEMAND investigators. Prevalence and risk factors for microalbuminuria in a referred cohort of type II diabetic patients: a global perspective. *Kidney Int*. 2006 Jun;69(11):2057-63.

25. Jones CA, Francis ME, Eberhardt MS, Chavers B, Coresh J, Engelgau M, Kusek JW, Byrd-Holt D, Narayan KM, Herman WH, Jones CP, Salive M, Agodoa LY. Microalbuminuria in the US population: third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis.* 2002 Mar;39(3):445-59.
26. Hillege HL, Janssen WM, Bak AA, Diercks GF, Grobbee DE, Crijns HJ, Van Gilst WH, De Zeeuw D, De Jong PE und Group, Prevend Study. Microalbuminuria is common, also in a nondiabetic, nonhypertensive population, and an independent indicator of cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity. *J Intern Med.* 2001 Jun;249(6):519-26.
27. Wachtell K, Palmieri V, Olsen MH, Bella JN, Aalto T, Dahlöf B, Gerds E, Wright JT Jr, Papademetriou V, Mogensen CE, Borch-Johnsen K, Ibsen H, Devereux RB. Urine albumin/creatinine ratio and echocardiographic left ventricular structure and function in hypertensive patients with electrocardiographic left ventricular hypertrophy: the LIFE study. Losartan Intervention for Endpoint Reduction. *Am Heart J.* 2002 Feb;143(2):319-26.
28. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002 Feb;39(2 Suppl 1):S1-266.
29. Hillege HL, Fidler V, Diercks GF, van Gilst WH, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ, Gans RO, Janssen WM, Grobbee DE, de Jong PE und Group., Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease (PREVEND) Study. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation.* 2002 Oct 1;106(14):1777-82.
30. Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B, Strandgaard S, Schroll M, Jensen JS. Urinary albumin excretion. An independent predictor of ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Aug;19(8):1992-7.
31. Yuyun MF, Khaw KT, Luben R, Welch A, Bingham S, Day NE, Wareham NJ. A prospective study of microalbuminuria and incident coronary heart disease and its prognostic significance in a British population: the EPIC-Norfolk study. *Am J Epidemiol.* 2004 Feb 1;159(3):284-93.
32. Arnlöv J, Evans JC, Meigs JB, Wang TJ, Fox CS, Levy D, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Vasan RS. Low-grade albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2005 Aug 16;112(7):969-75.
33. Schmieder RE, Mann JF, Schumacher H, Gao P, Mancia G, Weber MA, McQueen M, Koon T, Yusuf S und Investigators, ONTARGET. Changes in albuminuria predict mortality and morbidity in patients with vascular disease. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Jul;22(7):1353-64.

34. Diercks GF, Hillege HL, van Boven AJ, Kors JA, Crijns HJ, Grobbee DE, de Jong PE, van Gilst WH. Microalbuminuria modifies the mortality risk associated with electrocardiographic ST-T segment changes. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Oct 16;40(8):1401.
35. Clausen P, Feldt-Rasmussen B, Jensen G, Jensen JS. Endothelial haemostatic factors are associated with progression of urinary albumin excretion in clinically healthy subjects: a 4-year prospective study. *Clin Sci (Lond)*. 1999 Jul;97(1):37-43.
36. Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A. Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis. *Diabetologia*. 1989 Apr; 32(4):219-26.
37. Jensen JS, Borch-Johnsen K, Jensen G, Feldt-Rasmussen B. Microalbuminuria reflects a generalized transvascular albumin leakiness in clinically healthy subjects. *Clin Sci (Lond)*. 1995 Jun; 88(6):629-33.
38. Gruden G, Cavallo-Perin P, Bazzan M, Stella S, Vuolo A, Pagano G. PAI-1 and factor VII activity are higher in IDDM patients with microalbuminuria. *Diabetes*. 1994 Mar; 43(3):426-9.
39. Kario K, Matsuo T, Kobayashi H, Matsuo M, Sakata T, Miyata T. Activation of tissue factor-induced coagulation and endothelial cell dysfunction in non-insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 Aug;15(8):1114-20.
40. Diercks GF, van Boven AJ, Hillege HL, Janssen WM, Kors JA, de Jong PE, Grobbee DE, Crijns HJ, van Gilst WH. Microalbuminuria is independently associated with ischaemic electrocardiographic abnormalities in a large non-diabetic population. The PREVEND (Prevention of REnal and Vascular ENdstage Disease) study. *Eur Heart J*. 2000 Dec;21(23):1922-7.
41. Dinneen SF, Gerstein HC. The association of microalbuminuria and mortality in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A systematic overview of the literature. *Arch Intern Med*. 1997 Jul 14; 157(13):1413-8.
42. Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, Hallé JP, Young J, Rashkow A, Joyce C, Nawaz S, Yusuf S und Investigators, HOPE Study. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA*. 2001 Jul 25;286(4):421-6.
43. Ibsen H, Olsen MH, Wachtell K, Borch-Johnsen K, Lindholm LH, Mogensen CE, Dahlöf B, Devereux RB, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wan Y. Reduction in albuminuria translates to reduction in cardiovascular events in hypertensive patients: losartan

intervention for endpoint reduction in hypertension study. *Hypertension*. 2005 Feb;45(2):198-202.

44. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 2000 Jan 20;342(3):145-53.

45. Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney Int*. 2008 Jul; 74(1):22-36.

46. Satchell SC, Tooke JE. What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium? *Diabetologia*. 2008 May; 51(5):714-25.

47. Tojo A, Endou H. Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. *Am J Physiol*. 1992 Oct;263(4 Pt 2):F601-6.

48. Peters T Jr. Serum albumin. *Adv Protein Chem*. 1985;37:161-245.

49. Gekle, M. Renal tubule albumin transport. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:573-94.

50. Tojo A, Kinugasa S. Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. *Int J Nephrol*. 2012;2012:481520.

51. Brinkkoetter PT, Ising C, Benzing T. The role of the podocyte in albumin filtration. *Nat Rev Nephrol*. 2013 Jun; 9(6):328-36.

52. Carone FA, Peterson DR, Oparil S, Pullman TN. Renal tubular transport and catabolism of proteins and peptides. *Kidney Int*. 1979 Sep;16(3):271-8.

53. Cui S, Verroust PJ, Moestrup SK, Christensen EI. Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *Am J Physiol*. 1996 Oct;271(4 Pt 2):F900-7.

54. Christensen EI, Verroust PJ, Nielsen R. Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Pflugers Arch*. 2009 Oct;458(6):1039-48.

55. Singh A, Satchell SC, Neal CR, McKenzie EA, Tooke JE, Mathieson PW. Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Nov; 18(11):2885-93.

56. Suh JH, Miner JH. The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. *Nat Rev Nephrol*. 2013 Aug; 9(8):470-7.

57. Tryggvason, K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary Proteinuria Syndromes and Mechanisms of Proteinuria. *N Engl J Med*. 2006 Mar 30;354(13):1387-401.

58. Böger CA, Chen MH, Tin A, Olden M, Köttgen A, de Boer IH, Fuchsberger C et al. CUBN is a gene locus for albuminuria. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Mar;22(3):555-70.

59. Keller BJ, Martini S, Sedor JR, Kretzler M. A systems view of genetics in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2012 Jan; 81(1):14-21.
60. Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Djurup R, Deckert M. Glomerular size and charge selectivity in insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1988 Jan; 33(1):100-6.
61. Brennan E, McEvoy C, Sadlier D, Godson C, Martin F. The genetics of diabetic nephropathy. *Genes (Basel).* 2013 Nov 5;4(4):596-619.
62. Hill GS. Hypertensive nephrosclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008 May;17(3):266-70.
63. Mennuni S, Rubattu S, Pierelli G, Tocci G, Fofi C, Volpe M. Hypertension and kidneys: unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. *J Hum Hypertens.* 2014 Feb; 28(2):74-9.
64. Daviglus ML, Greenland P, Stamler J, Elliott P, Appel LJ, Carnethon MR, Chan Q, Claeys G, Kesteloot H, Miura K, Nakagawa H, Pirzada A, Steffen L, Yan LL, Zhou B, Dyer AR. Relation of nutrient intake to microalbuminuria in nondiabetic middle-aged men and women: International Population Study on Macronutrients and Blood Pressure (INTERMAP). *Am J Kidney Dis.* 2005 Feb;45(2):256-66.
65. Pinto-Sietsma SJ, Mulder J, Janssen WM, Hillege HL, de Zeeuw D, de Jong PE. Smoking is related to albuminuria and abnormal renal function in nondiabetic persons. *Ann Intern Med.* 2000 Oct 17; 133(8):585-91.
66. Pedrinelli R, Dell'Omo G, Di Bello V, Pontremoli R, Mariani M. Microalbuminuria, an integrated marker of cardiovascular risk in essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2002 Feb; 16(2):79-89.
67. Liese AD, Hense HW, Döring A, Stieber J, Keil U. Microalbuminuria, central adiposity and hypertension in the non-diabetic urban population of the MONICA Augsburg survey 1994/95. *J Hum Hypertens.* 2001 Nov; 15(11):799-804.
68. Fogarty DG, Hanna LS, Wantman M, Warram JH, Krolewski AS, Rich SS. Segregation analysis of urinary albumin excretion in families with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2000 Jun; 49(6):1057-63.
69. Fogarty DG, Rich SS, Hanna L, Warram JH, Krolewski AS. Urinary albumin excretion in families with type 2 diabetes is heritable and genetically correlated to blood pressure. *Kidney Int.* 2000 Jan; 57(1):250-7.
70. Rapp JP. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev.* 2000 Jan;80(1):135-72.
71. Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ. Finding genes that underlie complex traits. *Science.* 2002 Dec 20;298(5602):2345-9.

72. Nadeau JH. Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet.* 2001 Mar;2(3):165-74.
73. Tanksley SD. Mapping polygenes. *Annu Rev Genet.* 1993;27:205-33.
74. Freedman BI, Beck SR, Rich SS, Heiss G, Lewis CE, Turner S, Province MA, Schwander KL, Arnett DK, Mellen BG; HyperGEN Investigators. A genome-wide scan for urinary albumin excretion in hypertensive families. *Hypertension* 2003; 42(3):291-6.
75. Fox CS, Yang Q, Guo CY et al. Genome-wide linkage analysis to urinary microalbuminuria in a community-based sample: the Framingham Heart Study. *Kidney Int.* 2005 Jan;67(1):70-4.
76. Krolewski AS, Poznik GD, Placha G et al. A genome-wide linkage scan for genes controlling variation in urinary albumin excretion in type II diabetes. *Kidney Int.* 2006 Jan;69(1):129-36.
77. Arar N, Nath S, Thameem F, Bauer R, Voruganti S, Comuzzie A, Cole S, Blangero J, MacCluer J, Abboud H. Genome-wide scans for microalbuminuria in Mexican Americans: the San Antonio Family Heart Study. *Genet Med.* 2007 Feb;9(2):80-7.
78. Iyengar SK, Abboud HE, Goddard KA et al. Genome-wide scans for diabetic nephropathy and albuminuria in multiethnic populations: the family investigation of nephropathy and diabetes (FIND). *Diabetes.* 2007 Jun;56(6):1577-85.
79. Leon JM, Freedman BI, Miller MB et al. Genome scan of glomerular filtration rate and albuminuria: the HyperGEN study. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Mar;22(3):763-71.
80. Mottl AK, Vupputuri S, Cole SA, et al. Linkage analysis of albuminuria. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Jul;20(7):1597-606.
81. Ganten D, de Jong W. Experimental and genetic models of hypertension. In: Ganten D and de Jong W, eds. *Handbook of Hypertension.* Elsevier Science B.V., 1994; Vol.16.
82. Rubattu S, Struk B, Kreutz R, Volpe M, Lindpaintner K. Animal models of genetic hypertension: what can we learn for human hypertension? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995 Dec; 22(12):S386-93.
83. Lazar J, Moreno C, Jacob HJ, Kwitek AE. Impact of genomics on research in the rat. *Genome Res.* 2005 Dec;15(12):1717-28.
84. Hedrich H. History, strains and models. In: Krinke GJ (ed): *The Laboratory Rat 2000;* Press, Academic; 3-16.
85. Kreutz R, Hübner N. Congenic rat strains are important tools for the genetic dissection of essential hypertension. *Semin Nephrol.* 2002 Mar; 22(2):135-47.

86. Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, Scott G, Steffen D, Worley KC, Burch PE, et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*. 2004 Apr 1;428(6982):493-521.
87. Hackbarth H, Gartner K, Alt JM, Stolte H. A subline of the Munich Wistar (MW) strain, response to selection for surface glomeruli. *Rat News Lett* 1980; 7:23.
88. Hackbarth H, Buttner D, Jarck D, Pothmann M, Messow C, Gartner K. Distribution of glomeruli in the renal cortex of Munich Wistar Fromter (MWF) rats. *Ren Physiol*. 1983;6(2):63-71.
89. Schulz A, Kreutz R. Mapping genetic determinants of kidney damage in rat models. *Hypertens Res*. 2012 Jul; 35(7):675-94.
90. Hackbarth H, Gwinner W, Alt JM, Hagemann I, Thiemann A, Finke B. The Munich Wistar Frömter rat: proteinuria and blood pressure in correlation to the number of superficial glomeruli. *Ren Physiol Biochem* 1991; 14(6):246-52.
91. Fassi A, Sangalli F, Maffi R, Colombi F, Mohamed EI, Brenner BM, Remuzzi G, Remuzzi A. Progressive glomerular injury in the MWF rat is predicted by inborn nephron deficit. *J Am Soc Nephrol*. 1998 Aug;9(8):1399-406.
92. 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 Jun;18(6):777-82.
93. 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 Dec;14(12):3081-9.
94. Remuzzi A, Puntorieri S, Mazzoleni A, Remuzzi G. Sex related differences in glomerular ultrafiltration and proteinuria in Munich-Wistar rats. *Kidney Int*. 1988 Oct;34(4):481-6.
95. Remuzzi A, Puntorieri S, Alfano M, Macconi D, Abbate M, Bertani T, Remuzzi G. Pathophysiologic implications of proteinuria in a rat model of progressive glomerular injury. *Lab Invest*. 1992 Nov;67(5):572-9.
96. Schulz A, Schlesener M, Weiss J, Hänsch J, Wendt N, Kossmehl P, Grimm D, Vetter R, Kreutz R. Protective effect of female gender on the development of albuminuria in a polygenetic rat model is enhanced further by replacement of a major autosomal QTL. *Clin Sci (Lond)*. 2008 Feb;114(4):305-11.
97. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963 Mar;27:282-93.

98. Okamoto K, Yamori Y, Ooshima A et al. Establishment of the inbred strain of the spontaneously hypertensive rats and genetic factors involved in hypertension. In: Okamoto K, ed. Spontaneous Hypertension. Tokyo, Japan, Springer-Igaku Shoin, 1972:1-8.
99. Volpe M, Rubattu S. Pathophysiological aspects in the different models of genetic hypertension. In: Ganten D and de Jong W, eds. Handbook of Hypertension. Elsevier Science B.V., 1994; Vol.16:366-370.
100. Yamori Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR), the stroke-prone SHR (SHRSP) and their various substrain models for hypertension-related cardiovascular diseases. In: Ganten D and de Jong W, eds. Handbook of Hypertension. Elsevier Science B.V., 1994;Vol.16:346-364.
101. Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. Cardiovasc Res. 1998 Jul;39(1):77-88.
102. Karlsten FM, Andersen CB, Leyssac PP, Holstein-Rathlou NH. Dynamic autoregulation and renal injury in Dahl rats. Hypertension. 1997 Oct;30(4):975-83.
103. Skov K, Nyengaard JR, Korsgaard N, Mulvany MJ. Number and size of renal glomeruli in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens. 1994 Dec;12(12):1373-6.
104. Bakoush O, Tencer J, Torffvit O, Tenstad O, Skogvall I, Rippe B. Increased glomerular albumin permeability in old spontaneously hypertensive rats. Nephrol Dial Transplant. 2004 Jul;19(7):1724-31.
105. Feld LG, Van Liew JB, Galaske RG, Boylan JW. Selectivity of renal injury and proteinuria in the spontaneously hypertensive rat. Kidney Int. 1977 Nov;12(5):332-43.
106. Poyan Mehr A, Siegel AK, Kossmehl P, Schulz A, Plehm R, de Bruijn JA, de Heer E, Kreutz R. Early onset albuminuria in Dahl rats is a polygenetic trait that is independent from salt loading. Physiol Genomics. 2003 Aug 15; 14(3):209-16.
107. Selkoe KA, Toonen RJ. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecol Lett. 2006 May; 9(5):615-29.
108. Jarne P, Lagoda PJ. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends Ecol Evol. 1996 Oct; 11(10):424-9.
109. Kreutz R, Higuchi M, Ganten D. Molecular genetics of hypertension. Clin Exp Hypertens A. 1992;14(1-2):15-34.
110. Borecki IB, Province MA. Linkage and association: basic concepts. Adv Genet. 2008;60:51-74.
111. Lander ES, Green P. Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Apr;84(8):2363-7.

112. Nadeau JH, Singer JB, Matin A, Lander ES. Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains. *Nat Genet.* 2000 Mar; 24(3):221-5.
113. Cowley AW Jr, Roman RJ, Jacob HJ. Application of chromosomal substitution techniques in gene-function discovery. *J Physiol.* 2004 Jan 1;554(Pt 1):46-55.
114. Schulz A, Litfin A, Kossmehl P, Kreutz R. Genetic dissection of increased urinary albumin excretion in the munich wistar fromter rat. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Nov;13(11):2706-14.
115. Schulz A, Weiss J, Schlesener M, Hänsch J, Wehland M, Wendt N, Kossmehl P, Sietmann A, Grimm D, Stoll M, Nyengaard JR, Kreutz R. 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 Jan;18(1):113-21.
116. Kreutz R, Hübner N, James MR, Bihoreau MT, Gaugier D, Lathrop GM, Ganten D, Lindpaintner K: Dissection of a quantitative trait locus for genetic hypertension on rat chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Sep 12;92(19):8778-82.
117. Zemaitis P, Liu K, Jacobs DR Jr, Cushman M, Durazo-Arvizu R, Shoham D, Palmas W, Cooper R, Kramer H. Cumulative systolic BP and changes in urine albumin-to-creatinine ratios in nondiabetic participants of the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014 Nov 7;9(11):1922-9.
118. Lindpaintner K, Takahashi S, Ganten D. Structural alterations of the renin gene in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: examination of genotype-phenotype correlations. *J Hypertens.* 1990 Aug; 8(8):763-73.
119. Herlan L, Schulz A, Schulte L, Schulz H, Hübner N, Kreutz R. Novel candidate genes for impaired nephron development in a rat model with inherited nephron deficit and albuminuria. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2015 Oct; 42(10):1051-8.
120. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000 Oct;25(2):169-93.
121. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996 Oct; 6(10):995-1001.
122. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* 1998 Jun; 24(6):954-8, 960, 962.
123. Fink L, Stahl U, Ermert L, Kummer W, Seeger W, Bohle RM. Rat porphobilinogen deaminase gene: a pseudogene-free internal standard for laser-assisted cell picking. *Biotechniques.* 1999 Mar;26(3):510-6.

124. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov; 193(1):265-75.
125. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*. 1992;24:145-9.
126. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug; 227(5259):680-5.
127. Schulz A, Hänsch J, Kuhn K, Schlesener M, Kossmehl P, Nyengaard JR, Wendt N, Huber M, Kreutz R. Nephron deficit is not required for progressive proteinuria development in the Munich Wistar Fromter rat. *Physiol Genomics*. 2008 Sep 17;35(1):30-5.
128. Wijchers PJ, Festenstein RJ. Epigenetic regulation of autosomal gene expression by sex chromosomes. *Trends Genet*. 2011 Apr; 27(4):132-40.
129. Rinn JL, Snyder M. Sexual dimorphism in mammalian gene expression. *Trends Genet*. 2005 May; 21(5):298-305.
130. Isensee J, Ruiz Noppinger P. Sexually dimorphic gene expression in mammalian somatic tissue. *Gend Med*. 2007;4 Suppl B:S75-95.
131. Ober C, Loisel DA, Gilad Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nat Rev Genet*. 2008 Dec; 9(12):911-22.
132. Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*. 1997 Mar-Apr;18(3-4):533-7.
133. Gygi, SP, Rochon, Y, Franz, BR, Aebersol, R. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar; 19(3):1720–30.
134. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol*. 2003; 4(9):117.
135. Baker M. Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature*. 2015 May 21;521(7552):274-6.
136. Gilda JE, Ghosh R, Cheah JX, West TM, Bodine SC, Gomes AV. Western Blotting Inaccuracies with Unverified Antibodies: Need for a Western Blotting Minimal Reporting Standard (WBMRS). *PLoS One*. 2015 Aug 19; 10(8):e0135392.
137. Berglund L, Björling E, Oksvold P, Fagerberg L, Asplund A, Szigartyo CA, Persson A, Ottosson J, Wernérus H, Nilsson P, Lundberg E, Sivertsson A, Navani S, Wester K, Kampf C, Hober S, Pontén F, Uhlén M. A gene-centric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Oct;7(10):2019-27.

138. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012 Sep; 4(9):429-34.
139. Moebius J, Zahedi RP, Lewandrowski U, Berger C, Walter U, Sickmann A. The human platelet membrane proteome reveals several new potential membrane proteins. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Nov; 4(11):1754-61.
140. Speers AE, Wu CC. Proteomics of integral membrane proteins-theory and application. *Chem Rev*. 2007 Aug;107(8):3687-714.
141. Santoni V, Molloy M, Rabilloud T. Membrane proteins und proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis*. 2000 Apr;21(6):1054-70.
142. Wennmann DO, Hsu HH, Pavenstädt H. The renin-angiotensin-aldosterone system in podocytes. *Semin Nephrol*. 2012 Jul; 32(4):377-84.
143. Rüter C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Nov; 17(11):2985-91.
144. Gassmann M, Grenacher B, Rohde B, Vogel J. Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. *Electrophoresis*. 2009 Jun;30(11):1845-55.
145. Hou C, Tian W, Kleist T, He K, Garcia V, Bai F, Hao Y, Luan S, Li L. DUF221 proteins are a family of osmosensitive calcium-permeable cation channels conserved across eukaryotes. *Cell Res*. 2014 May; 24(5):632-5.
146. Reiser J, Polu KR, Möller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE, Pollak MR. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet*. 2005 Jul;37(7):739-44.
147. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB *Science*. 2005 Jun 17; 308(5729):1801-4.
148. Möller CC, Wei C, Altintas MM, Li J, Greka A, Ohse T, Pippin JW, Rastaldi MP, Wawersik S, Schiavi S, Henger A, Kretzler M, Shankland SJ, Reiser J. Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Jan;18(1):29-36.
149. Burford JL, Villanueva K, Lam L, Riquier-Brison A, Hackl MJ, Pippin J, Shankland SJ, Peti-Peterdi J. Intravital imaging of podocyte calcium in glomerular injury and disease. *J Clin Invest*. 2014 May; 124(5):2050-8.

7. Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Martina Schmidbauer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Feinkartierung und Identifizierung eines neuen Kandidatengens im Albuminurie-QTL auf Rattenchromosom 6 der 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 etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autorin 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.“

Hannover, den

Unterschrift

8. Curriculum Vitae

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

9. Publikationsliste

Originalarbeiten

Buschmann C, **Schmidbauer M**, Tsokos M. Maternal and pregnancy-related death: causes and frequencies in an autopsy study population. *Forensic Sci Med Pathol*. 2013 Sep;9(3):296-307.

Hueper K, Gutberlet M, Bräsen JH, Jang MS, Thorenz A, Chen R, Hertel B, Barmeyer A, **Schmidbauer M**, Meier M, von Vietinghoff S, Khalifa A, Hartung D, Haller H, Wacker F, Rong S, Gueler F. Multiparametric Functional MRI: Non-Invasive Imaging of Inflammation and Edema Formation after Kidney Transplantation in Mice. *PLoS One*. 2016 Sep 15;11(9):e0162705.

Hueper K*, **Schmidbauer M***, Thorenz A, Bräsen JH, Gutberlet M, Mengel M, Hartung D, Chen R, Meier M, Haller H, Wacker F, Rong S, Gueler F. Longitudinal evaluation of perfusion changes in acute and chronic renal allograft rejection using arterial spin labeling in translational mouse models. *J Magn Reson Imaging*. 2017 Dec;46(6):1664-1672.

Getzin T, May M, **Schmidbauer M**, Gutberlet M, Martirosian P, Oertel R, Wacker F, Schindler C, Hueper K. Usability of Functional MRI in Clinical Studies for Fast and Reliable Assessment of Renal Perfusion and Quantification of Hemodynamic Effects on the Kidney. *J Clin Pharmacol*. 2018 Apr;58(4):466-473.

* geteilte Erstautorenschaft

Abstracts

Schmidbauer M, Kreutz R, Schulz A. Identifizierung des Transmembranproteins Tmem63c als neues Kandidatengen für die Albuminurie der MWF-Ratte. 36. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie und Prävention 2012“ der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutsche Hypertonie Gesellschaft. PS5-32. *Ausgezeichnet mit dem Posterpreis und dem Young Investigator Award.*

Schulz A, **Schmidbauer M**, Herlan L, Kreutz R. Identification of transmembrane protein Tmem63c as a novel candidate gene for albuminuria by genetic fine mapping in a genetic rat model. *J Hypertens* 2013. 31; e-Suppl A:e280.

Schulz A, Herlan L, **Schmidbauer M**, Kreutz R. Fine mapping of two loci within a major albuminuria QTL on rat chromosome 6 that affect both albuminuria and deficient nephron development in the Munich Wistar Frömter rat. *Hypertension*. 2013;62:A520

M Schmidbauer, R Chen, L Wang, M Gutberlet, J Bräsen, M Meier, K Madyaningrana, V Vijith, F Wacker, S Immenschuh, F Gueler, K Hueper. Einfluss des freien Hämoglobins auf die Manifestation des akuten Nierenversagens im Mausmodell – nicht-invasive Untersuchung mittels ASL und T2-Mapping. Fortschr Röntgenstr 2017; 189(S 01): S1-S124.

T Getzin, M May, **M Schmidbauer**, M Gutberlet, F Wacker, C Schindler, K Hueper. Funktionelle MRT zur Quantifizierung des pharmakotherapeutischen Effektes eines ACE-Hemmers auf die Nierenperfusion und die T1-Relaxationszeit. Fortschr Röntgenstr 2017; 189(S 01): S1-S124.

M Schmidbauer, S Rong, A Thorenz, M Gutberlet, J Bräsen, D Hartung, R Chen, M Meier, F Wacker, F Gueler, K Hueper. Evaluation der chronischen Nierentransplantatabstoßung mittels T1-Mapping und Diffusionsbildgebung im translationalen Mausmodell. Fortschr Röntgenstr 2018; 190(S 01): S8

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Reinhold Kreutz** für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe in der Klinischen Pharmakologie, die Überlassung dieses spannenden Themas sowie für meine Gestaltungsfreiheit.

Ganz besonderer Dank gilt Frau **Dr. Angela Schulz**. Angela, vielen Dank für deine hervorragende Betreuung über die lange Zeit hindurch, dein mit mir geteiltes Wissen, deine fachlichen Hilfestellungen und deine ständige Gesprächsbereitschaft. Danke auch für deine aufbauenden Worte zwischendurch und dein offenes Ohr auch für private Belange. Zuletzt natürlich auch ein herzliches Dankeschön für deine konstruktive Kritik und Anregungen bei der Anfertigung meiner Promotionsschrift.

Unter den Mitgliedern der AG-Kreutz möchte ich ganz herzlich Frau **Claudia Plum** danken. Claudia, danke für jedes einzelne Falkon-Röhrchen, dass du liebevoll zum Waschen oder Inkubieren auf den Rollenmischer gesetzt hast! Danke für deine mitfühlende Art, die aufbauenden Worte zwischendurch und deine große Herzlichkeit.

Frau **Sabine Wunderlich**[†] gilt mein Dank für die Einarbeitung in die Methoden und für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Albumin-ELISA.

Frau **Dr. Katja Grabowski** danke ich für die Einarbeitung in den Western Blot.

Herrn **Johannes Unland** möchte ich für die Einarbeitung in die tierexperimentellen Methoden danken.

Herrn **Gerd-Jürgen Bublath** gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Tierpräparation und Organentnahme.

In der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin danke ich recht herzlich Frau **Bettina Bublath** und Frau **Christiane Priebisch** für die Betreuung der Rattenzucht.

Den Kooperationspartnern, namentlich Frau **Prof. Dr. Monika Stoll** und **Dr. Marion Scharpfenecker**, danke ich für die gelungene Zusammenarbeit.

Vielen Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie für das freundliche und warme Arbeitsklima.

Oliver, Danke für jeden vorbeigebrachten Proviant an den unzähligen, langen Laborwochenenden und alles, was über den Rahmen dieser Doktorarbeit hinausgeht.