Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

und

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

Untersuchung der genetischen Grundlage der Albuminurie und chronischen Nierenschädigung bei der Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Sabrina Marliese Renate Schütten-Faber; geb. Schütten Tierärztin aus Duisburg Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan:	UnivProf. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter:	UnivProf. Dr. Heidrun Fink
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Reinhold Kreutz
Dritter Gutachter:	Prof. Dr. Helmut Hartmann

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

chromosomes, transfer, losses, kidney disease, chronic disease, oxidative stress, genetic analysis, nehrectomy, rats

Tag der Promotion: 04.05.2012

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.ddb.de abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-149-9 **Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011** Dissertation, Freie Universität Berlin **D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1		Ein	leitu	ing	1
	1.	1	Blut	tdruck und Bluthochdruck	1
		1.1.	1	Mechanismen der Blutdruckregulation	1
		1.1.	2	Bluthochdruck	2
	1.	2	NO	und oxidativer Stress	3
	1.	3	Alb	uminurie und Nierenfunktion	5
	1.	4	Tie	rmodelle für kardiovaskuläre Erkrankungen	7
		1.4.	1	Der SHR-Rattenstamm – Ein Hypertonie-Modell	8
		1.4.	2	Der MWF-Rattenstamm – Ein Albuminurie-Modell	8
		1.4.	3	QTL-Analysen und konsome Stämme	9
	1.	5	Ziel	der Arbeit 1	0
2		Mat	teria	I und Methoden1	3
	2.	1	Mat	terial1	3
		2.1.	1	Chemikalien1	3
		2.1.	2	Puffer und Lösungen1	3
		2.1.	3	Primer und Sonden für die TaqMan – PCR1	4
		2.1.	4	Enzyme1	5
		2.1.	5	Medikamente und Arzneimittel1	5
		2.1.	6	Material und Futtermittel1	5
		2.1.	7	Geräte und Software1	6
	2.	2	Met	thoden 1	7
		2.2.	1	Parentaltiere1	7
		2.2.	2	Haltung1	7
		2.2.	3	Zuchten1	7
		2.2.	4	Studiendesign1	9
		2.2.	5	L-NAME-Applikation2	1
		2.2.	6	Unilaterale Nephrektomie	1

	2.2.7	Schein-OP	22
	2.2.8	Nicht-direkte Blutdruckmessung	23
	2.2.9	Katheter-Implantation zur direkten Blutdruckmessung	23
	2.2.10	Direkte Blutdruckmessung	25
	2.2.11	Präparation der Versuchstiere	25
	2.2.12	Uringewinnung für klinisch-chemische Analysen	26
	2.2.13	Albuminbestimmung im Urin	26
	2.2.14	Biochemische Analysen	27
	2.2.15	Differenzielle Genexpressionsanalysen	27
	2.2.16	Histologische Untersuchungen	29
	2.2.17	Statistische Auswertung	31
3	Ergebr	nisse	32
3	3.1 Stu	ıdie A von der 6. bis zur 24. Woche	32
	3.1.1	Albuminbestimmung im 24 h-Urin	32
	3.1.2	Tail-Cuff- Blutdruckmessung	35
3	3.2 Stu	ıdie B von der 6. bis zur 12. Woche	37
	3.2.1	Albuminbestimmung im 24 h-Urin	38
	3.2.2	Tail-Cuff- Blutdruckmessung	40
	3.2.3	Direkte Blutdruckmessung über Femoralisverweilkatheter	42
	3.2.4	Relatives Linksventrikuläres Gewicht	43
	3.2.5	Cystatin C	44
	3.2.6	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse	45
	3.2.7	Histologie	46
	3.2.8	Biologisch-Chemische Analysen	49
3	3.3 Uni	ilaterale Nephrektomie	51
	3.3.1	Albuminbestimung im 24 h Urin	51
	3.3.2	Blutdruckmessung mit Tail-Cuff	52
	3.3.3	Direkte Blutdruckmessung über Femoralisverweilkatheter	53
	3.3.4	Relatives linksventrikuläres Gewicht	54

	3.3.	5 Cystatin C5	5
	3.3.	6 Ergebnisse der Genexpressionsanalysen50	6
	3.3.	7 Histologie	9
	3.3.	8 Biologisch-Chemische Analysen63	3
4	Dis	kussion	5
4	.1	L-NAME Studien A und B 66	6
4	.2	Nx Studie	3
5	Zus	sammenfassung	D
6	Sur	nmary	3
7	Ver	zeichnisse	5
7	.1	Abbildungen	5
7	.2	Tabellen	B
7	.3	Abkürzungen	B
7	.4	Tierversuchsantragsnummer90	D
8	Lite	eratur	1
An	hang	g 98	B
Pul	blika	ationsverzeichniss	8
P	ublik	kationen	8
А	bstra	acts	8
	2009		
	201	0	9
Dai	Donkoogung		
E:	11.30	tottliche Enklörung	1
	essi	aunche Erklarung 10	1

1 Einleitung

1.1 Blutdruck und Bluthochdruck

1.1.1 Mechanismen der Blutdruckregulation

Die Aufrechterhaltung des arteriellen Blutdrucks unterliegt kurzfristigen und langfristigen Mechanismen der Kreislaufregulation. Bei kurzfristigen Regulationsmechanismen handelt es sich überwiegend um nerval gesteuerte vasomotorische Umstellungen. Zu diesen gehören die Presso- bzw. Dehnungsrezeptorenreflexe, die von den arteriellen Chemorezeptoren ausgelösten Kreislaufeffekte und die Ischämiereaktion des ZNS. Alle diese Mechanismen zeigen einen schnellen Wirkungseintritt mit hoher Intensität der Reaktion, die allerdings innerhalb kurzer Zeit wieder abschwächt. Ergänzt werden diese nerval vermittelten vasomotorischen Effekte durch homorale Einflüsse, dazu gehören u. a. Adrenalin, Noradrenalin, aber auch Adiuretin (ADH) und Angiotensin II (Hall et al., 1990).

Die langfristigen Mechanismen der Blutdruckregulation beruhen in erster Linie auf Vorgängen, die das intravasale Flüssigkeitsvolumen in Relation zur Gefäßkapazität beeinflussen, um so für eine optimale Kreislauffunktion zu sorgen (Abb. 1.). Quantitative Änderungen des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens sind nur durch Verschiebungen des Gleichgewichts zwischen Nettoflüssigkeitsvolumen und renaler Flüssigkeitsausscheidung zu erzielen. Daher ist die renale Volumenregulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) für die Kreislaufregulation von zentraler Bedeutung. RAAS wird durch Sympathicusaktivierung, Blutdruckabfall, vermindertes Blutvolumen und Hyponatriämie aktiviert und führt dazu, dass Wasser und Natrium im Körper zurückgehalten werden und der Blutdruck erhöht wird. Zahlreiche Arzneimittel greifen hemmend in das System ein. Sie werden unter anderem zur Behandlung eines hohen Blutdrucks, bei Herzschwäche und Wasseransammlungen im Körper verwendet (Raij et al., 2001).



Abb. 1. Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Angiotensinogen wird durch Renin zu Angiotensin I aktiviert, über das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) wird Angiotensin II gebildet, welches zur Vasokonstrikton, Blutdruckerhöhung und Aldosteronproduktion führt. Aldosteron führt zur Natrium- und Wasserretention und Kaliumexkretion.

1.1.2 Bluthochdruck

Es existieren zwei Formen der Hypertonie, die primäre und die sekundäre Hypertonie. Der sekundären Hypertonie geht eine organische Ursache voraus, die zur Entwicklung des Bluthochdrucks führt. Mögliche Ursachen sind Nierenschädigungen aufgrund von Diabetes mellitus, chronischer Harnleiterverlegung, glomerulärer Schädigung, zystischer Verdrängung des Nierengewebes oder Hyperaldosteronismus. Die sekundäre Hypertonie wird bei etwa 10 % aller Bluthochdruck-Patienten festgestellt. Der essentielle, primäre oder idiopathische Bluthochdruck, der eine polygenetische Erkrankung darstellt, in dessen Zusammenhang multifaktorielle Umweltbedingen wie Stress, Ernährung und Aktivität eine entscheiden Rolle spielen können, wird beim überwiegenden Teil der hypertensiven Patienten diagnostiziert (Carretero et al., 2000).

Mehr als 25% der Weltbevölkerung leiden an Hypertonie und im Jahr 2025 wird eine Steigerung auf 29% erwartet. Studien aus den letzten 10 Jahren deuten daraufhin, dass

2

Bluthochdruck zunehmend eine Rolle in Entwicklungsländern spielt und in den Industrieländern stagniert, oder gar zurück geht. Die weltweit hohe Prävalenz der Hypertonie führt zu einer Pandemie von kardiovaskulären Krankheiten (Kearney et al., 2005). Während des letzten Jahrhunderts haben sich diese Erkrankungen von einer geringen prozentualen Todesursache zu einer globalen Belastung entwickelt. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind heute für 30% aller Todesfälle weltweit verantwortlich. Der rapide Anstieg der Sterblichkeit durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen über einen relativ kurzen Zeitraum ist vor allem auf Veränderungen der Umwelt- und Risikofaktoren, wie Ernährung und körperliche Betätigung zurückzuführen (Kearney et al., 2005). Die Zusammenhänge zwischen primärer Hypertonie und den daraus resultierenden Endorganschäden sind komplex und nur mangelhaft bekannt. Patienten mit primärer Hypertonie sind einem erhöhten Risiko ausgesetzt, eine chronische Nierenerkrankung zu entwickeln (Abb. 2). Damit steigt das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, welche die häufigste Todesursache durch essentielle Hypertonie darstellt (Rosario et al., 2006). In den letzten Jahrzehnten nahm die Rate des altersbedingten Schlaganfalls stark zu, auch die Fälle von Nierenversagen und Herzinfarkt stiegen rapide an. Ein stark dazu beitragender Faktor ist die inadäguate Behandlung des Bluthochdrucks. Es existiert eine deutliche Korrelation zwischen systolischem Blutdruck und kardiovaskulären Erkrankungen, Nierenerkrankungen und erhöhter Mortalität, selbst bei normotensiven Patienten. Blutdruck stellt sich als quantitatives und individuelles Krankheitskriterium dar, welches keinem definierten Schwellenwert unterliegt, der den Beginn renaler Komplikationen festlegt (Carretero et al., 2000). Der optimale Blutdruck liegt bei 120 mmHg systolisch und 80 mmHg diastolisch. Die Behandlungsmöglichkeiten der hypertensiven Patienten durch ältere Antihypertensiva (Diuretika und Beta-Blocker) und neuere Substanzen (Calciumantagonisten, ACE-Inhibitoren, AT1-Antagonisten) sind in den letzten Jahren durch randomisierte kontrollierte Studien untersucht worden, um die Therapiemöglichkeiten zu optimieren (Leitlinien DHL 2008).

1.2 NO und oxidativer Stress

Eine adaptive Reaktion auf erhöhten Blutdruck ist die vermehrte Stickstoffmonoxid (NO) Produktion, die präventiv gegen Endorganschäden vorbeugt. Die Unterschiede der kardiovaskulären und renalen Morbidität und Mortalität bei Hypertonikern kann teilweise von der individuellen Variation der NO-Bildung aus dem Endothel als Reaktion auf die hämodynamische Belastung bei erhöhtem Blutdruck zurückgeführt werden. NO hält bei normalem Blutdruck einen konstanten vaskulären Tonus aufrecht, während Ang II den vaskulären Tonus erhöht, um einem verminderten Blutdruck entgegenzuwirken.

Die Entwicklung einer essentiellen Hypertonie und/oder der inkorrekte vaskuläre Wandaufbau welche in Folge von Arteriosklerose oder nach Herzinfarkt auftreten können,

hängen möglicherweise nur zu einem Teil mit einem Verlust durch NO zusammen, wohingegen ein Ungleichgewicht zwischen Ang II, NO und O_2^- einen wesentlich größeren Einfluss nimmt.

Bei salzsensitiver, primärerer oder sekundärer Hypertonie ist ein Marker für das kardiovaskuläre und renale Risiko die verminderte Bioverfügbarkeit von NO. Bei Diabetes und Arteriosklerose ist die NO-abhängige vaskuläre Dilatation gestört und kann durch Verringerung der Synthese und / oder die Blockierung der Wirkung von Ang II wiederhergestellt werden (Raij 2001).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass induzierter oxidativer Stress zum Bluthochdruck führt und im Zuge dessen auch Nierenschäden hervorruft (Abb. 2). Umgekehrt nimmt bei Behandlung mit Antioxidantien der Bluthochdruck ab (Manning et al., 2005). Es gibt Hinweise, dass eine erhöhte Konzentration von Ang II im Gewebe zu oxidativen Stress führt. welcher über eine Erhöhung der glomerulären Permeabilität für Makromoleküle eine Albuminurie hervorruft. Oxidativer Stress und endotheliale Dysfunktion sind interagierende Faktoren für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen und Nierenschäden, die durch das RAAS vermittelt werden (Whaley-Connell et al., 2006). Durch oxidativen Stress kann die Bioverfügbarkeit von NO vermindert sein. Als oxidativer Stress wird ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion von Sauerstoffradikalen und der Fähigkeit des biologischen Systems diese zu verstoffwechseln bezeichnet. Das körpereigene NO verfügt aufgrund seiner hohen Reaktionsfähigkeit nur über eine geringe Halbwertszeit. NO ist ein Gas, das in vivo eine entscheidende Rolle in der Regulation des basalen Gefäßtonus spielt. Es entsteht bei der Umwandlung der Aminosäure L-Arginin in L-Citrullin mit Hilfe des Enzyms NO-Synthase (NOS) und gelangt im Gefäßsystem über das Endothel ins Zytoplasma, wo es an glatten Gefäßmuskelzellen die Guanylatzyklase aktiviert. Nach deren Aktivierung wird aus GTP cGMP gebildet, welches wiederum die cGMP abhängige Proteinkinase G phosphoryliert. Diese sorgt für ein Absenken der Calciumkonzentration in der Zelle, es folgt die Dilatation der glatten Gefäßmuskelzelle.

Es existieren verschiedene Isoformen der NOS: die (endotheliale) eNOS, die (induzierbare) iNOS und die (neuronale) nNOS. In allen Isoformen, ist die NO-Produktion durch Proteinexpression und eine Reihe von post-translationellen Mechanismen gesteuert, jedoch sind viele Regulationsmechanismen Isoform-spezifisch. In Bezug auf die koronar-vaskuläre Kontrolle der Hypertonie und Herzinsuffizienz, ist die Isoform eNOS vom größtem Interesse. Sie wird im koronaren Endothel exprimiert, dem Endokard, und in Kardiomyozyten; allerdings können nNOS und iNOS in der vaskulären Kontrolle unter bestimmten Bedingungen ebenfalls eine Rolle spielen (Levy et al; 2009).

Die endotheliale Dysfunktion, d. h. die verminderte endotheliale Freisetzung von NO, ist ein früher und wesentlicher Schritt in der Entstehung der Arteriosklerose. Eine endotheliale Dysfunktion wird durch die arterielle Hypertonie infolge der Erhöhung des "shear stress" und

endokriner Faktoren (z.B. Ang II) ausgelöst und führt letztlich zu frühen Veränderungen der Gefäßfunktion und -struktur (Schmidt et al., 2006). Das Endothel wurde jahrelang nur als selektive permeable Barriere zwischen Blut und Gefäßsystem betrachtet. Seit kurzem wird es aber als grundlegendes homöostatisches Organ, das für die Regulation des Gefäßtonus und der Gefäßstruktur verantwortlich ist, anerkannt. Unter physiologischen Bedingungen sind Endothelzellen in der Lage, ein breites Spektrum von antiatheriosklerotischen Substanzen zu synthetisieren und zu sezernieren. Eine der wichtigsten Substanzen ist NO. Unter normalen Bedingungen induziert eine endotheliale Stimulation die Produktion und Freisetzung von NO. In Krankheitszuständen, einschließlich des Auftretens kardiovaskulärer Erkrankungen, erfährt das Endothel eine strukturelle und funktionelle Veränderung und verliert seine schützende Rolle. Ob die endotheliale Dysfunktion durch Risikofaktoren wie Hypertonie, Menopause, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie häufiger auftritt oder ob umgekehrt eine progressive Verschlechterung selbiger als Pathomechanismus für Hypertonie und Diabetes angesehen werden kann, wird gegenwärtig diskutiert (Versari et al., 2009).

1.3 Albuminurie und Nierenfunktion

Weltweit entwickeln schätzungsweise mehr als 60 Millionen Menschen eine chronische Nierenerkrankung, diese Zahl wird in den nächsten 10 Jahren zunehmen. Die meisten dieser Patienten mit Nierenfehlfunktion entwickeln eine Herz-Kreislauf-Erkrankung, während andere ein chronisches Nierenversagen erleiden. Die Früherkennung von Nierenfunktionsstörungen, gefolgt von einer präventiven Behandlung, muss eine globale gesundheitliche Priorität haben, umso mehr seit bekannt ist, dass Nierenfunktionsstörungen ein Risikofaktor für allgemeine Herz-Kreislauferkrankungen und Schlaganfall sein können (Abb. 2.). Das Krankheitsbild der Albuminurie ist seit langem bekannt. Es wird mit spezifischen renalen glomerulärer Schädigung, Glomerulonephritis, Anomalien wie z. B. chronischer Glomerulosklerose, oder Amyloideinlagerungen in Verbindung gebracht und reflektiert zum anderen eine generalisierte vaskuläre endotheliale Schädigung (Remuzzi et al., 2005). Die Prävalenz der Mikroalbuminurie (MA) steigt mit Alter und Dauer von Bluthochdruck und variiert von 20% bis 30% bei unbehandelten Patienten und bis zu 25% bei behandelten Patienten. MA ist als Prädiktor von arteriosklerotischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen in nichtdiabetischen Individuen bekannt. Die HOPE Studie ergab, dass jeder Grad der Albuminurie sich als ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt (Tsioufis et al., 2006). Es konnte eine Beziehung zwischen der Mikroalbuminurie und kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet werden, selbst bei einer Mikroalbuminurie unterhalb des traditionellen Schwellenwertes. Die Mortalitätsrate bei Patienten, die an einer Mikroalbuminurie leiden, erhöht sich besonders bei gleichzeitiger Hypertonie. Die Albuminurie, die sich beim Menschen durch eine Albuminausscheidung über 30 mg / Tag im Urin definiert, scheint ebenfalls in der Allgemeinbevölkerung eine nicht unerhebliche Ursache für eine erhöhte Sterblichkeitsrate zu sein. Dies wurde in der PREVEND Studie gezeigt (Diercks et al., 2000). Es ergab sich eine deutliche Korrelation zwischen der Albuminmenge, gemessen im Urin (U_{Alb}) und jedweder Ursache für Tod durch kardiovaskuläre Erkrankungen. Selbst bei U_{Alb} die gemäß der Definition als normal gelten (Weir; 2007). Niedrigere Werte als 30 mg / Tag werden als Mikroalbuminurie bezeichnet. Trotz dieser klaren Schwellen-Werte ist Albuminurie eine kontinuierliche Variable, da selbst innerhalb der Normalwerte eine erhöhte Albuminexkretion ein erhöhtes Risiko sein kann. Bei 10 bis 40 % der Diabetes- und Bluthochdruck-Patienten ist die Mikroalbuminurie verbreitet. Bei 5 bis 7 % der scheinbar gesunden Personen wird eine Mikroalbuminurie diagnostiziert. Die pathophysiologischen Mechanismen der Albuminurie und ihre Beziehung zu kardiovaskulären Erkrankungen sind nicht eindeutig geklärt. Drei mögliche Hauptursachen werden hierfür diskutiert. Als erste Ursache könnte ein Albuminverlust die Folge einer Nierenschädigung sein. Die zweite Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die Albuminurie weit verbreitete Gefäßschäden wiederspiegelt. Eine dritte Ursache könnte darin bestehen, dass Individuen mit einem variablen Grad der endothelialen Funktion geboren werden, wodurch es zu erhöhter Albuminsekretion kommen kann. Dies kann darauf hindeuten, dass genetische oder in-utero Faktoren die Albuminurie bzw. die endotheliale Funktion und damit die individuelle Empfindlichkeit gegenüber Herz-Kreislauf-Erkrankungen im späteren Leben bestimmen können (Dobre et al., 2009).



Abb. 2. Schematische Darstellung der wechselseitigen Entstehungsmechanismen von Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen.

1.4 Tiermodelle für kardiovaskuläre Erkrankungen

Viele Erkrankungen unterliegen multifaktoriellen Einflüssen mit komplexen Interaktionen zwischen genetischen und exogenen Faktoren. Die Entwicklung und genetische Charakterisierung experimenteller Modelle erlaubt die Separierung und Isolierung von verschiedenen Faktoren, die mit der Regulierung der Vererbung und der zellulären Schädigung in Verbindung gebracht werden. Die selektive Inzucht von Tieren mit phänotypischer Korrelation zum Genom erhöht die klinische Relevanz, da eine genetische Homogenität vorliegt, die in jeder Generation vererbt wird und unabhängig der Umweltfaktoren zur Entwicklung des Phänotyps führt. Der experimentelle Ansatz des Phänotyps-assoziierten Tiermodells nutzt die natürlichen Varianzen unter Inzuchtstämmen und deren Kreuzungen, um ein quantitatives Merkmal und Gene, die möglicherweise einen Beitrag zur Entwicklung des Phänotyps leisten, zu bestimmen. Im Allgemeinen wird die Entwicklung von homozygoten Ratten-Stämmen, die sich für kardiovaskuläre Fragestellungen besonders eignen, durch selektive Zucht der Tiere mit dem gewünschten Phänotyp über mehrere Generationen erreicht. Ist der gewünschte Phänotyp vorhanden, werden über 20 Generationen Bruder-Schwester-Verpaarungen durchgeführt, um eine genetische Homogenität zu erreichen (Lerman et al., 2005). Studien in Tiermodellen können nützliche Informationen über Gene und Signalwege geben, da sie den gleichen komplexen pathophysiologischen Eigenschaften zugrunde liegen (Pravenec et al., 2010).

1.4.1 Der SHR-Rattenstamm – Ein Hypertonie-Modell

Die häufigste Form des Bluthochdrucks beim Menschen ist die essentielle Hypertonie, in der zahlreiche Gene zur Entwicklung dieses Phänotyps beitragen. Daraus ergib sich, dass kein einzelner Gendefekt isoliert betrachtet die Entwicklung dieser Krankheit in ihrer Gesamtheit erklären kann. In der Hypertonieforschung liegt in Tiermodellen das größte Potential, die polygenetischen Interaktionen und Ursachen der Hypertonie zu erforschen.

Die spontan hypertensive Ratte (SHR) ist das verbreiteteste Tiermodell der essentiellen Hypertonie. Wie beim Menschen, ist bei SHR die Entwicklung einer spontanen Hypertonie und die damit verbundenen metabolischen Störungen mit komplexen, polygenen Merkmalen verbunden (Pravenec et al., 2010). 1963 etablierten Okamoto und Aoki in Kyoto vom Wistar-Stamm ausgehend den Inzuchtrattenstamm SHR. Tiere mit den höchsten Blutdrücken wurden gezielt verpaart um einem Stamm mit spontan auftretender Hypertonie zu generieren. Der Blutdruckanstieg beginnt im Alter von ca. 6 Wochen und zeigt einen kontinuierlich progressiven Anstieg im Zeitgang (Kurtz et al., 1987). Der SHR Stamm weist trotz eines stark erhöhten Blutdrucks von 180 mmHg in der 24. Woche keine pathologische, sondern eine rein physiologische Albuminurieentwicklung auf (Gschwend et al; 2002).

1.4.2 Der MWF-Rattenstamm – Ein Albuminurie-Modell

Eine erhöhte Albumin-Ausscheidung ist ein Anzeichen für die Entstehung einer Nephropathie. Ein moderater Anstieg der U_{Alb} in den Bereich der Mikroalbuminurie stellt einen unabhängigen Risikofaktor für Patienten mit Bluthochdruck, Diabetes oder bereits vorhandene kardiovaskuläre Erkrankungen dar. Die Mikroalbuminurie stellt, ähnlich dem Bluthochdruck, einen quantitativen Phänotyp dar, bei denen klinische Schwellenwerte festgelegt sind. Tierstämme, die eine erhöhte U_{Alb} vererben, geben eine gute Möglichkeit für die Erforschung der polygenetischen Ursachen der U_{Alb} . Die Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte stellt ein solches genetisches Inzuchtmodell dar, das spontan eine Albuminurie entwickelt. Dieses Tiermodell wurde ursprünglich aufgrund seiner subkapsulären Glomeruli gezüchtet, die Mikropunktionsstudien in vivo ermöglichte. Wie sich in späteren Studien herausstellte, wurde dieser Effekt von einem angeborenen Nephrondefizit von 30 – 50% und der Entwicklung einer Albuminurie begleitet (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003; Schulz et al., 2008; Fassi et al., 1998). Die U_{Alb} erreicht beim MWF-Stamm bereits in der 8. Woche Werte von mehr als 5 mg/24h, der Normalwert der Ratte liegt bei unter 1 mg/24h. Im Altersverlauf erfährt die U_{Alb} einen progressiven kontinuierlichen Anstieg bis auf 350 mg/24h,

und erreicht damit den nephrotischen Bereich. Die MWF-Tiere weisen, neben einem Nephrondefizit und der U_{Alb}, ausgeprägte strukturelle Nierenschäden auf, wie zum Beispiel eine signifikant erhöhte Glomerulosklerose (GSI), tubulointerstitielle Schädigungen (TSI), renale interstitielle Fibrose (RIF) und einen Verlust der Podozyten, im Vergleich zum Lewis oder SHR-Kontrollstamm (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003; Schulz et al., 2008; Ijpelaar et al., 2008). Des Weiteren kann die Entstehung einer spontanen moderaten Hypertonie bis mindestens 160 mmHg beobachtet werden. Beide Geschlechter der MWF-Tiere demonstrieren eine ähnliche Reduktion in der Nephronanzahl im Vergleich zu SHR-Ratten, die Albuminurie-Entwicklung und die funktionellen Nierenschädigungen sind aber beim Männchen deutlich höher (Kreutz et al., 2000; Schulz et al., 2008).

1.4.3 QTL-Analysen und konsome Stämme

Ausgehend von den beiden oben beschriebenen Inzuchtstämmen, wurden in der Arbeitsgruppe erstmals Untersuchungen zur Identifizierung von QTL (Quantitative Trait Loci) bei der MWF-Ratte unternommen (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Bei einem QTL handelt es sich um einen Genort oder ein Allel im Genom der zu untersuchenden Tiere, das statistisch betrachtet eine hohe Wahrscheinlichkeit hat, für den gesuchten Phänotyp zu kodieren. Eine erfolgreiche Methode zur Identifizierung von Genloci, die zu einer komplex regulierten Krankheit führen, ist das Prinzip der Kosegregations- und Kopplungsanalysen. In unterschiedlichen Ratten-Inzuchtstämmen werden hoch polymorphe DNA-Repeats, die mit gekoppelt bestimmten Krankheitsgenen sind, vererbt. Diese sind sogenannte Mikrosatellitenmarker, die aus sich wiederholenden Di-, Tri- oder Tetranukleotiden bestehen. Mikrosatellitenmarker, die sehr dicht an dem krankmachenden Genlocus liegen, werden kombiniert mit dem Phänotyp vererbt, während weiter entfernt liegende Marker unabhängig vom Phänotyp vererbt werden (Rapp 2000). In vorangehenden Studien konnten über diese Methode der Kosegregations- und Kopplungsanalyse zwischen MWF- und Lewis-Ratten auf 4 Chromosomen 4 QTL und zwischen MWF- und SHR-Ratten 7 QTL auf 7 Chromosomen im Zusammenhang mit Albuminurie identifiziert werden. Besonders eindeutig waren die Ergebnisse für Rattenchromosom (RNO)6 und RNO8. Beide QTL sind zusammen für 33,5% der Varianz der Albuminausscheidung verantwortlich (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Das QTL auf RNO6 wird mit einer frühzeitig entstehenden Albuminurie in Verbindung gebracht, während das QTL auf RNO8 mit einer Albuminurie ab der 14. Woche assoziiert wird. Um die Aussage der statistischen Analysen zu verifizieren, wurden in der Arbeitsgruppe in Folge die konsomen Rattenstämme MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} durch selektive Züchtung etabliert. Bei diesen Tieren wurde das gesamte RNO6 bzw. RNO8 der SHR-Ratte in den isogenetischen Hintergrund der MWF-Ratte überführt. Es wurde gezeigt, dass die frühe Entwicklung der U_{Alb} im konsomen MWF-6^{SHR}-Stamm in der 8. Woche vollständig unterdrückt werden konnte, außerdem konnte kein Glomerulidefizit in Bezug auf den SHR-Kontrollstamm bestimmt werden. Allerdings entwickelten die Tiere signifikant erhöhte Blutdrücke gegenüber MWF (Schulz et al., 2007). Bei der Bestimmung der U_{Alb} im Altersverlauf konnten für den konsomen MWF-8^{SHR}-Stamm, bei dem RNO8 von SHR in MWF transferiert wurde, verglichen mit MWF signifikant niedrigere Albuminuriewerte detektiert werden. Diese Werte erreichten in der 18. Woche ein Plateau, das im weiteren Altersverlauf bis zur 32. Woche stagnierte. Während eine signifikante Blutdruckerhöhung detektiert werden konnte, zeigte die strukturelle Nierenschädigung, gemessen an der TSI, der konsomen MWF-8^{SHR}-Tiere keinen Unterschied zu MWF (Schulz et al. 2008).

1.5 Ziel der Arbeit

Durch den Transfer von RNO6 und RNO8 aus dem nierengesunden SHR-Stamm in den isogenetischen MWF-Hintergrund, konnte die Albuminurie jeweils drastisch gesenkt und die strukturellen Nierenschäden deutlich reduziert werden. Mit Austausch des RNO6 konnte bei MWF-Tieren kein Nephrondefizit mehr festgestellt werden. Ziel dieser Arbeit ist zu ermitteln, ob der reziproke Transfer von RNO6 bzw. RNO8 in der Lage ist, eine Albuminurie im isolierten Albuminurie-resistenten SHR-Stamm zu induzieren. Die übrigen 10 Albuminurie-QTL werden auf diese Weise nicht mehr mit berücksichtigt. Die QTL auf RNO6 und RNO8 sind die bedeutendsten, sowohl bei der Entstehung der Albuminurie, als auch in Bezug auf die Entwicklung struktureller und funktioneller Nierenschädigungen. Daher wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe die wichtigen krankmachenden RNO6 und RNO8 aus MWF isoliert und in den isogentischen SHR-Hintergrund überführt. Der Zweck des reziproken Transfers der einzelnen RNO6 und RNO8 war herauszufinden, welchen Stellenwert die Gene in den jeweiligen QTL auf die Induktion der Albuminurie spielen. Da es sich bei der Albuminurie um ein quantitatives Merkmal handelt, welches in verschiedenen Pathways und Interaktionen über andere genetische Faktoren reguliert und induziert wird, die durch den isolierten Transfer eines einzigen Chromosom eventuell nicht mehr zur Verfügung stehen, wurde ein Versuchsaufbau gewählt, der die Albuminurie durch verschiedene Stressoren zu induzieren helfen sollte. Ein anerkanntes Versuchsprotokoll zur Induktion der Albuminurie ist die chronische Gabe eines NO-Inhibitors und die unilaterale Nephrektomie (Van Dokkum et al., 1998; Van Dokkum et al., 2000), das für die vorliegende Arbeit verwendet wurde. Vor diesem Hintergrund wurde eine NO-Inhibition mittels einer L-NAME-Gabe über das Trinkwasser vorgenommen, um den Blutdruck exogen zu erhöhen. Wird der NO-Synthase (NOS) ein L-Arginin-Analogon wie L-NAME als falsches Substrat geliefert, kommt es zur kompetitiven Hemmung der NO-Synthese (Abb. 3.). Eine Gefäßdilatation ist über diesen Weg nicht mehr möglich.



Abb. 3. Strukturformeln von L-Arginin und L-NAME und schematische Darstellung der NO-Synthese und NO-Synthese-Hemmung über L-NAME.

Um den Phänotyp der Albuminurie zu induzieren soll einer Gruppe von Versuchstieren über einen Zeitraum von 6 bzw. 18 Wochen über das Trinkwasser L-NAME verabreicht werden. Um eine höhere hämodynamische Belastung auf die Glomeruli auszuüben und somit eine Nierenschädigung zu provozieren, soll eine zweite Gruppe im Alter von 6 Wochen einer unilateralen Nephrektomie unterzogen werden (Van Dokkum et al., 1998; Van Dokkum et al., 2000). Die beiden Behandlungsgruppen und eine Kontrollgruppe werden über den oben genannten Zeitraum phänotypisch auf Albuminurie und Bluthochdruck untersucht und charakterisiert. Im Altersverlauf werden alle Tiere zu festgelegten Zeitpunkten mittels Tail-Cuff indirekt Blutdruck gemessen, Albumin über einen rattenspezifischen ELISA aus dem 24h Urin eruiert und final der systolische Blutdruck direkt über einen Femoralisverweilkatheter bestimmt. Um weitere Untersuchungen anschließen zu können, werden die Tiere am Ende der vorgesehen Zeit präpariert. Es werden Organe zu histologischen und molekulargenetischen Expressionsuntersuchungen, sowie Plasma zu klinisch-chemischen Untersuchungen entnommen und asserviert. Mit Hilfe der Ergebnisse dieses Versuchsprotokolls soll geklärt werden, welche Mechanismen der Albuminurie bei der Ratte und nachfolgend dem Menschen zugrunde liegen, um so bessere Ausgangskriterien für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten zu schaffen, die gezielt in ursächliche Regulationsmechanismen eingreifen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Substanz	Firma
Agarose	Roth
Albumin, Rat; Polyklonaler Antikörper, Anti-Rat	ICN
Bromphenolblau	Merck
Chloroform	Sigma - Aldrich
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma - Aldrich
Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
dNTPs (2,5 mM)	Rapidozym
Essigsäure (100%)	Merck
Ethanol (100%)	J.T. Baker
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Merck
Formaldehyd (37%)	J.T. Backer
Glycerin	Roth
Isopropanol	Sigma - Aldrich
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Methanol	J.T. Baker
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogenphosphat-1-hydrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Perjodsäure	Merck
Ratten-Serum-Albumin (RSA)	Sigma – Aldrich
5x Reaction buffer	Fermentas
Schiffsreagenz	Merck
Sirius Rot	Chroma
Taqman 2x Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems
Trizma Base	Sigma – Aldrich
Trizol	Invitrogen
Xylen Cyanol FF	Sigma – Aldrich

2.1.2	Puffer	und	Lösungen
-------	--------	-----	----------

Puffer/Lösung	Bestandteil	Konzentration
5x PBS-Puffer	Natriumchlorid Kaliumhydrogenphosphat Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat Aqua bidest.	218,8 g 5,4 g 35,0 g Ad 5 I, pH 7,4

10x Laufpuffer	Glycerin	50%
	Natriumhydrogenphosphat-1-hydrat	10,0 mM, pH 7,0
	Bromphenolblau	0,25 %
	Xylen Cyanol FF	0,25 %
50x TAE	Trizma Base	2,0 M
	Essigsäure (100%)	5,71 %
	Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	50,0 mM
Formaldehydphosphat-	Formaldehyd (37%)	10,8 %
Puffer	Dinatriumhydrogenphosphat	5,8 %
	Natriumdihydrogenphosphat	4,2 %
	Aqua bidest.	79,2 %
Heparinlösung (50 U/ml)	Heparin (25000 I.E.)	0,5 ml
	Natriumchlorid-Lösung	49,5 ml
Kalioplegelösung (1 M)	Kaliumchlorid	74,6 g
	Aqua bidest.	ad 1 I, pH 7,4
Methacarn	Methanol	60 %
	Chloroform	30 %
	Essigsäure	10 %
Phosphat Puffer	Dinatriumhydrogenphosphat	5,8 %
	Natriumdihydrogenphosphat	4,2 %
	Aqua bidest	90 %
Rattenserum-Albumin-	Rattenserum-Albumin	1,0 mg/ml
Stock-Lösung	Natriumhydrogencarbonat	0,1 M
Substrat	3,3´,5,5´TMB-Dihydrochlorid	2 Tabletten
	Aqua bidest.	10 ml
	Puffer A	10 ml
	Wasserstoffperoxid	4 µl

2.1.3 Primer und Sonden für die TaqMan – PCR

Genkürzel	Sequenz	Firma
Col3	F-TGTTAACGGACAAATAGAGAGTCTTATCAG R-CATCTTGCAGCCTTGGTTAGG S' FAM-TTCTGCCACCCTGAACTCAAGAGCG-TAMBA	TIB ® Molbiol
NGAL	F-GCCCCTTGGTTCTTCCGTAC R-GGCCGACACTGACTACGACC	TIB ® Molbiol
PBGD	F-TGAAAACCTTGTACCCTGGCATA R-TCCAATCTTAGAGAGTGCAGTATCAAGA S: FAM-TTGAAATCATTGCTATGTCCACCACAGG-TAMRA	TIB ® Molbiol

Col3, Kollagen 3; NGAL, Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin; PBGD, Porphobilinogen Deaminase; F, Forward; R, Reverse; S, Sonde.

2.1.4 Enzyme

Enzym	Aktivität Firma	
Taq-Polymerase	5 U/µl	Promega
Random Hexamer Primer	6 A ₂₆₀ U/ml	Fermentas Life Sciences
Reverse Transcriptase	20 U/µI	Fermentas Life Sciences
RNAse Inhibitor	20 U/µI	Fermentas Life Sciences

2.1.5 Medikamente und Arzneimittel

Wirkstoff/Produkt	Firma
Atipamezol	Pfizer
Carprofen	Pfizer
Flumazenil – hameln	Inresa
Fentanyl	Janssen - Cilag
Medetomidin	Pfizer
Midazolam	Ratiopharm
Naloxon	Delta Select
S – Ketamin (KetanestS®)	Pfizer
Xylazin (Rompun®) 2%	Bayer
Bepanthen Augensalbe	Bayer
Jellin Salbe	Grünenthal

2.1.6 Material und Futtermittel

Artikel	Firma
Alleinfuttermittel für Ratten	Ssniff
Einwegspritzen aus Kunststoff (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Braun
Kanülen	Braun
Lochzange für Labortiere	Esculap
Makrolonkäfig Typ III und Typ IV	Ebeco
Mikrohämatokritröhrchen	Brand
Monovetten (Lithium-Heparin)	Sarstedt
Monovettenkanüle	Sarstedt
Nahtmaterial	Ethicon
Objektträger	Menzel-Gläser
PCR-Tubes 0,2 ml	Biozym
Plasmaröhrchen (Lithium-Heparin)	Kabe
Polyethylenschlauch	RCT
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
Restrainer	Ebeco
Schrumpfschlauch	Conrad
Skalpelle Gr. 20	Feather
Standardpipetten	Eppendorf

Standardting 20 ul 100 ul 1000 ul	Eppendorf
Standardtips 20μ , 100μ , 1000μ	срренцон
Stoffwechselkäfige für Ratten bis 300 g	Tecniplast
Szintillationsgefäße aus Glas (Histologie)	Packard
Szintillationsgefäße aus Kunststoff	Packard
Thermo-Fast 96-Mikrotiterplatten	ABgene
Verpackungsfolie	Saran
Wattestäbe	Heinz Herenz

2.1.7 Geräte und Software

Artikel	Firma
ABI prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystem
Agarose - Gelkammer	Bio-Rad
Analyticsoftware	SPSS, PASW
Bioanalyseprogramm Scion Image 1.62a	Scion Co.
Bioimagingsystem	Chemie Genius
Blutdrucktransducer direkt	ADInstruments
Blutdrucktransducer Tail-Cuff	TSE
Brigde Amplifier	ADInstruments
ELISA-MEX-Plate-Reader	Dynex
Färbeautomat Robet-Stainer HM 760	Microm
Feinwaage	Sartorius
Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatch
Lab-Chart 7	ADInstruments
Magnetrührer mit Heizfunktion MR 2002	Heidolph
Mikrotiterplattenschüttler	Roth
PCR-Cycler	MJ Research
pH-Meter	Knick
Photometer UV-1202	Shimadzu
Photomikroskop Axiophot	Carl Zeiss, Oberkochen
Powerlab	ADInstruments
Präparationsbesteck	Aesculap
Rotationsmikrotom HM 355	Microm
Rotlichtlampe	MLW
Tail-Cuff-Blutdruckmeßgerät	TSE
Tierwaage	Sauter
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Trockenschrank	Heraeus Instruments
Ultra Turrax T25	Janke & Kunkell
Wärmebox	Werkstadt CBF
Zentrifuge	Heraeus

2.2 Methoden

2.2.1 Parentaltiere

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhold Kreutz, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie CCM, Charité - Universitätsmedizin Berlin, führt seit 1996 eine Kolonie des MWF/Ztm Stammes des Zentralen Tierlaboratoriums der Medizinischen Hochschule Hannover, unter der Stammbezeichnung MWF/_{Rkb}. Im Jahr 1997 wurde von Prof. Dr. Kreutz der SHR/_{Rkb}-Rattenstamm als eigene Kolonie eingeführt, welche aus der SHR/Mol Kolonie der Firma M&B, Bomholtvej Dänemark entstammt. Es handelt sich bei diesen beiden Stämmen um Inzuchtrattenstämme, die über mehr als 20 Generationen über konsequente Bruder-Schwester-Verpaarungen ingezüchtet wurden. In der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin, erfolgt die Erhaltungszucht der beiden Inzuchtrattenstämme MWF/_{Rkb} und SHR/_{Rkb}.

2.2.2 Haltung

In der FEM wurden die Versuchstiere unter standardisierten Haltungsbedingungen untergebracht. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen Typ IV (40 x 60 x 25 cm) mit Weichholzgranulat gehalten, mit ad libitum Zugang zu Futter und Wasser. In den klimatisierten Tierställen herrschten konstante Umweltbedingungen, mit einer Lufttemperatur von 22℃ und einer Luftfeuchtigkeit von 60%. Eine automatische Beleuchtungsanlage gewährleistete einen 12 stündigen Tag/Nacht Rhythmus. Die Ratten wurden geschlechterspezifisch zu viert getrennt gehalten; die Bruder-Schwester-Verpaarung gestaltete sich durch das Zusammensetzen eines Männchens zu einer Gruppe von mehreren Weibchen. Das Absetzen vom Muttertier erfolgte im Alter von 4 Wochen. Mittels einer Lochzange wurde eine fortlaufende Nummer in die Ohren gestanzt, um Tiere eindeutig zu markieren.

2.2.3 Zuchten

2.2.3.1 Konsome Stämme

In früheren Studien gelang es der Arbeitsgruppe, über Kosegregations- und Kopplungsanalysen auf 10 Chromosomen 11 QTL für den Phänotyp der Albuminurie zu identifizieren (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Um diese, über die statistischen Analysen identifizierten QTL zu verifizieren, wurden konsome Stämme gezüchtet (Schulz et al., 2007; Schulz et al., 2008). Das Prinzip dieses Züchtungsschemas besteht aus dem Transfer eines QTL-tragenden Chromosoms in den isogenetischen Hintergrund eines

Referenzstammes. Dazu werden die kontrastierenden Parentaltiere zu einer F1-Generation verpaart, aus dieser ersten Filialgeneration werden die Tiere mit dem Empfängerstamm zurückgekreuzt, die das Zielchromosom heterozygot und die meisten homozygoten Anteile auf den Empfängerchromosomen tragen. Die genetische Varianz dieser Tiere wird durch markergestützte Genanalysen überprüft. Nach ca. 4 bis 8 Backcross-Generationen liegt das Spenderchromosom heterozygot und alle übrigen Chromosomen des Empfängers homozygot vor. Mit dieser Generation werden Bruder-Schwester-Verpaarungen angesetzt, deren Nachkommen als konsome Linien bezeichnet werden.

2.2.3.2 Zucht der Konsomen-Stämme SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF}

In der Arbeitsgruppe wurden in Vorarbeiten über serielle Rückkreuzung und markergestützte Selektion die konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} etabliert (Schulz et al., 2010). Initial wurde ein MWF-Männchen mit SHR-Weibchen verpaart. Die Männchen aus der F1-Generation mit dem höchsten Anteil des SHR-Genoms wurden mit vier SHR-Weibchen zur ersten Backcross-Generation verpaart. Nachfolgend wurden über weitere Backcrosse die Tiere des Empfängerstamms, die die gewünschten Chromosomen RNO6 oder RNO8 des Spenderstammes heterozygot vererbten, weiterverpaart. Am Ende der Backcross-Kaskade betrug der Genomanteil der Tiere mehr als 99 % vom Empfängerstamm SHR, mit Ausnahme des transferierten Chromosoms RNO6 oder RNO8 vom Spenderstamm MWF. Mit diesen Tieren wurden mehrere Bruder-Schwester-Intercrosse durchgeführt. Dies verfolgte den Zweck, RNO6 bzw. RNO8 von MWF in SHR zu fixieren und die konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} zu etablieren (Abb. 4.).



Abb. 4. Schematische Darstellung des Backcross-Züchtungsschemas. BC, Backcross; F1, Filialgeneration 1; F2, Filialgeneration 2; M, SHR-Allel; R, MWF-Allel

2.2.4 Studiendesign

2.2.4.1 Studie A von der 6. bis zur 24. Woche

Die Parentaltiere MWF und SHR, sowie die konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} wurden zur phänotypischen Charakterisierung in drei Gruppen mit ausschließlich männlichen Tieren eingeteilt: Die erste war eine Kontroll-Gruppe mit 10-15 Tieren pro Stamm, die in der 6. Woche scheinoperiert und bis zur 24. Woche unter Normalbedingungen gehalten wurde. Bei der zweiten handelte es sich um eine L-NAME (N_{ω} -Nitro-L-arginine-methyl-ester-hydrochlorid) -Gruppe mit 10-21 Tieren, die nach Schein-OP von der 6. Woche bis zur 24. Woche täglich 20 mg/ml L-NAME durch das Trinkwasser erhielt. Die dritte war die Nx-Gruppe mit 19-22 Tieren, die in der 6. Woche einer unilateralen Nephrektomie unterzogen wurde. Dem Versuchsprotokoll folgend, wurden bei allen Tieren in der 12., 18. und 24. Woche der Blutdruck mittels Tail-Cuff Methode ermittelt, sowie 24 h Sammelurin für die Bestimmung der zeitverlaufsabhängigen Albuminausscheidung und biochemische Analysen gewonnen. Am Ende der 24. Woche wurde ein Verweilkatheter in die A. femoralis zur Bestimmung des direkten Blutdrucks implantiert. Anschließend erfolgte die Tötung der Tiere

in tiefer Narkose durch Herzexzision. Blut und Organe wurden entnommen und bei -80°C asserviert (Abb. 5.).



Abb. 5. Phänotypisierungsprotokoll der Studie A von der 6. bis zur 24. Woche. Dargestellt sind die drei Versuchsgruppen Sham, L-NAME und Nx, in die die Parentalstämme MWF und SHR sowie die beiden konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR8^{MWF} eingegangen sind; Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

2.2.4.2 Studie B von der 6. bis zur 12. Woche

Aufgrund hoher Mortalitätsraten der SHR und SHR-6^{MWF} Tiere unter L-NAME Behandlung vor dem geplanten Studienende, waren die Anpassung des Versuchsprotokolls und die Durchführung eines zweiten Durchgangs notwendig. Anders als in Studie A wurden die Tiere nur bis zur 12. Woche durch den Versuch geführt (Abb. 6.). Der Verweilkatheter zur direkten Blutdruckmessung wurde final in der 12. Woche implantiert und nachfolgend erfolgte die Präparation und Organasservierung.



Abb. 6. Phänotypisierungsprotokoll der Studie B von der 6. bis zur 12. Woche. Dargestellt sind die drei Versuchsgruppen Sham, L-NAME und Nx, in die die Parentalstämme MWF und SHR sowie die beiden konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR8^{MWF} eingegangen sind; Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

2.2.5 L-NAME-Applikation

Auf Grund der kurzen Halbwertszeit von gelöstem L-NAME bei Raumtemperatur wurde eine Stammlösung hergestellt. 4 ml Stammlösung, bestehend aus 1 mg L-NAME pro ml Wasser, wurden pro Flasche abgefüllt und eingefroren. Im ersten Durchgang wurden über einen Zeitraum von 18 Wochen bzw. im zweiten Durchgang über einen Zeitraum von 6 Wochen zu Tagesbeginn frische Flaschen mit oben beschriebener Stammlösung auf 200 ml mit Trinkwasser aufgefüllt. Demnach enthielt jede Flasche eine Konzentration von 20 mg/l L-Name. Pro Tier und Tag wurden somit ~4,8 mg L-NAME über das Trinkwasser aufgenommen (Böger et al., 1994).

2.2.6 Unilaterale Nephrektomie

30 Minuten vor Beginn der OP wurden 5 mg/kg Carprofen zur Schmerzbehandlung s.c. in den Nacken der jeweiligen Ratte injiziert. Die Narkotisierung bestand in einer s.c. in den Nacken verabreichten Injektionsnarkose, die sich aus 0,005 mg/kg Fentanyl, 2 mg/kg Midazolam und 0,15 mg/kg Medetomidin zusammensetzte.

Die Ratte wurde auf dem Rücken liegend fixiert und die Zunge dabei mit einer Pinzette in den linken Mundwinkel gezogen, damit nicht die Gefahr des Erstickens bestand. Um zu verhindern, dass der Bulbus während der OP austrocknete, erhielt jedes Auge einen Tropfen Augensalbe. Der Bauch wurde mit 70% Alkohol befeuchtet und das Fell in einer quadratischen Fläche von 3 x 5 cm rasiert. Nach Überprüfung des Zwischenzehenreflexes, der negativ ausfallen musste, konnte die Eröffnung der äußeren Haut entlang der Linea alba

mittels eines 4 cm langen Skalpellschnitts erfolgen. Die Linea alba wurde in gleicher Weise eröffnet. Mit Blick von oben wurde mit drei stumpfen Wundhaken das Darmkonvolut nach links, die Leber nach kranial verlagert und die Wundöffnung nach rechts kaudal fixiert, so dass die linke Niere unter der Faszie sichtbar wurde. Mit Wattestäben wurden anschließend die A. und V. renalis sowie der Ureter stumpf frei präpariert, um die Niere aus der Faszie zu lösen, so dass sie frei beweglich war. A. und V. renalis sowie Ureter wurden proximal vom und parietal zum Nierenhilus mit einem resorbierbaren Faden abgebunden. Der nächste Schritt bestand in der Durchtrennung der Strukturen zwischen den Ligaturen und die Entfernung der linken Niere mit einer anatomischen Pinzette.

Zur Vermeidung von Entzündungen erfolgte eine Spülung des Bauchraums mit auf Körpertemperatur gewärmter NaCI-Lösung, um potentielle Blutkoagel zu entfernen. Anschließend wurde der Darm zurückverlagert und seine Eigenrepositionierung durch 2 ml körperwarmer NaCI-Lösung im Bauchraum unterstützt. Die Linea alba wurde anschließend mit einem resorbierbaren Faden in vorlaufender, sich selbsthaltender Naht nach REVERDIN genäht und die Haut in fortlaufender intrakutaner Naht. Auf die Wundnaht wurde eine antiseptische und kortisonhaltige Wundsalbe gestrichen. Die Antagonisierung der Narkose bestand in einer Kombination aus 0,12 mg/kg Naloxon, 0,2 mg/kg Flumazenil und 0,75 mg/kg Atipamezol, die in den Nacken injiziert wurde. Anschließend wurde das Tier unter eine Rotlichtlampe gelegt, um ein Auskühlen zu verhindern. In den folgenden drei Tagen wurde das Tier täglich gewogen und mit Carprofen entsprechend schmerzbehandelt. Wurde in diesem Zeitraum ein Gewichtsverlust von mehr als 20% festgestellt, wurde das Tier sicherheitshalber euthanasiert, da dies ein eindeutiger Hinweis auf ein schlechtes Allgemeinbefinden war.

2.2.7 Schein-OP

Die Schein-OP wurde initial vorbereitet und durchgeführt wie die oben zuvor beschriebene Nephrektomie. Nach Lösen der Faszie wurde hier jedoch nicht die Niere entnommen, sondern nur direkt der Darm zurückverlagert. Desweiteren wurde ebenfalls 2 ml körperwarmer NaCI-Lösung in den Bauchraum gegeben, um die Eigenrepositionierung des Darms zu unterstützen. Die Linea alba wurde wie bereits oben dargestellt nach REVERDIN genäht und die Haut mit fortlaufender intrakutaner Naht verschlossen. Sowohl die Versorgung der Wundnaht mit einer antiseptischen und kortisonhaltigen Wundsalbe, als auch die Narkoseantagonisierung und die folgende Nachsorge entsprachen dem Vorgehen der unilateralen Nephrektomie.

2.2.8 Nicht-direkte Blutdruckmessung

Entsprechend der Riva-Rocci Methode beim Menschen, wurde bei den Versuchstieren der systolische Blutdruck über die nicht direkte Tail-Cuff Methode ermittelt. An der Schwanzwurzel wurde eine Druckmanschette platziert und distal dieser Manschette der piezoelektrische Drucksensor angebracht. Um eine gute Pulsamplitude zu erzeugen und um Messfehler durch zu starke Eigenbewegung des Tieres zu vermeiden, wurden die Ratten mit Hilfe von Restrainern fixiert und einer 10-15minütigen Aufwärmung in einer Wärmebox bei 37-39°C unterzogen. Aufgrund der hohen Temperatur in der Wärmebox dilatierten die für die Regulation der Körpertemperatur zuständigen Schwanzarterien. Die auf diese Weise deutlicher werdende Pulswellenamplitude trug somit zu einer verbesserten Qualität der Messung bei. Die Aufzeichnung des jeweiligen Drucks erfolgte über eine automatisierte, computergestützte, oszillatorische Technik, bevor die letzte Pulswelle durch die Druckmanschette unterbunden wurde und nach Erschlaffen der Manschette als die Pulswelle erneut messbar wurde. Beide Werte wurden zu einem Blutdruckwert gemittelt. Der erzeugte Graph stellt die Integration der Amplitude über den Druck dar. Die Tiere wurden an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils dreimal hintereinander, unter gleichen Bedingungen gemessen. Aus diesen Werten wurde ein Mittelwert gebildet.

2.2.9 Katheter-Implantation zur direkten Blutdruckmessung

30 Minuten vor Beginn der OP wurden 5 mg/kg Carprofen zur Schmerzbehandlung s.c. in den Nacken der Tiere injiziert. Zur Narkotisierung erhielt die Ratte eine Injektionsnarkose, bestehend aus 0,005 mg/kg Fentanyl, 2 mg/kg Midazolam, 0,15 mg/kg Medetomidin, s. c. in den Nacken verabreicht. Die Ratte wurde auf dem Rücken liegend fixiert, die Zunge mit einer Pinzette in den linken Mundwinkel gezogen, damit nicht die Gefahr des Erstickens bestand. Um zu verhindern, dass der Bulbus während der OP austrocknet, erhielt jedes Auge einen Tropfen Augensalbe. Das OP-Feld wurde am Leistenspalt gesäubert und die Austrittsstelle des Katheters kranial der Schulterblätter im Nacken auf einer Fläche von 2x3 cm ausrasiert und gereinigt. Der erste Hautschnitt wurde entlang des Leistenspaltes geführt. Fettgewebe und Faszien wurden stumpf mit Wattetupfern wegpräpariert, um so die Lacuna vasorum mit austretender V., A., und N. femoralis darzustellen (Abb. 7.a). Nach der Freipräparation der Arterie von Vene und Nerv mit Wattetupfern und Splitterpinzette, erfolgte die proximale und distale Abbindung der Arterie mit chirurgischem Nahtmaterial (Abb. 7.b). Die gespannte A. femoralis wurde im distalen Drittel im Winkel von 45° mit einer Irisschere zu einem Drittel eröffnet (Abb. 7.c).

Material und Methoden_____



Abb. 7. Katheter-Implantation zur direkten Blutdruckmessung bei Ratten. a) Schematische Darstellung des OP-Feldes im Leistenspalt; b) fixierte A. femoralis; c) Schnittstelle in der A. femoralis.

In die Inzision wurde eine Mikro-Pinzette (Uhrmachertyp) eingeführt, die Schenkel der Pinzette im Gefäß leicht gespreizt, so dass der mit Heparin gespülte Katheter (50 I.E./ml; Abb. 8.) mit Hilfe einer zweiten Mikro-Pinzette (Uhrmachertyp) eingeschoben werden konnte.





Nach Entfernen der Pinzette wurde der Katheter mit der proximalen und distalen Schlinge der Arterienfixierung in der Arterie positioniert. Durch eine den Katheter haltende Knopfnaht im M. gracilis wurde gewährleistet, dass dieser in seiner Lage verblieb. Im nächsten Schritt wurde das distale Ende des Katheters mit einer Knopfsonde verbunden und subcutan dorsokranial Richtung Nacken geschoben. Es folgte ein 1 cm großer Skalpellschnitt an der rasierten Stelle des Nackens, an der der knopfsondengeführte Katheter austrat. Der Katheter wurde an der Austrittsöffnung mit der dafür vorgesehen Lasche aus Schrumpfschlauch an der Haut mit einer Knopfnaht fixiert und anschließend beide Wundränder sparsam mit Histoacrylgewebekleber geklebt. Um den Katheter luftdicht zu verschließen, erfolgte ein kurzes Abflammen des Schlauchendes. Zuletzt wurde die Wunde des Leistenspaltes mit einer fortlaufenden REVERDIN Naht verschlossen und anschließend die Wundnähte mit einer antiseptischen und kortisonhaltigen Wundsalbe bestrichen. Die Antagonisierung der Narkose bestand in der Verabreichung einer Kombination aus 0,12 mg/kg Naloxon, 0,2 mg/kg Flumazenil und 0,75 mg/kg Atipamezol. Anschließend wurde das Tier unter eine Rotlichtlampe gelegt, um ein Auskühlen zu verhindern. In den folgenden drei Tagen wurde das Tier einer direkten Blutdruckmessung unterzogen, der ein tägliches Wiegen und die Schmerzbehandlung mit Carprofen vorausgingen.

2.2.10 Direkte Blutdruckmessung

Um kleinere Blutdruckunterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen herauszuarbeiten, wurde zusätzlich eine direkte Blutdruckmessung bei den Tieren vorgenommen. Über den in die A. femoralis implantierten, mit Heparinlösung (50 I.E./ml) gefüllten Katheter (s. Punkt 2.2.9) wurde am wachen Tier der blutige Blutdruck ermittelt. Hierzu wurde der am Nacken des Tieres befestigte Katheter mit einem flüssigkeitsgefüllten Pulsaufnehmer verbunden. Dieser zeichnet Systole und Diastole auf und wandelt sie gleichzeitig in elektrische Signale um, die sich auf einem Computer als Pulsamplitude darstellen lassen. Über diese Pulsamplitude wurde der Mittlere Arterielle Druck (MAD) durch die Integration des Druckpulses über die Zeit bestimmt. Die Amplitudenaufzeichnung und die Erfassung der Daten wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen über je 1-3 Minuten unter gleichen Bedingungen durchgeführt und die erhobenen Daten anschließend gemittelt.

2.2.11 Präparation der Versuchstiere

Zur Präparation wurden die Tiere mit 87 mg/kg Ketamin und 13 mg/kg Xylazin, welche intraperitoneal injiziert wurden, in tiefe Narkose gelegt und gewogen. Nach negativem Zwischenzehenreflex erfolgte die Blutentnahme zur Bestimmung klinisch-chemischer Parameter aus dem Retroorbitalraum, mittels Mikrohämatokritröhrchen. Es wurden 4 ml Blut in Lithium-Heparin-Röhrchen gesammelt und bei 5000 Upm in einer Kühlzentrifuge für 20 – 30 min bei 4°C zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde abpipettiert und im flüssigen Stickstoff schockgefroren.

Mit einer Präparierschere erfolgte die Entfernung von Fell und Haut durch einen Ventralschnitt vom Umbilicalbereich bis zum Sternum. Die Eröffnung der Bauchhöhle fand in gleicher Weise statt. Konnte retroorbital nicht genügend Blut gewonnen werden, wurde vor Exzision des Herzens Blut mit einer Lithium-Heparin Monovette aus der V. cava caudalis entnommen. Der Schnitt wurde dann nach kranial verlängert und die Rippen am Übergang von Knochen zu Knorpel durchtrennt. Mit einem Schnitt wurde das Herz vom Gefäßstamm getrennt und in eine 1 M Kaliumlösung gelegt, um eine maximale Relaxation der

Herzmuskelzellen zu garantieren. Es folgte die Entnahme beider Nieren. Die Nieren wurden entkapselt, das Herz von Resten des Gefäßstammes, Herzohren und Atria befreit. Die Gewichte aller Organe wurden mittels einer Feinwaage bestimmt.

Die linke Niere wurde am Nierenhilus quer halbiert, eine Hälfte in Methacarn fixiert, die zweite Hälfte längs durchschnitten und Cortex von Medulla getrennt. Das Herz wurde in linken und rechten Ventrikel präpariert und beide Ventrikel gewogen. Es folgte die Entfernung des Apex und des oberen Drittels des linken Ventrikels. Das Mittelstück wurde in Methacarn fixiert. Alle Organteile wurden im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die optimale Asservierung der Organe wurde in einem -80°C Gefrie rschrank gewährleistet.

2.2.12 Uringewinnung für klinisch-chemische Analysen

Um 24 h Urin für klinisch-chemische Untersuchungen zu gewinnen, wurden die Tiere für diese Zeit in Stoffwechselkäfige aus Makrolon mit ad libitum Zugang zu Futter und Wasser gesetzt. Der gesammelte Urin wurde in ein Szintillationsgefäß aus Kunststoff, an dem kein Albumin haften bleibt, dekantiert. Die Volumenbestimmung erfolgte über das Auswiegen des Urins, wobei 1 ml ca. 1 g entspricht. Nach Durchmischen des Urins, wurden aus dem vorhandenen Volumen 2 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und anschließend bei 900 Upm für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Um Schmutzpartikel und Bakterien zu entfernen, wurde der Überstand in ein sauberes 2 ml Eppendorfgefäß dekantiert. Die übrige Menge Urin wurde im Szintillationsgefäß bei -20°C e ingefroren.

2.2.13 Albuminbestimmung im Urin

Anhand eines direkten, kompetitiven Albumin-ELISAs (enzyme linked immunosorbent assay), der im Vorfeld in der Arbeitsgruppe etabliert worden war (Kreutz et al., 2000), wurde die Albuminausscheidung in 24 h-Urin ermittelt. Gereinigtes Rattenalbumin, das als feste Phase an eine Mikrotiterplatte gebunden wird, fungierte als Antigen. Das im Urin enthaltene Rattenalbumin und das Albumin aus der festen Phase der Mikrotiterplatte konkurrieren um die Bindung an einen zugeführten enzymgekoppelten Albumin-Antikörper. Es wurde ein Substrat zugefügt, welches das Enzym umsetzt, das an die feste Phase gebunden war. Das Produkt dieser Reaktion wurde anschließend mittels eines ELISA-MRX-Plate-Readers bei 450 nm photometrisch gemessen. Die Bestimmung der Albuminwerte der Probe erfolgte über eine Eichgerade.

2.2.14 Biochemische Analysen

Die Bestimmung der biochemischen Parameter Kreatinin, Cystatin C, Harnstoff, Triglyzeride und Gesamt-Cholesterin aus Blutplasmen und 24h-Urinen erfolgte nach Standardmethoden im Labor 28 (Mecklenburgische Straße 28, 14197 Berlin). Die Kreatininclearance wurde nach folgender Formel berechnet:

Kreatinin im Urin (mmol/l) * Urinvolumen (ml)

Kreatininclearance (ml/min) =

Sammelperiode (min) * Kreatinin im Serum (mmol/l)

2.2.15 Differenzielle Genexpressionsanalysen

2.2.15.1 RNA Isolierung

Mit der Trizol-Methode wurde aus den bei -80°C eing efrorenen Nierengewebe RNA isoliert. Hierzu wurden 100 mg Gewebe in 1 ml eisgekühltes Trizol überführt und 3 x 30 sec mit dem Ultra Turrax homogenisiert. Anschließend wurde das Gemisch bei 5.000 Upm über 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Zur Proteindenaturierung wurde der abpipettierte Überstand für 40-60 min bei RT inkubiert. Zur Phasenseparation erfolgte nach dieser Zeit eine Beimischung von 200 µl Chloroform. Nach 2-3 min Reaktionszeit bei RT wurde bei 12.000 Upm für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die RNA befand sich in der o beren wässrigen Phase, welche in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol zur Fällung versetzt und nach 10 min Inkubation bei RT bei 12.000 Upm für 10 min und 4°C erneut zentrifugiert wurde. Das erhaltene RNA-Pellet wurde mit 1 ml eisgekühltem 75 %igen Ethanol gewaschen und bei 5.000 Upm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Nach de m Verwerfen des Überstands folgte das Lufttrockenen des Pellets und seine Lösung in 50 µl DEPC-Wasser (0,1%). Die photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung erfolgte bei 260-280 nm.

Zur Qualitätsüberprüfung wurden ca. 500 ng RNA mit 1 µl Laufpuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarose-Ethidiumbromid-Gel, bestehend aus 40 ml 1x TAE und 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml), aufgetragen. Der Gellauf erfolgte über einen Zeitraum von ungefähr 40 min bei 75 V und 200 mA.

2.2.15.2 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurden 4 μ g RNA mit DEPC-Wasser (0,1%) auf 10 μ l aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 μ l Random Hexamer Primer zur Hybridisierung der Probe, wurde der Ansatz in der PCR-Maschine für 5 min auf 70°C erhit zt, bevor er für 5 min auf 4°C abgekühlt wurde. Es folgte die Zugabe von 4 μ l 5x Reaction Buffer, 1 μ l RNAse Inhibitor, 2 μ l 10 mM dNTP-Mix und 2 µl reverser Transkriptase (M-MULV) auf Eis. Die Inkubation wurde in der PCR Maschine nach folgendem Schema vorgenommen: 10 min bei 25°C, 60 min bei 37°C, 10 min bei 70°C und abschließend 10 min bei 4°C. Zu r Qualitätsüberprüfung wurden ca. 5 µl Probe mit 1 µl Laufpuffer versetzt und auf ein 2%iges Agarose-Ethidiumbromid-Gel, bestehend aus 40 ml 1x TAE und 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml), aufgetragen. Der Gellauf erfolgte auch hier über einen Zeitraum von ungefähr 40 min bei 75 V und 200 mA.

2.2.15.3 Quantitative Realtime PCR

2.2.15.3.1 Sondenprinzip

Nach dem TaqMan-Prinzip (Heid et al., 1996) wurde eine Quantitative Real-Time PCR mit Nierengewebe durchgeführt. Hierfür wurde eine fluoreszierende Sonde verwendet, die von den Primern des zu quantifizierenden DNA-Fragments flankiert wurde. Durch den am 3´-Ende befindlichen Quencherfarbstoff wird der Reporterfarbstoff am 5´-Ende durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) bei intakter Sonde unterdrückt. Während der Elongationsphase führt die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zu einem Schneiden und Verdrängen der Sonde vom Strang (Sondenhydrolyse). Die Nähe des Quenchers zur Sonde und damit der FET Effekt werden auf diese Weise unterbrochen. Die entstehende Fluoreszenz steigt proportional zur Menge des gebildeten PCR-Produktes an und wird mit dem ABI Prism 7000 Sequence Detection System detektiert.

In jeder Probe, die als Triplett pipettiert wurde, befanden sich 3 µl cDNA, 12,5 µl TaqMan 2x Universal PCR Master Mix, 11,4 µl gereinigtes Wasser und je 0,075 µl Sense und Antisense Primer (Endkonzentration je 300 nM) und 0,025 µl Sonde (Endkonzentration 100 nM). Aus diesen Triplikaten wurde nach erfolgter Real-Time PCR ein Gesamtwert gemittelt. Um Unterschiede der Gesamtmenge der RNA auf die quantifizierte Menge mRNA zu normalisieren, wurde zusätzlich das sogenannte Houskeeping-Gen PBGD (Porphobilinogen-Desaminase) amplifiziert. Dieser Houskeeper wird im idealen Fall konstant in den Zellen exprimiert.

Die relative Expression (rE) wurde nach folgenden Formeln berechnet:


Der Referenzstamm SHR wurde auf 100% normiert und als Bezugsgruppe gesetzt. Über das dargestellte Prinzip wurde die Kollagen3-Expression untersucht, das bei fibrotischen Umbauveränderungen vermehrt exprimiert wird.

2.2.15.3.2 Sybr Green Prinzip

Der Sybr Green Fluoreszenzfarbstoff bindet nach Zugabe zur Probe an Doppelstrang DNA. Die Bindung von Sybr Green erfolgt in der PCR simultan an die sich bildenden Amplifikate bzw. DNA-Doppelstränge. Die Fluoreszenz, die proportional zur Menge der gebildeten PCR-Produkte ansteigt, wird mit dem ABI Prism 7000 Sequence Detection System detektiert. In jeder Probe, die als Triplett pipettiert wurde, befanden sich 3 µl cDNA, 12,5 µl Sybr Green Mastermix Puffer, 11,4 µl gereinigtes Wasser und je 0,05 µl Sense und Antisense Primer (Endkonzentration je 300 nM). Aus diesen Triplikaten wurde ein Gesamtwert gemittelt. Als Houskeeping-Gen wurde, wie unter dem Sondenprinzip beschrieben, PBGD verwendet.

Die relative Expression wurde nach folgenden Formeln berechnet:

 $DC_{T}(Bezug) = C_{T}(Bezug) - C_{T}(Housekeeper)$ $DC_{T}(Test) = C_{T}(Test) - C_{T}(Housekeeper)$ $DDC_{T} = DC_{T}(Bezug) - DC_{T}(Test)$

Der SHR Stamm wird hier als Gesund vorausgesetzt und als *Bezug* gewählt. Der zu untersuchende Stamm ist die *Test* Gruppe.

Die Expression des Nierenschädigungsparameters Ngal (Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin), der sensitiv Schädigungen des proximalen Tubuls detektiert, wurde über die Real-Time PCR mit der Sybr Green Methode bestimmt.

2.2.16 Histologische Untersuchungen

2.2.16.1 Herstellung der Nierenschnitte

Die in Methacarn fixierten und in 80%igem Ethanol gelagerten Nierenhälften wurden für die Anfertigung histologischer Präparate entwässert und in Paraffin gebettet. Anschließend wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 3 µm dünne Schnitte in transversaler Ebene angefertigt. Drei Objektträger pro Niere mit jeweils 8 Schnitten wurden bei 37°C getrocknet und anschließend im Färbeautomaten standardisiert nach Hämatoxylin-Eosin (HE), Periodic Acid Schiff (PAS) und Sirius Red gefärbt.

2.2.16.2 Bestimmung des Glomerulosklerose Index (GSI)

Die Erfassung des GSI erfolgte mittels semiquantitativer Beurteilung in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Präparate geblindet gesichtet, im zweiten Schritt die Befunde erhoben. Die Veränderungen im Mesangium und Kapillarschlingen, sowie des extrakapillären Raumes wurden mit einem Score von 0 bis 4 bewertet (Tab. 1; Raij et al., 1984).

Schweregradeinteilung der Glomerulosklerose	Ausmaß der morphologischen Veränderungen
Grad 0	Keine
Grad 0,5	unter 12 %
Grad 1	12 bis 25 %
Grad 1,5	25 bis 37 %
Grad 2	37 bis 50 %
Grad 2,5	50 bis 62 %
Grad 3	62 bis 75 %
Grad 3,5	75 bis 90 %
Grad 4	mehr als 90 %

Tab. 1 Bewertungsschema für den Glomerulosklerose Index

2.2.16.3 Beurteilung des Tubulointerstitiellen Schädigungsindex (TSI)

Die mit PAS gefärbten Histoschnitte wurden bei einer 100fachen Vergrößerung unter einem Photomikroskop gesichtet. Der Nierenschnitt wurde in 20 Quadranten geteilt und der Schweregrad der Schädigung anhand von Atrophie, Dilatation und vorhandenen Zylindern in den Tubuli abgeschätzt. Die Veränderungen im Rinden- und Markbereich wurden mit einem Score von 0-3 beurteilt (Tab. 2; Raij et al., 1984). Aus den gewonnenen Daten konnte ein gemittelter Index gebildet werden.

Schweregradeinteilung der tubulointerstitiellen Schädigung	Ausmaß der morphologischen Veränderungen
Grad 0	Keine
Grad 1	Weniger als 30 %
Grad 2	30 bis 60 %
Grad 3	mehr als 60 %

Tab. 2 Bewertungsschema für den Tubulointerstitiellen Schädigungsindex

2.2.17 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Computersoftware SPSS/PASW 18.0 der Firma Statistical Product and Service Solution Inc. Die statistische Analyse auf Signifikanz wurde bei Drei- und Mehrgruppenvergleichen durch einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-post-hoc-Test, bei Zweigruppenvergleichen durch einen T-Test oder einen Mann-Whitney-U-Test vorgenommen. Für die statistische Auswertung der Albuminurie wurden die Werte durch Logarithmieren normalverteilt. Von den analysierten Gruppen erfolgte die Berechnung des Mittelwerts und des Standardfehlers des Mittelwertes ($\overline{x} \pm s_{\overline{x}}$). Nach PASW Standard wurde die Kaplan-Meier-Überlebenskurve mit Log Rank (Mantel-Cox), Breslow (Generalized Wilcoxon) und Tarone-Ware einer Signifikanzprüfung unterzogen. Der Schwellenwert für Signifikanz lag bei p<0,05.

3 Ergebnisse

3.1 Studie A von der 6. bis zur 24. Woche

Um den Effekt der übertragenen Chromosomen RNO6 und RNO8 aus MWF in den Albuminurie-resistenten isogenetischen SHR-Hintergrund auf die verschiedenen Phänotypen zu überprüfen, wurden die Versuchsgruppen im Zeitverlauf auf Albuminurie und Blutdruck hin untersucht. Des Weiteren schloss sich final in der 24. Woche eine histologische Beurteilung der Nieren, sowie die Erhebung klinisch-chemischer Daten an. Dazu erfolgte die Einordung der beiden konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} im Vergleich zu den Parentaltierstämmen.

3.1.1 Albuminbestimmung im 24 h-Urin

3.1.1.1 Kontroll-Gruppe

MWF-Tiere der Kontroll-Gruppe entwickelten im Zeitverlauf zwischen der 12. und 24. Woche einen progressiven, kontinuierlichen Anstieg der Albuminwerte im Vergleich zu SHR (22,8 ± 2,1 vs. 0,4 ± 0,06 und 108,7 ± 12,3 vs. 1,3 ± 0,3 mg/24h; p<0,0001). Durch den Transfer von RNO8 in den gesunden SHR-Hintergrund zeigte der konsome Stamm SHR-8^{MWF} zu beiden Zeitpunkten spontan höhere Albuminwerte um das mehr als 3fache bzw. mehr als 8fache verglichen mit SHR (1,3 ± 0,2 vs. 0,4 ± 0,1 und 10,8 ± 2,1 vs. 1,3 ± 0,3 mg/24h; p<0,0001). Der konsome Stamm SHR-6^{MWF} dagegen verhielt sich in der gleichen Zeitspanne wie SHR und wies eine konstant niedrige Albumin-Ausscheidung von unter 1 mg/24h auf. Beim Vergleich der einzelnen Stämme im Zeitgang zeigten sowohl der MWF-, als auch der SHR-8^{MWF}-Stamm von der 12. zur 18. und von der 18. zur 24. Woche einen signifikanten Anstieg der Albuminurie (p<0,004; Abb.9).



Abb. 9. Albumin-Exkretion im Urin (U_{Alb}) aus Studie A der Kontroll-Gruppe von SHR-, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF}- und MWF-Tieren in der 12. (weiß), 18. (grau) und 24. Woche (schwarz); * p<0,0001 vs. andere Stämme gleicher Zeitpunkt, # p<0,0002 vs. SHR gleiche Woche.

3.1.1.2 Kaplan-Meier-Überlebenskurve der L-NAME-Gruppe

Wie in der Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Abb. 10.) dargestellt, entwickelten der Parentaltierstamm SHR und der konsome Stamm SHR-6^{MWF} eine ausgeprägte L-NAME Sensitivität, die bis zum Tod der Tiere vor dem geplanten Studienende führte. SHR-6^{MWF}-Tiere zeigten zwischen der 12. und 14. Woche einen rasanten Einbruch der Tierzahlen, so dass die gesamte Gruppe mit Beginn der 15. Woche gestorben war. Bei dem SHR-Stamm war mit einer Verzögerung von drei bis fünf Wochen eine vergleichbare Mortalitätsrate zu beobachten. Hier erreichten unter L-NAME-Behandlung zwei Tiere die 24. Woche. Zu den genannten Zeitpunkten stellt sich für SHR und SHR-6^{MWF} eine signifikante Mortalität von p<0,0001 gegenüber MWF und SHR-8^{MWF} dar. Im Vergleich der beiden letalen Gruppen, zeigte sich SHR-6^{MWF} als signifikant sensitiver auf die L-NAME Behandlung im Vergleich zu SHR (p<0,05). Die Tiere zeigten neben struppigem Fell und Anorexie, Paresen der Hinterhand und torti collis. Dagegen tolerierten der MWF- und der konsome Stamm SHR-8^{MWF} die Behandlung mit L-NAME über 18 Wochen ohne frühzeitige Mortalität. Aufgrund nicht zu generierender Daten wird im Folgenden nur die Albuminbestimmung und das Ergebnis der Nicht-Direkten Blutdruckmessung, soweit erhebbar für Studie A dargestellt.



Abb. 10. Kaplan-Meier-Überlebenskurve aus Studie A der Stämme SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF unter L-NAME im Zeitgang von der 6. bis zur 24. Woche; * p<0,0001 SHR, SHR-6^{MWF} vs. SHR-8^{MWF}, MWF zum jeweiligen Letalitätszeitpunkt

3.1.1.3 L-NAME-Gruppe

MWF-Tiere unter L-NAME zeigten in der 12., 18. und 24. Woche eine um 66%, 25% und 56% erhöhte Albuminausscheidung gegenüber MWF-Kontrolltieren (Abb. 11.). Der Vergleich mit SHR und SHR-6^{MWF} war im Altersverlauf über die 18. und 24. Woche nicht möglich. Ursächlich dafür war die hohe Mortalitätsrate dieses Stammes unter L-NAME Behandlung (s. Punkt 3.1.1.2). In der 12. Woche konnte bei SHR nur eine geringe Erhöhung der Albuminausscheidung im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtete werden (0,8 ± 0,2 vs. 0,4 ± 0,1 mg/24h). Der Transfer von RNO6 führte bei dem konsomen Stamm SHR-6^{MWF}, neben großer Variabilität der Albuminwerte innerhalb der L-NAME Gruppe von 0,4 bis 40,5 mg/24h, auch zu einer signifikant höheren Albuminurie gegenüber der Kontrollgruppe (12,7 ± 3,5 vs. 0,5 ± 0,2 mg/24h). Der konsome Stamm SHR-8^{MWF} zeigte in der L-NAME Gruppe keine signifikanten Änderungen der Albuminausscheidung in der 12. und 18. Woche gegenüber den Kontrolltieren. Interessanterweise konnte in der 24. Woche eine Erhöhung der Albuminwerte um 163% ermittelt werden (28,5 ± 5,9 vs. 10,8 ± 2,1 mg/24h; p<0,01).



Abb. 11. Albumin-Exkretion im Urin (U_{Alb}) aus Studie A der L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF-Tiere in der 12. (weiß), 18. (grau) und 24. Woche (schwarz); * p<0,0001 vs. andere Stämme gleicher Zeitpunkt; ** p<0,0001 vs. SHR gleicher Zeitpunkt; # p<0,0004 vs. SHR-6^{MWF} gleicher Zeitpunkt, n. u., nicht untersucht; Einzelwerte der Albumin-Exkretion pro Tier dieser Gruppe.

3.1.2 Tail-Cuff- Blutdruckmessung

3.1.2.1 Blutdruckmessung mit Tail-Cuff in der Kontroll-Gruppe

Der systolische-Blutdruck wurde mittels Tail-Cuff-Methode in der 12., 18. und 24. Woche gemessen (Abb. 12.). Es zeigte sich, dass MWF-Tiere in der Kontrollgruppe einen moderaten Anstieg des Blutdrucks in dieser Zeit mit signifikant niedrigeren Werten im Vergleich zu SHR entwickelten (163,5 ± 2,1 vs. 186,7 ± 4,3 und 169,2 ± 2,7 vs. 201,8 ± 4 und 176,9 ± 4,1 vs. 210,9 ± 6,7 mmHg; p<0,05). Die konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} verhielten sich zu jedem Zeitpunkt ohne signifikante Unterschiede wie SHR.



Abb. 12. Systolischer Blutdruck (SBD) mittels Tail-Cuff-Bestimmung aus Studie A der Kontroll-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF in der 12., 18. und 24. Woche; * p<0,002 vs. andere Stämme gleicher Zeitpunkt; # p<0,05 vs. SHR, SHR-6^{MWF} gleicher Zeitpunkt.

 $-\Box$ - SHR, $-\blacktriangle$ - SHR-6^{MWF}, $-\bigtriangleup$ - SHR-8^{MWF}. $-\bullet$ - MWF

3.1.2.2 Blutdruckmessung mit Tail-Cuff in der L-NAME-Gruppe

Bei der Bestimmung des systolischen Blutdrucks mittels Tail-Cuff-Methode unter L-NAME (Abb. 13.), stellte sich der Blutdruck für MWF als leicht, aber nicht signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle dar. SHR und SHR-6^{MWF} entwickelten in der 12. Woche einen starken Blutdruckanstieg mit signifikant höheren Werten gegenüber den Tieren unter Kontrolle (224,6 ± 3,4 vs. 186,7 ± 4,3 und 237,3 ± 2,9 vs. 190,8 ± 2,7 mmHg; p<0,01). Weitere Analysen in dieser Gruppe konnten aufgrund der Mortalität der Stämme SHR und SHR-6^{MWF} nicht durchgeführt werden. SHR-8^{MWF}-Tiere zeigten in der 12., 18. und 24. Woche keine signifikant erhöhten Blutdruckwerte unter L-NAME verglichen mit der Kontrollgruppe (198,2±4,6 vs. 192,5±4,2 und 219,8±4,2 vs.1 90,5±2,8 und 220,5±4,0 vs. 191,5±4,6 mmHg). MWF-Tiere demonstrierten, trotz L-NAME Behandlung, zu jedem Messzeitpunkt signifikant niedrigere Blutdrücke verglichen mit SHR, SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} (p<0,0001). Der

konsome Stamm SHR-8^{MWF} zeigte zu jedem Zeitpunkt signifikant niedrigere Blutdruckwerte gegenüber SHR und SHR-6^{MWF} (p<0,0001).



Abb. 13. Systolischer Blutdruck (SBD) mittels Tail-Cuff-Bestimmung aus Studie A männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF in der 12., 18. und 24. Woche unter L-NAME; * p<0,0001 vs. andere Stämme gleicher Zeitpunkt;

 $-\Box$ -SHR, $-\blacktriangle$ -SHR-6^{MWF}, $-\bigtriangleup$ -SHR-8^{MWF}, $-\bullet$ -MWF

3.2 Studie B von der 6. bis zur 12. Woche

Die Durchführung der Studie B wurde aufgrund der akuten Mortalität der Stämme SHR und SHR-6^{MWF} erforderlich (s. Punkt 3.1.1.2). Die Kontroll- und L-NAME-Gruppen wurden bis zur 12. Woche phänotypisch charakterisiert. An die im Zeitverlauf untersuchten Parameter Albumin-Exkretion im Urin und systolischer Blutdruck schloss sich final die histologische Untersuchung der Nieren, sowie die Erhebung klinisch-chemischer Daten an. Dazu erfolgte die Einordung der beiden konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} im Vergleich zu den Parentaltierstämmen.

3.2.1 Albuminbestimmung im 24 h-Urin

3.2.1.1 Kontroll-Gruppe

Die Ergebnisse der Albuminuntersuchung der Kontrollgruppe aus Studie B (Abb. 14.) ist mit den Ergebnissen der Studie A vergleichbar. In der 12. Woche zeigten MWF-Tiere gegenüber SHR eine 6,5fach höhere Albuminausscheidung (3,3 \pm 0,8 vs. 0,5 \pm 0,1 mg/24h; p<0,01). Der konsome Stamm SHR-6^{MWF} demonstrierte wie SHR niedrige Albuminwerte, während SHR-8^{MWF} spontan eine Albuminurie mit signifikant höheren Werten im Vergleich zu SHR entwickelte (0,92 \pm 0,14 vs. 0,5 \pm 0,1 mg/24h; p<0,02).



Abb. 14. Albumin-Exkretion im Urin (U_{Alb}) aus Studie B der Kontroll-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF in der 6. (weiß) und 12. Woche (schwarz). * p<0,02 vs. übrige Stämme gleicher Zeitpunkt.

3.2.1.2 L-NAME-Gruppe

In der L-NAME-Gruppe der Studie B (Abb. 15.) konnten ebenfalls ähnliche Ergebnisse der Albuminurie ermittelt werden wie zuvor in Studie A. MWF-Tiere zeigten eine 4fach höhere Albuminurie Entwicklung unter L-NAME im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (13,0 \pm 2,4 vs. 3,3 \pm 0,8 mg/24h; p<0,05) in der 12. Woche (Abb. 11). SHR entwickelten keine signifikant höheren Albuminwerte gegenüber der Kontroll-Gruppe und die SHR-8^{MWF}-Tiere verhielten sich hier wie SHR. Der SHR-6^{MWF}-Stamm zeigte, wie schon in Studie A, eine hohe Variabilität der Albuminexkretion mit Werten von 0,2 bis 58,8 mg/24h und demonstrierte insgesamt signifikant höhere Werte gegenüber der Kontroll-Gruppe (8,0 \pm 7,3 vs. 0,21 \pm 0,02 mg/24h; p<0,03).



Abb. 15. Albumin-Exkretion im Urin (U_{Alb}) aus Studie B der L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF in der 6.(weiß) und 12. Woche (schwarz). * p<0,01 vs. übrige Stämme gleicher Zeitpunkt.

3.2.2 Tail-Cuff- Blutdruckmessung

3.2.2.1 Blutdruckmessung mit Tail-Cuff in der Kontroll-Gruppe

Bei der Erhebung der Blutdrücke der Kontroll-Gruppe mittels Tail-Cuff-Methode (Abb. 16.) zeigten die MWF-Tiere in der 12. Woche signifikant niedrigere Blutdruckwerte im Vergleich zu SHR (144,4 ± 2,2 vs. 178,7 ± 3,5 mmHg; p<0,03). Während sich SHR-8^{MWF} wie SHR verhielt, wies SHR-6^{MWF} signifikant höhere Werte auf (194,1 ± 3,00 vs. 178,7 ± 3,5 mmHg; p<0,03).



Abb. 16. Systolischer Blutdruck (SBD) mittels Tail-Cuff-Bestimmung aus Studie B der Kontroll-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF in der 6. und 12. Woche. * p<0,003 vs. andere Stämme; # p<0,03 vs. SHR, SHR-8^{MWF} gleiche Woche.

 $-\Box$ -SHR, $-\blacktriangle$ -SHR-6^{MWF}, $-\bigtriangleup$ -SHR-8^{MWF}, $-\bullet$ -MWF

3.2.2.2 Blutdruckmessung mit Tail-Cuff in der L-NAME-Gruppe

Unter L-NAME entwickelte MWF eine nur leichte Blutdruckerhöhung verglichen mit der Kontrollgruppe. SHR demonstrierte in der 12. Woche einen signifikanten Anstieg des Blutdrucks gegenüber der Kontrolle (240,8 ± 4,0 vs. 178,7 ± 3,5 mmHg; p<0,0001). Der konsome Stamm SHR-6^{MWF} verhielt sich wie SHR unter L-NAME. Die SHR-8^{MWF}-Tiere lagen in der L-NAME-Gruppe intermediär zwischen den Blutdruckwerten der Parentaltierstämme (Abb.17.) und zeigten signifikant höhere Blutdrücke im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.



Abb. 17. Systolischer Blutdruck (SBD) mittels Tail-Cuff-Bestimmung aus Studie B der L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF in der 6. und 12. Woche. * p< 0,0001 vs. andere Stämme; # p<0,0001 vs. SHR, SHR-6^{MWF} gleiche Woche.

 $-\Box$ -SHR, $-\blacktriangle$ -SHR-6^{MWF}, $-\bigtriangleup$ -SHR-8^{MWF}, $-\bullet$ -MWF

3.2.3 Direkte Blutdruckmessung über Femoralisverweilkatheter der Kontrollund L-NAME-Gruppe

Der mittlere arterielle Druck (MAD; Abb. 18.) erhoben in der 12. Woche, zeigte für MWF keine signifikant erhöhten Werte im Vergleich der Kontrolle gegen die L-NAME-Gruppe (125,7 ± 5,1 vs. 141,7 ±5,7 mmHg). SHR, SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} entwickelten unter L-NAME 30%, 23% und 26% höhere MAD im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (166,0 ± 9,1 vs. 216,0 ± 6,1 und 155,4 ± 4,7 vs. 191,8 ± 10,2 und 150,1 ± 4,9 vs. 189,5 ± 11,5 mmHg; p<0,02).



Abb. 18. Mittlerer arterieller Druck (MAD) aus Studie B der Kontroll- und L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF in der 12. Woche. Kontroll- (weiß) und L-NAME-Gruppe (schwarz); * p<0,0001 vs. andere Stämme; # p<0,02 vs. Kontrolle.

3.2.4 Relatives Linksventrikuläres-Gewicht der Kontroll- und L-NAME-Gruppe Als mögliche Folgeerscheinung der Hypertonie kann eine Linksherzhypertrophie auftreten. Auf Grund dessen wurde der Parameter des relativen Linksventrikulären-Gewichts untersucht (Abb. 19.). MWF entwickelte sowohl unter Kontroll-Bedingungen, als auch unter L-NAME-Behandlung signifikant niedrigere relative Gewichte des linken Ventrikels im Vergleich zu SHR und SHR-8^{MWF} (p<0,05). Während der SHR-6^{MWF}-Stamm sich in beiden Versuchsgruppen wie MWF verhielt, zeigte SHR-8^{MWF} die gleiche Entwicklung des relativen linksventrikulären Gewichts wie SHR. SHR demonstrierte eine signifikante Zunahme des relativen Gewichts des linken Ventrikels im Vergleich der Kontroll- zur L-NAME- Gruppe (2,5 ± 0,1 vs. 2,8 ± 0,1 mg/g; p<0,007).



Abb. 19. Relatives Linksventrikuläres-Gewicht (rel LVG) aus Studie B der Kontroll- und L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR- 6^{MWF} , SHR- 8^{MWF} und MWF in der 12. Woche. Kontroll- (weiß) und L-NAME-Gruppe (schwarz). * p<0,05 vs. SHR und SHR- 8^{MWF} ; # p<0,007 vs. Kontroll-Gruppe.

3.2.5 Cystatin C-Konzentration im Plasma der Kontroll- und L-NAME-Gruppe

Als sensitiverer Nierenfunktionsmarker zur Bestimmung der GFR im Vergleich zu Kreatinin oder Kreatinin-Clearance, wurde Cystatin C im Plasma bestimmt (Kyhse-Andersen et al., 1994; Abb. 20.). Im Unterschied zum Kreatinin ist die Cystatin C-Konzentration nicht abhängig von Muskelmasse, Nahrungsgewohnheiten oder tubulärer Sekretion (Andersen et al., 2009). Bei den MWF-Tieren konnte im Plasma bei beidem Versuchsgruppen eine doppelt so hohe Konzentration von Cystatin C bestimmt werden, als bei SHR (0,11 \pm 0,01 vs. 0,07 \pm 0,004 und 0,13 \pm 0,004 vs. 0,07 \pm 0,01 mg/l; p<0,02). Während sich die SHR-8^{MWF}-Tiere in beiden Gruppen wie SHR verhielten, zeigte SHR-6^{MWF}-Tiere unter Kontroll-Bedingungen signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu SHR $(0,05 \pm 0,0003 \text{ vs. } 0,07 \pm 0,004 \text{ mg/l}; \text{ p<}0,001)$ und unter L-NAME signifikant höhere Werte $(0,1 \pm 0.02 \text{ vs. } 0.07 \pm 0.01 \text{ mg/l}; \text{ p<}0.001).$



Abb. 20. Cystatin C im Plasma aus Studie B der Kontroll- und L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF in der 12. Woche, Kontroll- (weiß) und L-NAME-Gruppe (schwarz). * p<0,02 vs. andere Stämme, ** p<0,001 vs. SHR; # p<0,001 vs. gleicher Stamm Kontrolle-Gruppe.

3.2.6 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

3.2.6.1 Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin-Genexpression

Über Realtime PCR wurde in der Niere die Expression des tubulären Schädigungsmarkers Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (Ngal) bestimmt (Mishra et al., 2003; Abb. 21.). Die SHR-Kontrollgruppe diente hier als Referenz und wurde gleich 100% gesetzt.

In der Kontroll-Gruppe konnte zwischen den Parentaltieren und den konsomen Stämmen kein signifikanter Unterschied der Expression der 12. Woche festgestellt werden. Unter L-NAME Behandlung wurde bei MWF ein nicht signifikanter Expressionsunterschied gegenüber der Kontrolle detektiert (93,8 ± 16,1 vs. 156,7 ± 30,6 %), während bei SHR eine 2,7fache (100,0 ± 18,3 vs. 270,0 ± 73,8 %), bei SHR-6^{MWF} eine 17,5fache (54,9 ± 4,0 vs. 965,0 ± 421,0 %) und bei SHR-8^{MWF} eine 3fache (178,6 ± 46,6 vs. 531,2 ± 162,0 %) Expressionserhöhung ermittelt wurde. SHR-6^{MWF} erwies sich unter L-NAME allen Stämmen gegenüber als signifikant erhöht (p<0,02).



Abb. 21. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (Ngal)-Genexpression aus Studie B der Kontroll- und L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF in der 12. Woche. Kontroll- (weiß) und L-NAME-Gruppe (schwarz). * p<0,01 vs. Kontrolle gleicher Stamm; # p<0,02 vs. andere Stämme gleiche Gruppe.

3.2.7 Histologie

3.2.7.1 Tubulointerstitieller Schädigungsindex

Nach Anfertigung histologischer Schnitte wurde der tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI) bestimmt (Abb. 22.). Bei Sichtung der Proben konnte in der Kontroll-Gruppe zwischen den Stämmen kein signifikanter Unterschied der tubulären Schädigung identifiziert werden, unter L-NAME zeigte MWF signifikant weniger tubulointerstitielle Schädigung verglichen zu den übrigen 3 Stämmen (p<0,04). In der Gruppe der L-NAME behandelten Tiere zeigten die Parentaltiere keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontroll-Gruppe während bei den konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (p<0,01) detektiert werden konnte. Bei dem konsomen Stamm SHR-6^{MWF} konnte unter L-NAME eine 44% Erhöhung der tubulären Schädigung gegenüber den Kontrolltieren dieses Stammes ermittelt werden (0,29 \pm 0,05 vs. 1,00 \pm 0,17; p<0,0001), auch bei der histologischen Auswertung der TSI konnte für diesen Stamm eine zwei Gruppenbildung beobachtet werden.



Abb. 22. Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI) aus Studie B der Kontroll- und L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF in der 12. Woche. Kontroll- (weiß) und L-NAME-Gruppe (schwarz). * p<0,01 vs. Kontrolle gleicher Stamm; # p<0,04 vs. übrige Stämme.

3.2.7.2 Glomerulosklerose-Index

Bei der histologischen Auswertung wurde ebenfalls der Glomerulosklerose-Index (GSI) untersucht (Abb. 23.). Hier konnte bei MWF unter Kontroll-Bedingungen eine signifikant niedrigere Glomerulosklerose im Vergleich zu den übrigen Stämmen ermittelt werden (p<0,02). Die beiden konsomen Stämme verhielten sich in der Kontroll-Gruppe wie SHR. Unter L-NAME Behandlung stieg der Schädigungsindex in den einzelnen Stämmen an, jedoch nicht signifikant. Der konsome Stamm SHR-6^{MWF} demonstriert hier unter L-NAME eine erhöhte Standardabweichung, da sich die zwei Gruppenbildung auch über den GSI zeigte.



Abb. 23. Glomerulosklerose-Index (GSI) aus Studie B der Kontroll- und L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF in der 12. Woche. Kontroll- (weiß) und L-NAME-Gruppe (schwarz). * p<0,02 vs. andere Stämme.

3.2.7.3 Histopathologie der Niere der L-NAME-Gruppe



Abb. 24. Histopathologie der rechten Niere aus Studie B der L-NAME-Gruppe männlicher SHR-6^{MWF} mit schweren Nierenschädigungen (links) u. a. glomeruläre Schädigung, dilatation der Tubuli sowie Atrophie der tubulären Epithelzellen, SHR-6^{MWF} mit leichten Nierenschädigungen (rechts), SHR und MWF in der 12. Woche nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

3.2.8 Biologisch-Chemische Analysen

Die Tabelle 3 zeigt die Gesamtstatistik der biologisch-chemischen Analysen der Parentaltierstämme MWF und SHR, sowie der beiden konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} in der 12. Woche unter Kontrolle- und L-NAME-Behandlung. Beim Vergleich des absoluten Lebendgewichtes konnten bei MWF signifikant höhere Gewichte als bei SHR und SHR-8^{MWF} in der Kontroll-Gruppe festgestellt werden (p<0.01). Unter L-NAME wurden keine signifikanten Unterschiede des absoluten Körpergewichtes ermittelt. Die Bestimmung des absoluten Nierengewichtes zeigten in beiden Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Das relative Nierengewicht im Bezug auf das Körpergewicht ermittelt, stellte sich bei MWF in der Kontroll-Gruppe als signifikant niedriger im Vergleich zu SHR und SHR-8^{MWF} dar (p<0.03). Unter L-NAME konnte für beide Parentaltierstämme, verglichen mit dem konsomen Stamm SHR-8^{MWF}, ein signifikant niedrigeres relatives Nierengewicht festgestellt werden (p<0,01). Das absolute Herzgewicht in der Kontroll-Gruppe wies im Gesamtvergleich keine Signifikanzen zwischen den verschiedenen Stämmen auf. Unter L-NAME zeigten MWF-Tiere signifikant niedrigere Herzgewichte im Vergleich zu SHR und SHR-6^{MWF} (p<0,01). Der Vergleich zwischen SHR, SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} ergab keine signifikanten Unterschiede des absoluten Herzgewichtes. Unter Kontroll-Bedingungen demonstrierte beim Vergleich des relativen Herzgewichtes MWF gegenüber SHR und SHR-8^{MWF} ein signifikant niedrigeres relatives Herzgewicht (p<0,003). SHR und SHR-6^{MWF} entwickelten unter Kontrolle ein hoch signifikant erhöhtes relatives Herzgewicht, verglichen mit dem konsomen Stamm SHR-8^{MWF} (p<0,0001). Unter L-NAME-Behandlung wies MWF gegenüber SHR und den beiden konsomen Stämmen ein signifikant niedrigeres relatives Herzgewicht auf (p<0,01). Die Bestimmung der Kreatinin-Konzentration im Plasma ergab für MWF und SHR unter Kontroll-Bedingungen nur im Vergleich zu SHR-6^{MWF} signifikant höhere Werte (p<0,05). In der L-NAME-Gruppe konnten keine Signifikanzen ermittelt werden. Bei der Überprüfung von Harnstoff im Plasma der Kontroll-Gruppe konnte für MWF eine signifikant höhere Konzentration im Vergleich zu SHR-8^{MWF} festgestellt werden (p<0,006). Die Berechnung der Kreatinin-Clearance ergab für SHR-6^{MWF} in der Kontroll-Gruppe ebenfalls signifikant höhere Werte gegenüber SHR (p<0,02). Unter L-NAME ergab die Berechnung der Kreatinin-Clearance keine signifikanten Unterschiede.

					P-ANOVA						
Phänotyp	SHR	SHR-6 ^{MWF}	SHR-8 ^{MWF}	MWF	Overall	MWF vs.	MWF vs.	MWF vs.	SHR vs.	SHR vs.	SHR-6 ^{MWF} vs.
						SHR	SHR-6 ^{MWF}	SHR-8 ^{MWF}	SHR-6 ^{MWF}	SHR-8 ^{MWF}	SHR-8 ^{MWF}
KG (g)											
Kontrolle	248,0 ± 8,5	258,2 ± 5,2	245,0 ± 6,1	279,25± 5,5	0,003	0,01	0,17	0,004	1,00	1,00	0,95
L-NAME	263,5 ± 9,8	277,5 ± 17,9	251,9 ± 7,0	270,7 ± 4,9	0,36						
NG (g)											
Kontrolle	1,73 ± 0,08	1,65 ± 0,05	1,76 ± 0,06	1,67 ± 0,05	0,72						
L-NAME	1,69 ± 0,05	1,72 ± 0,09	1,81 ± 0,09	1,67 ± 0,02	0,39						
NG/KG (mg/g)											
Kontrolle	6,90 ± 0,19	6,42 ± 0,27	7,19 ± 0,18	5,96 ± 0,18	0,001	0,03	0,74	0,001	0,82	1,00	0,08
L-NAME	6,43 ± 0,13	6,26 ±0,16	7,19 ± 0,25	6,18 ± 0,10	0,01	1,00	1,00	0,001	1,00	0,01	1,00
HG (g)											
Kontrolle	$0,74 \pm 0,02$	0,73 ± 0,02	0,77 ± 0,02	0,75 ± 0,02	0,59						
L-NAME	$0,88 \pm 0,02$	0,83 ± 0,03	0,79 ± 0,03	0,69 ± 0,03	0,001	<0,0001	0,01	0,08	1,00	0,11	1,00
HG/KG(mg/g)											
Kontrolle	3,00 ± 0,10	2,82 ± 0,05	1,15 ± 0,04	2,67 ± 0,03	<0,0001	0,003	0,46	<0,0001	0,28	<0,0001	<0,0001
L-NAME	$3,38 \pm 0,09$	3,06 ± 0,17	3,14 ± 0,09	2,55 ± 0,08	<0,0001	<0,0001	0,01	0,001	0,24	0,56	1,00
PKrea (µmol/l))										
Kontrolle	32,12 ± 2,70	24,88 ± 1,13	29,83 ± 0,60	31,38 ± 1,78	0,02	1,00	0,05	1,00	0,04	1,00	0,22
L-NAME	32,89 ± 2,21	36,69 ± 9,12	31,68 ± 2,10	32,05 ± 0,83	0,78						
PHs (mmol/l)											
Kontrolle	8,31 ± 0,61	8,13 ± 0,50	6,73 ± 0,35	8,80 ± 0,25	0,008	1,00	1,00	0,006	1,00	0,09	0,14
L-NAME	7,88 ± 0,62	11,82 ± 2,27	8,61 ± 0,69	10,85 ± 0,39	0,03	0,13	1,00	0,44	0,07	1,00	0,21
KreaCl (ml/mir	n*100g)										
Kontrolle	$0,34 \pm 0,02$	0,60 ± 0,03	$0,44 \pm 0,32$	$0,45 \pm 0,08$	0,02	0,93	0,29	1,00	0,02	1,00	0,32
L-NAME	0,41 ± 0,05	0.54 ± 0.07	0,45 ± 0,05	0,57 ± 0,02	0,05	0.08	1.00	0,40	0.53	1.00	1.00

Tab. 3 Phänotypische Charakterisierung aus Studie B der Kontroll- und L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF in der 12. Woche

KG, Körpergewicht; NG, Nierengewicht; HG, Herzgewicht, PKrea, Plasma Kreatinin; PHs, Plasma Harnstoff; KreaCl, Kreatinin-Clearance; MWF, Munich Wistar Frömter; SHR, spontaneously hypertensive rat

3.3 Unilaterale Nephrektomie

3.3.1 Albuminbestimung im 24 h Urin

In der Gruppe der unilateral nephrektomierten Tiere musste im Zeitgang keine Änderung des Versuchsprotokolls vorgenommen werden. Alle Tiere konnten planmäßig durch den Versuch geführt werden und wiesen keine vorzeitige Mortalitätsrate auf.

Die Albuminausscheidung bei MWF zeigte im Zeitverlauf einen progressiven, kontinuierlichen Anstieg der Albuminurie, der signifikant höher war im Vergleich zu SHR und den beiden konsomen Stämmen (p<0,001). Gegenüber der Kontroll-Gruppe konnte unter Nx bei MWF kein signifikanter Unterschied der Albuminurie detektiert werden. SHR entwickelte im Zeitverlauf nur eine milde Albuminurie unter unilateraler Nephrektomie, die gegenüber der Kontrolle in der 12. und 18. Woche signifikant unterschiedlich war (0,4 ± 0,1 vs. 2,1 ± 0,4 und 0,9 ± 0,2 vs. 5,5 ± 1,0 mg/24h; p<0,0001). SHR-6^{MWF} blieb in der Nx-Gruppe in der 18. und 24. Woche mit einer Signifikanz von p<0,001 noch unter den Werten von SHR (2,5 ± 0,4 vs. 5,5 ± 1,0 und 7,8 ± 1,4 vs. 15,1 ± 2,4 mg/24h; Abb. 25.). Die SHR-8^{MWF}-Tiere zeigten im Altersverlauf unter Nx einen kontinuierlichen Anstieg der Albuminausscheidung, die in der 12. Woche um das mehr als 3fache, in der 18. Woche um das 5fache und in der 24. Woche um das 3,5fache höher war, verglichen mit den Kontrolltieren (1,3 ± 0,2 vs. 4,9 ± 0,8 und 2,9 ± 0,5 vs. 14,9 ± 2,6 und 10,8 ± 2,1 vs. 37,2 ± 4,9 mg/24h; p<0,003).



Abb. 25. Albumin-Exkretion im Urin (U_{Alb}) der Nx-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF in der 12. (weiß), 18. (grau) und 24. Woche (schwarz). * p<0,006 vs. andere Stämme gleiche Woche, # p<0,02 vs. SHR gleiche Woche

3.3.2 Blutdruckmessung mit Tail-Cuff

Bei der Tail-Cuff Blutdruckmessung der Nx-Gruppe (Abb. 26.) konnte zu keinem der drei Zeitpunkte eine signifikante Blutdruckerhöhung der vier untersuchten Stämme, im Vergleich mit der jeweiligen Kontroll-Gruppe, detektiert werden. Bei den MWF-Tieren der Nx-Gruppe konnten in der 12., 18. und 24. Woche 16%, 24% und 18% niedrigere Blutdruckwerte im Vergleich zu SHR ermittelt werden (161,6 ± 1,9 vs. 189,0 ± 3,1 und 169,8 ± 1,9 vs. 211,0 ± 4,4 und 181,2 ± 2,2 vs. 215,0 ± 6,1 mmHg; p<0,001). Die konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} verhielten sich wie SHR unter unilateraler Nephrektomie.



Abb. 26. Systolischer Blutdruck (SBD) der Nx-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF in der 12., 18. und 24. Woche. * p< 0,001 vs. andere Stämme; # p<0,05 vs. SHR.

 $-\Box$ SHR, $-\blacktriangle$ SHR- 6^{MWF} , $-\bigtriangleup$ SHR- 8^{MWF} , $-\bullet$ MWF

3.3.3 Direkte Blutdruckmessung über Femoralisverweilkatheter

Im Folgenden werden die weiteren Ergebnisse nur für die Stämme SHR, SHR-8^{MWF} und MWF dargestellt, da der zu untersuchende Phänotyp der Albuminurie unter unilateraler Nephrektomie im SHR-6^{MWF}-Stamm nicht entwickelt wurde. MWF wies nur eine moderate Blutdruckerhöhung unter Nx gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe auf (150,2 ± 2,7 vs. 136,2 ± 2,1 mmHg), zeigte sich aber in beiden Gruppen mit signifikant niedrigeren Werten des MAD im Vergleich zu SHR und SHR-8^{MWF} (p<0,05). SHR entwickelte bei der Bestimmung des mittleren arteriellen Drucks als einziger Stamm eine signifikante Erhöhung der Werte zwischen den beiden Gruppen Kontrolle und Nx (169,0 ± 3,8 vs. 184,9 ± 11,6 mmHg, p<0,006). SHR-8^{MWF} verhielt sich in der Kontrollgruppe wie SHR und entwickelte nur mild erhöhte, mittlere arterielle Blutdrücke in der Nx-Gruppe verglichen mit der Kontrolle (166,8 ± 3,7 vs. 161,6 ± 6,0 mmHg).



Abb. 27. Mittlerer arterieller Druck (MAD) der Nx-Gruppe männlicher SHR, SHR-8^{MWF} und MWF in der 24. Woche. Kontroll- (weiß) und Nx-Gruppe (schwarz). * p<0,05 vs. andere Stämme, # p<0,006 vs. Nx.

3.3.4 Relatives linksventrikuläres Gewicht

Bei der Untersuchung des relativen linksventrikulären Gewichts konnten im Vergleich der Gruppen Kontrolle und Nx keine signifikant höheren Gewichte ermittelt werden (Abb. 28.). Der MWF-Stamm zeigte in beiden Gruppen signifikant niedrigere relative linksventrikuläre Gewichte im Vergleich zu SHR ($2,0 \pm 0,06$ vs. $2,8 \pm 0,09$ und $2,1 \pm 0,05$ vs. $2,7 \pm 0,07$ mg/g; p<0,006). SHR-8^{MWF}-Tiere demonstrierten unter Kontrollbedingungen und unter unilateraler Nephrektomie intermediäre relative Gewichte des linken Ventrikels im Vergleich zu den Parentaltieren.



Abb. 28. Relatives linksventrikuläres Gewicht (rel LVG) der Nx-Gruppe männlicher SHR, SHR-8^{MWF} und MWF in der 24. Woche. Kontroll- (weiß) und L-NAME-Gruppe (schwarz). * p<0,006 vs. andere Stämme.

3.3.5 Cystatin C

Die Cystatin C Konzentration im Plasma (Abb. 29.) ergab für MWF unter Nx einen signifikant erhöhten Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe (0,14 \pm 0,003 vs. 0,08 \pm 0,01 mg/l; p<0,0001). Beim SHR-Stamm wurden in beiden Versuchsgruppen signifikant niedrigere Konzentrationen von Cystatin C im Plasma gegenüber MWF ermittelt (0,05 \pm 0,002 vs. 0,08 \pm 0,01 und 0,07 \pm 0,003 vs. 0,14 \pm 0,003 mg/l; p<0,008). Die konsomen SHR-8^{MWF}-Tiere verhielten sich wie SHR.



Abb. 29. Cystatin C im Plasma der Nx-Gruppe männlicher SHR, SHR-8^{MWF} und MWF in der 24. Woche. Kontroll- (weiß) und Nx-Gruppe (schwarz). * p<0,008 vs. andere Stämme; # p<0,0001 vs. Kontrolle gleicher Stamm

3.3.6 Ergebnisse der Genexpressionsanalysen

3.3.6.1 Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin

Ngal, das vermehrt bei tubulärerer Schädigung exprimiert wird, wurde aus dem Cortex mit der Realtime PCR bestimmt (Abb. 30.). Die SHR-Kontrollgruppe diente hier als Referenz und wurde gleich 100% gesetzt.

MWF zeigte unter Nx eine erhöhte Expression verglichen mit der Kontrollgruppe (247,5 ± 74,6 vs. 1625,2 ± 394,2 %, p<0,00001). Im SHR-Stamm wurden in beiden Versuchsgruppen signifikant niedrigere Werte gegenüber MWF ermittelt (100 ± 35,4 vs. 247,5 ± 74,6 und 303,3 ± 91,4 vs. 1625,2 ± 394,2 %, p<0,04). Die konsomen SHR-8^{MWF}-Tiere verhielten sich wie SHR.



Abb. 30. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (Ngal)-Genexpression der Nx-Gruppe männlicher SHR, SHR-8^{MWF} und MWF in der 24. Woche. Kontroll- (weiß) und Nx-Gruppe (schwarz). * p<0,04 vs. SHR; ** p<0,005 vs. andere Stämme; # p<0,0001 vs. gleicher Stamm Kontrolle.

3.3.6.2 Kollagen 3

Um eine differenziertere Beurteilung der Nierenschädigung vorzunehmen, wurde weiterführend Kollagen III (Col3), das vermehrt bei fibrotischen Umbauvorgängen exprimiert wird, mit der Realtime PCR aus Nierengewebe bestimmt (Abb. 31.). Die SHR-Kontrollgruppe diente hier als Referenz und wurde gleich 100% gesetzt.

Bei MWF konnte unter Nx eine mehr als 6fach erhöhte Expression von Col3 gegenüber der Kontrolle detektiert werden (297,4 \pm 105,5 vs. 1878,4 \pm 849,9 %, p<0,005). SHR zeigte eine 5,5fach erhöhte Expression im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (100 \pm 35,9 vs. 549,2 \pm 146,7 %, p<0,005). Der konsome Stamm SHR-8^{MWF} entwickelte eine geringe Expressionserhöhung zwischen den Gruppen. Unter Kontroll-Bedingungen zeigten sich zwischen MWF, SHR und SHR-8^{MWF} keine Unterschiede. In der Nx-Gruppe konnte bei MWF eine 240% höhere Col3-Expression verglichen mit SHR ermittelt werden (1878,4 \pm 849,9 vs. 549,2 \pm 146,7 %, p<0,0001). Der konsome Stamm SHR-8^{MWF} lag unter Nx-Bedingungen intermediär zwischen den Parentaltieren.



Abb. 31. Kollagen 3 (Col3)-Expression bei männlichen SHR, SHR-8^{MWF} und MWF Tieren, in der 24. Wo., Kontroll-Tiere (weiß) und Nx (schwarz); * p<0,0001 vs. andere Stämme; # p<0,005 vs. Kontrolle gleicher Stamm

3.3.6.3 Kidney Injury Molecule 1

Bei Kidney Injury Molecule 1 (Kim-1) (Abb. 32.) handelt es sich um einen Biomarker, der klassischer Weise vermehrt bei chronischen Nierenerkrankungen in der Niere exprimiert wird. Neue Studien zeigen aber, das auch bei akuter Nierenschädigung eine erhöhte Expression bestimmt werden kann (Ko et al., 2010). Die SHR-Kontrollgruppe diente hier als Referenz und wurde gleich 100% gesetzt.

MWF demonstrierte in der Kontroll-Gruppe eine 42fach vermehrte Expression von Kim-1 aus der Nierencortex, verglichen mit SHR (100,0 ± 16,9 vs. 4229,4 ± 997,8 %, p<0,04). Der Expressionswert stieg unter unilateraler Nephrektomie um das mehr als 4fache an für MWF und erwies sich in der Nx-Gruppe als signifikant gegenüber SHR und SHR-8^{MWF} (p<0,008). Während bei SHR-8^{MWF} unter Kontrolle eine signifikant höhere Expression gegenüber SHR bestimmt werden konnte (100 ± 16,9 vs. 375,1 ± 100,1 %, p<0,04), verhielt sich der konsome Stamm in der Nx-Gruppe wie SHR.



Abb. 32. Kidney Injury Molecule 1 (Kim-1)-Expression bei männlichen SHR, SHR-8^{MWF} und MWF Tieren in der 24. Wo., Kontroll-Tiere (weiß) und Nx (schwarz); * p<0,008 vs. andere Stämme Nx; ** p<0,04 vs. andere Stämme Kontrolle; # p<0,05 vs. Kontrolle gleicher Stamm

3.3.7 Histologie

3.3.7.1 Tubulointerstitieller Schädigungsindex

Bei der lichtmikroskopischen Auswertung der histologischen Schnitte (Abb.33.) konnte festgestellt werden, dass MWF Kontroll-Tiere gegenüber Nx-Tieren eine doppelt so hohe tubulointerstitieller Schädigung (TSI) entwickeln $(1,31 \pm 0,22 \text{ vs. } 0,66 \pm 0,04; \text{ p<}0,01)$. SHR und SHR-8^{MWF} zeigten ebenfalls in der Nx-Gruppe eine signifikante Erhöhung des tubulären Schädigungsindexes im Vergleich zur Kontrolle ($0,45 \pm 0,05 \text{ vs. } 0,20 \pm 0,02; \text{ p<}0,01$ und $0,5 \pm 0,14 \text{ vs. } 0,3 \pm 0,11; \text{ p<}0,02)$. Bei SHR-8^{MWF} konnte in der Kontrollgruppe mit einer Signifikanz von p<0,01 eine höhere TSI detektiert werden, im Vergleich zu SHR-Kontrolltieren. MWF zeigte sowohl in der Kontroll-Gruppe als auch unter unilateraler Nephrektomie signifikant höhere Schädigungen des Tubulus im Vergleich mit SHR und SHR-8^{MWF} (p<0,01).



Abb. 33. Tubulointerstitieller-Schädigungsindex (TSI) männlicher SHR, SHR-8^{MWF} und MWF Tiere in der 24. Wo., Kontroll-Tiere (weiß) und Nx (schwarz); * p<0,01 vs. andere Stämme; # p<0,01 vs. Kontrolle gleicher Stamm

3.3.7.2 Glomerulosklerose-Index

Der Glomerulosklerose-Index (Abb. 34.), der ebenfalls über die lichtmikroskopische Beurteilung erhoben wurde, zeigte für MWF im Vergleich zu SHR in der Kontroll- und Nx-Gruppe um 57% und 45% erhöhte Werte (1,62 \pm 0,12 vs. 1,03 \pm 0,13; p<0,007 und 1,78 \pm 0,12 vs. 1,23 \pm 0,15, p<0,03). Der konsome Stamm SHR-8^{MWF} lag in der Kontroll-Gruppe intermediär bezüglich der Parentaltiere und verhielt sich unter Nx wie MWF mit 38% höherer glomerulärer Schädigung gegenüber SHR (1,70 \pm 0,07 vs. 1,23 \pm 0,15, p<0,03).



Abb. 34. Glomerulosklerose-Index (GSI) männlicher SHR, SHR-8^{MWF} und MWF Tiere in der 24. Wo., Kontroll-Tiere (weiß) und Nx (schwarz); * p<0,03 vs. andere Stämme Nx, # p<0,007 vs. MWF Kontrolle

3.3.7.3 Histopathologie der Nx-Gruppe





SHR - Nx





SHR-8^{MWF} - Kontrolle



MWF- Nx



SHR-8^{MWF}- Nx



Abb. 35. Histopathologie der rechten Niere der Kontroll- und Nephrektomie (Nx)-Gruppe männlicher SHR, SHR-8^{MWF} und MWF Tiere in der 24. Woche nach Periodic-Acid-Schiff-Färbung mit unterschiedlich ausgeprägter glomerulärer Schädigung, Dilatation der Tubuli sowie Atrophie der tubulären Epithelzellen

3.3.8 Biologisch-Chemische Analysen

Die Tabelle 4 zeigt die Gesamtstatistik der biologisch-chemischen Analysen der Parentaltierstämme MWF und SHR, sowie des konsomen Stamms SHR-8^{MWF} in der 24. Woche unter Kontrolle und Nx. Das absoluten Lebendgewicht von MWF in der 24. Woche war unter Kontroll-Bedingungen signifikant höher im Vergleich zu SHR und SHR-8^{MWF} (p<0,003). Unter Nx war kein Unterschied mehr zu bestimmen. Beim Vergleich des rechten absoluten Nierengewichtes konnte in der Kontrollgruppe kein Unterschied zwischen den Stämmen detektiert werden. Unter unilateraler Nephrektomie zeigte MWF eine signifikant größere rechte Niere im Vergleich zu SHR und SHR-8^{MWF} (p<0,05). In Relation des rechten Nierengewichtes zur Körpermasse, konnten in beiden Gruppen keine Signifikanzen des relativen Nierengewichtes zwischen den Stämmen festgestellt werden. Der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und den Nx-Tieren ergab sowohl für das absolute, als auch für das relative rechte Nierengewicht bei allen drei Stämmen eine hoch signifikante Gewichtszunahme (p<0,0001). Das absolute Herzgewicht war in der Kontroll-Gruppe bei allen Stämmen unauffällig, unter Nx entwickelten die Stämme SHR und SHR-8^{MWF} signifikant größere Herzen im Vergleich zu MWF, wobei SHR gegenüber dem konsomen Stamm signifikant schwerer war (p<0,03). MWF entwickelte unter Nx ein signifikant größeres relatives Herzgewicht im Vergleich zu SHR-8^{MWF} (p<0,0001). Beim SHR-Stamm konnte unter Kontroll-Bedingungen und unter unilateraler Nephrektomie ein signifikant niedrigeres relatives Herzgewicht gegenüber MWF und SHR-8^{MWF} bestimmt werden (p<0,02). Die analytische Bestimmung von Kreatinin im Plasma zeigte, dass MWF-Tiere im Gegensatz zu SHR und SHR-8^{MWF} unter unilateraler Nephrektomie höhere Konzentrationen aufwiesen (p<0,003), während in der Kontroll-Gruppe keine Signifikanzen detektiert wurden. Die Konzentration von Harnstoff im Plasma zeigte sowohl unter Kontroll-Bedingungen, als auch in der Nx-Gruppe beim MWF-Stamm signifikant höhere Konzentrationen im Vergleich zu SHR (p<0,003). Unter unilateraler Nephrektomie wies MWF eine signifikant höhere Harnstoff-Konzentration im Vergleich zum konsomen Stamm auf (p<0,0001). Die Überprüfung der Kreatinin-Clearance ergab in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede der Stämme.

Phänotyp			P-ANOVA				
/ Gruppe	SHR	SHR-8 ^{MWF}	MWF	Overall	MWF vs. SHR	MWF vs. SHR-8 ^{MWF}	SHR vs. SHR-8 ^{MWF}
KG (g)							
Kontrolle	329,2 ± 8,17	345,0 ± 7,8	384,8 ± 6,57	<0,0001	<0,0001	0,003	0,4
Nx	330,4 ± 6	$336,5 \pm 6,68$	345,9 ± 7,3	0,31			
reNG (g)							
Kontrolle	1,07 ± 0,05	1,16 ± 0,04	1,2 ± 0,03	0,08			
Nx	1,56 ± 0,07	1,58 ± 0,04	1,77 ± 0,04	0,02	0,02	0,05	1,00
reNG/KG (mg/g)							
Kontrolle	3,25 ± 0,1	$3,35 \pm 0,08$	3,15 ± 0,1	0,29			
Nx	4,74 ± 0,23	4,71 ± 0,1	5,22 ± 0,13	0,07			
HG (g)							
Kontrolle	1,08 ± 0,03	$0,97 \pm 0,02$	0,96 ± 0,06	0,08			
Nx	1,07 ± 0,03	$0,98 \pm 0,02$	$0,85 \pm 0,02$	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,03
HG/KG(mg/g)							
Kontrolle	3,19 ± 0,05	2,81 ± 0,25	2,5 ± 0,13	<0,0001	0,02	0,22	<0,0004
Nx	$3,24 \pm 0,08$	$2,93 \pm 0,05$	$2,45 \pm 0,05$	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,006
PKrea (µmol/l)							
Kontrolle	35,26 ± 1,8	36,0 ± 2,3	39,7 ± 0,6	0,14			
Nx	45,7 ± 1,6	45,53 ± 1,6	56,1 ± 2,6	0,001	0,004	0,003	1,00
PHs (mmol/l)							
Kontrolle	6,74 ± 0,63	8,22 ± 0,47	9,2 ± 0,27	0,004	0,003	0,45	0,12
Nx	9,35 ± 0,57	9,08 ± 0,41	16,2 ± 1,15	<0,0001	<0,0001	<0,0001	1,00
KreaCl (ml/min*100g)							
Kontrolle	0,36 ± 0,05	$0,38 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,02$	0,06			
Nx	$0,26 \pm 0,04$	0,31 ± 0,06	$0,32 \pm 0,02$	0,56			

Tab. 4 Phänotypische Charakterisierung der Stämme SHR, SHR-8^{MWF} und MWF der Kontrollund Nx-Gruppe in der 24. Woche.

KG, Körpergewicht; reNG, rechtes Nierengewicht; HG, Herzgewicht; PKrea, Plasma Kreatinin; PHs, Plasma Harnstoff; KreaCl, Kreatinin-Clearance; MWF, Munich Wistar Frömter; SHR, spontaneously hypertensive rat
4 Diskussion

Die MWF-Ratte stellt ein klinisch interessantes Tiermodell zur Identifizierung genetischer Faktoren dar, die zur Ausprägung verschiedener Krankheitsphänotypen führen. In früheren Studien wurde ein angeborenes Nephrondefizit bei diesem Rattenstamm festgestellt, sowie eine frühe Entwicklung der Albuminurie, die im Alter einen progressiven kontinuierlichen Anstieg erfährt. Die fortschreitende Albuminurie führt zu strukturellen und funktionellen Nierenschädigungen wie Glomerulosklerose, renaler interstitieller Fibrose und tubulointerstitieller Schädigung (Fassi et al., 1998; Rothermund et al., 2006; Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003; Schulz et al., 2008). Das Krankheitsbild der Albuminurie kann eine generalisierte vaskuläre endotheliale Schädigung reflektieren. Die endotheliale Schädigung führt durch die verminderte Produktion von NO zu oxidativen Stress, was einen weiteren Verlust von NO nach sich zieht. Oxidativer Stress führt über eine verminderte Vasodilatation zu Erhöhung des Blutdrucks (Manning et al., 2005).

In früheren Arbeiten gelang es der Arbeitsgruppe, eine verminderte NO-Produktion beim MWF-Rattenstamm nachzuweisen (Gschwend et al., 2002) und auf RNO6 und RNO8 der MWF-Ratte wichtige QTL für die Albuminurie zu detektieren (Schulz et al., 2007; Schulz et al., 2008). Über die Züchtung konsomer Ratten wurden die statistisch erfassten QTL verifiziert. Im kranken MWF-Stamm wurden RNO6 bzw. RNO8 durch die Chromosomen des nierengesunden und Albuminurie-resistenten SHR-Stammes ausgetauscht. Die so gezüchteten konsomen Stämme MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} zeigten eine signifikant niedrigere Albuminurie, verminderte Nierenschädigung. Die sowie eine Zählung der Gesamtglomerulizahl der Nieren erfolgte durch den Kooperationspartner Prof. Dr. Jens Nyengaard, Aarhus University, Aarhus, Dänemark mit der "Physikal fraktionator"-Technik (Schulz et al., 2003; Schulz et al., 2007; Schulz et al., 2008) und ergab, dass das Nephrondefizit im konsomen Stamm MWF-6^{SHR} im Gegensatz zum konsomen Stamm MWF-8^{SHR} völlig eliminiert werden konnte.

Das Züchten konsomer Stämme bietet eine bedeutende Möglichkeit genetische Ursachen von Erkrankungen zu ermitteln. Da ein oder mehrere genetische Faktoren durch einen Chromosomenaustausch nicht mehr zur Verfügung stehen, können mögliche protektive Effekte oder maligne Interaktionen im neuen genetischen Hintergrund beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der reziproke Transfer des RNO6 bzw. RNO8 vom kranken MWF-Stamm in den Albuminurie-resistenten SHR-Stamm als Versuchsansatz gewählt. Über diese reziproke methodische Vorgehensweise ist es schwieriger einen Phänotypen zu induzieren (Rapp 2000). Durch den isolierten Austausch eines Chromosoms können Interaktionen mit anderen Allelen und verschiedenen Pathways wegfallen, die zur Induktion und Regulierung des Phänotypens beitragen. Aufgrund der sehr überzeugenden Ergebnisse,

die die konsomen Stämme MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} lieferten (Schulz et al., 2007; Schulz et al., 2008), war es in dieser Dissertation von großem Interesse, den Einfluss der auf RNO6 und RNO8 detektierten QTL isoliert zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezüchtet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden innerhalb der 6 bzw. 18 Wochen des Versuchsprotokolls die Tiere über den NO-Inhibitor L-NAME einer chronischen NO-Blockade und durch eine unilaterale Nephrektomie einer ca. 50%igen Glomerulireduktion unterzogen. In definierten Abständen wurde die Albuminausscheidung über den 24h Urin und der Blutdruck über die nicht direkte Tail-Cuff-Blutdruckmessung überprüft. Die abschließende direkte Messung des MAD und die Präparation zur Gewinnung von Organen und Plasma für weitere klinischchemische Untersuchungen, histologische Befunderhebungen und Expressionsanalysen komplettierten das Charakterisierungsschema.

4.1 L-NAME Studien A und B

Durch den Transfer von RNO6 in den isolierten SHR-Hintergrund konnte, entgegen der Erwartung, bei der Auswertung der Albuminbefunde für den konsomen Stamm SHR-6^{MWF} in der Kontroll-Gruppe keine Albuminurie im Altersverlauf bestimmt werden. Der Stamm entwickelte, in der 12. Woche in den Kontroll-Gruppen aus Studie A bis zur 24. Woche und Studie B bis zur 12. Woche, niedrigere Albuminwerte verglichen mit SHR, die in der 18. Woche der Studie A sogar als signifikant niedriger bestimmt werden konnten. Diese Ergebnisse demonstrierten, dass die MWF-Allele des QTL auf RNO6 (Schulz et al., 2007) isoliert nicht in der Lage sind, eine Albuminurie zu induzieren. Eine mögliche Erklärung bietet die Theorie der antagonistischen Epistatik. Krankmachende Mutationen im Genom können über Interaktionen mit anderen Genen einen gegenteiligen oder keinen Effekt auslösen (Desai et al., 2007). Im Gegensatz dazu konnte beim konsomen Stamm SHR-8^{MWF} in beiden Studien in der Kontroll-Gruppe die spontane Entwicklung einer Albuminurie festgestellt werden. In Studie A, mit dem Versuchsprotokoll bis zur 24. Woche, wurde darüber hinaus im Altersverlauf ein kontinuierlicher Anstieg der Albuminausscheidung beobachtet, die signifikant höhere Werte erreichte als bei SHR und SHR-6^{MWF}. Damit ist es erstmalig bei einem Rattenmodell gelungen, durch den Transfer des in dieser Studie isolierten RNO8 aus MWF in den Albuminurie-resistenten SHR-Hintergrund den Phänotyp der Albuminurie zu induzieren. Die Induktion einer Krankheit in einem gesunden Tiermodell über den reziproken Transfer eines einzigen QTL ist weitaus schwieriger und für die Entwicklung einer Albuminurie bislang nicht literaturbekannt. Für SHR-6^{MWF} konnte auch in der Nx-Gruppe, trotz einer 50%igen Nepronreduktion, keine Albuminurie im Altersverlauf induziert werden. SHR-8^{MWF} demonstierte in der Kontroll-Gruppe der Studie B in der 12. Woche die spontane Entwicklung einer Albuminurie mit signifikant höheren Werten gegenüber SHR.

Die Ergebnisse der L-NAME-Gruppen aus Studie A und B stellten sich als sehr kontrovers dar. Der konsome Stamm SHR-6^{MWF} zeigte einen sprunghaften Anstieg der Albuminwerte in der 12. Woche, welche von einer sehr starken Varianz innerhalb der Tiere gekennzeichnet war. In Studie A konnte eine Zwei-Gruppen-Bildung beobachtet werden. In der ersten Gruppe zeigten die Tiere sehr hohe Albuminwerte in der 12. Woche und verstarben plötzlich in der darauffolgenden 13. Woche. In der zweiten Gruppe zeigte sich eine leicht zeitversetzte Pathophysiologie. Diese Tiere wiesen in der 12. Woche noch wesentlich niedrigere Werte auf, die jedoch in der darauffolgenden Woche sprunghaft anstiegen. Auch diese Gruppe verstarb daraufhin vollständig mit einer einwöchigen Verzögerung in der 14. Woche. Komplikationen dieser Art als Reaktion auf eine chronische L-NAME Gabe sind bereits aus früheren Studien mit konsomen Tieren der F1-Generation von FHH/ACI bekannt. Diese Tiere wurden durch eine Rückkreuzung mit der hypertonen, Proteinurie-kranken Fawn-hooded (FHH/EUR) Ratte und der normotonen, nicht Proteinurie-kranken August Copenhagen Irish (ACI/EUR) Ratte gezüchtet (Van Dokkum et al., 1998). Allerdings entwickelten auch SHR-Tiere in Studie A eine L-NAME Sensitivität, die verzögert ab der 15. Woche die Tierzahl um 50 % reduzierte, in der 18. Woche waren mehr als 70 % der Tiere verstorben und in der 24. Woche endete die Studie mit einer Tieranzahl von n = 2. Diese Art der L-NAME-Sensitivität und Mortalität ist bei SHR-Ratten literaturbekannt. Daher werden in der Regel kurze Versuchprotokolle bei hohen L-NAME Dosierungen gewählt (Van Dokkum et al., 1998; Olzinski et al, 2005). Olzinski et al., stellte bei einer Dosierung von 50 mg/l L-NAME nach 2 Monaten Behandlung eine 100% Mortalität von SHR-Ratten fest. Die Behandlung führte, neben einem drastischeren NO-Mangel, zu mehr oxidativen Stress und könnte in Zusammenhang mit den beobachteten sehr hohen Blutdruckwerten stehen (Olzinski et al., 2005). Auf Grund dessen wurde die Konzentration im experimentellen Ansatz der vorliegenden Arbeit eine Zehnerpotenz niedriger gewählt, um so eine längere Untersuchungsperiode zu erreichen. Deng et al., konnte Blutdruckwerte von L-NAME behandelten SHR messen, die im Schnitt um 30-40 mmHg höher gegenüber der Kontroll-Gruppe lagen (Deng et al., 1998). Interessanterweise stellte sich bei der vorliegenden Arbeit weder bei MWF, noch bei dem konsomen Stamm SHR-8^{MWF} eine derartige Sterblichkeitsrate ein. Alle Tiere dieser beiden Stämme konnten bis zum geplanten Versuchsende in der 24. Woche mit L-NAME behandelt werden. Der SHR-8^{MWF}-Stamm zeigte in Studie A bis zur 24. Woche und Studie B bis zur 12. Woche zwar höhere Albumin-Werte unter L-NAME im Vergleich zur Kontrolle, aber eine derart dramatische Entwicklung wie sie bei SHR-6^{MWF} in der 12. Woche oder bei SHR in der 18. Woche zu beobachten war, blieb aus. MWF-Tiere zeigten in Studie A unter L-NAME eine signifikant stärkere Ausprägung der Albuminurie als die anderen drei Stämme, jedoch ohne jeglichen Tierverlust.

Die Tiere, Versuchsende die vor verstarben, entwickelten zentralnervöse Ausfallerscheinungen wie torti collis, Manegebewegungen und Hinterhandparesen. Diese Symptome lassen einen apoplektischen Insult vermuten, der oft in Zusammenhang mit Hypertonie auftritt (Carretero et al., 2000). Die Blutdruckbestimmung mittels Tail-Cuff-Methode zeigt für MWF aus Studie A signifikant niedrigere Werte in der Kontrollgruppe, als für die drei übrigen Stämme, wobei SHR-8^{MWF} in der 24. Woche keine signifikant höheren Blutdrücke mehr gegenüber MWF aufwies. Unter L-NAME konnten schon ab der 12. Woche für SHR-8^{MWF} und MWF signifikant niedrigere Blutdruckwerte gegenüber SHR und SHR-6^{MWF} festgestellt werden. Aufgrund der zuvor erwähnten Sterblichkeitsrate der SHR- und SHR-6^{MWF}-Tiere. konnten keine weiteren Daten mehr in Studie A erhoben werden.

SHR-Ratten leiden unter erhöhtem oxidativen Stress, also einem Ungleichgewicht zwischen der Produktion von Sauerstoffradikalen und der Fähigkeit des biologischen Systems diese zu verstoffwechseln, welcher vermutlich eine Rolle bei der Entstehung der Hypertonie spielt. Aus der Niere stammende Sauerstoffradikale können NO inaktivieren, welches wichtige Aufgaben zur renalen Blutdruckregulation erfüllt. NO verhindert die tubuläre Resorption von Natrium und hemmt den tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus. Eine NO-Inaktivierung kann zur exzessiven Natriumreabsorption führen und den tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus stimulieren, dies führt zur Vasokonstriktion der Arteriolen und damit zur Blutdruckerhöhung. Eine NO-Inaktivierung mit Superoxid-Anionen (O₂⁻) bildet Peroxinitrit, welches Tyrosinreste nitrolysieren kann, dies wiederum schädigt das Gewebe und die Niere (Manning et al., 2005). Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die hohe Sterblichkeit von SHR und SHR-6^{MWF} mit der starken Blutdruckerhöhung in Zusammenhang stehen könnte. Die Entwicklung der Albuminurie bei SHR könnte eine Folge der Hypertonie sein. Für SHR-6^{MWF} können zusätzlich genetische Faktoren in Betracht gezogen werden, die durch den Transfer von RNO6 nicht mehr gehemmt oder neu aktiviert wurden.

Um weitere aussagekräftige Daten erheben zu können, wurde die L-NAME Gabe in Studie B wiederholt. Eine verminderte Tieranzahl wurde bis zur 12. Woche untersucht, da sich aufgrund der Kaplan-Meier-Analyse der Übergang von der 12. zur 13. Woche als kritischer Zeitpunkt für SHR-6^{MWF}-Tiere darstellte. Zur Komplementierung der Ergebnisse wurde ebenfalls eine Kontroll-Gruppe bis zur 12. Woche mitgeführt. Studie B konnte die Ergebnisse aus Studie A verifizieren. In der Kontroll-Gruppe blieben die Albuminwerte von SHR-6^{MWF} unter den Werten von SHR. Beide Stämme lagen signifikant niedriger im Vergleich zu MWF. Im Gegensatz dazu entwickelte SHR-8^{MWF} erneut eine spontane Albuminurie. Hierüber konnte zunächst konfirmiert werden, dass der QTL auf RNO8 einen vom übrigen Genom der MWF-Ratte unabhängigen Einfluss auf die Entstehung der Albuminurie ausübt. In der L-NAME-Gruppe der Studie B konnte bei den SHR-6^{MWF}-Tieren erneut eine sehr hohe Variabilität der Albumineinzelwerte beobachtet werden. Es kristallisierte sich in dieser Studie wiederum eine Zweigruppen-Bildung von Tieren mit außerordentlich hohen Werten und

Tieren, die zum selben Zeitpunkt noch keinen Albuminurie-Phänotyp zeigten, heraus. Der konsome Stamm SHR-8^{MWF} demonstrierte dieses Verhalten nicht. Der Tail-Cuff-Blutdruck der SHR-6^{MWF}-Kontrolltiere war signifikant erhöht verglichen mit SHR. Unter L-NAME stellten sich die Blutdruckwerte von SHR und SHR-6^{MWF} ähnlich dar. In der Versuchsgruppe bis zur 12. Woche (Studie B) wurde eine direkte Blutdruckmessung über den Femoralisverweilkatheter vorgenommen und der MAD bestimmt. Die konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} lagen in der Kontroll- und L-NAME Gruppe intermediär der Parentaltiere, mit Tendenz zu SHR. Bei MWF konnten in beiden Gruppen signifikant niedrigere Blutdruckwerte verglichen mit den anderen drei Stämmen bestimmt werden. Bei der Auswertung des linksventrikulären Gewichtes verhielten sich SHR-6^{MWF}-Tiere in beiden Gruppen der Studie B wie MWF, der MAD allerdings demonstrierte eine deutliche Tendenz zu SHR. SHR-8^{MWF} zeigte signifikant höhere Gewichte des linken Ventrikels gegenüber MWF, diese Ergebnisse passen zum MAD und den Tail-Cuff-Werten. Eine Hypertrophie des linken Ventrikels kann ein Indiz für systolischen Bluthochdruck sein. In diesem Fall handelte es sich um einen adaptiven Kompensationsmechanismus, um den Druck und die dadurch entstehende Wandspannung auszugleichen (Akintunde et al., 2010).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Blutdruckerhöhung für SHR-6^{MWF} nicht allein die Ursache der Albuminurieentwicklung sein kann, da SHR höhere Blutdrücke im Studienverlauf B entwickelte, aber deutlich niedrigere Albuminwerte in der 12. Woche detektiert werden konnten. Möglicherweise hängt die über L-NAME induzierte und stark ausgeprägte Albuminurie bei SHR-6^{MWF} nicht mit den auf RNO6 bei MWF identifizierten und konfirmierten QTL für eine Albuminurie zusammen (Schulz et al., 2003; Schulz et al., 2007), sondern weist auf einen zweiten QTL hin. Ob dieser mit dem QTL für Albuminurie kolokalisiert ist und dieselben Kandidatengene für beide Phänotypen verantwortlich sind, müssen spätere Untersuchungen zeigen.

In Studie B bis zur 12. Woche konnten weitere Daten erhoben werden, die Hinweise auf eine Nierenschädigung geben können. Die Messung der glomerulären Filtrationsrate ist eine nachhaltig adäquate Methode zur Überprüfung der Nierenfunktion. In der nahen Vergangenheit wurden sensitivere Marker zur Überprüfung der GFR und der Funktionseinheit Niere als Kreatinin oder Kreatinin-Clearance etabliert. Cystatin C stellt sich als ein solch sensitiverer Nierenfunktionsmarker dar. Im Unterschied zum Kreatinin ist die Cystatin C-Konzentration auch bei der Ratte nicht abhängig von Muskelmasse, Nahrungsgewohnheiten oder tubulärer Sekretion (Andersen et al., 2009). Die Cystatin C-Bestimmung im Plasma des konsomen Stammes SHR-6^{MWF} in der Kontrollgruppe zeigte signifikant niedrigere Werte verglichen mit SHR, SHR-8^{MWF} und MWF. In der L-NAME-Gruppe konnte jedoch ein 50%iger Anstieg der Cystatin C-Konzentration bei SHR-6^{MWF} im Plasma nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine verminderte GFR durch Nierenschäden hin (Miyagawa et al., 2009). Weitere Befunde, die Hinweise auf eine Nierenfunktionsstörung

geben, wurden auf Expressionsebene erhoben und über eine Realtime-PCR überprüft. Ngal ist eines von 7 literaturbekannten Genen, welches nach einem akuten Niereninfarkt um das mehr als 10fache in der Expression hochreguliert wird (Mishra et al., 2003). In neuen Studien wurde gezeigt, dass Ngal nicht nur bei der akuten Nierenschädigung vermehrt exprimiert wird, sondern auch bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen detektiert werden kann (Chaudhary et al., 2010). Damit erwies sich dieser Biomarker als geeignet für das MWF- Tiermodell. In der Kontroll-Gruppe der Studie B konnte bei allen vier Stämmen nur eine geringe Expression von Ngal im Nierengewebe ohne signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass MWF trotz hoher Albuminwerte bis zur 12. Woche noch milde strukturelle Nierenschäden in diesem jungen Alter aufweist, die sich nicht wesentlich von denen des Albuminurie-resistenen SHR-Stammes unterscheiden. Im starken Kontrast dazu steht die L-NAME-Gruppe der Studie B. Hier konnte eine signifikant höhere Expression von Ngal bei SHR, SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Interessant ist, dass beide konsome Stämme Ngal höher gegenüber den parentalen Stämmen exprimierten. SHR-6^{MWF}-Tiere demonstrierten signifikant die höchsten Werte gegenüber den übrigen Stämmen. Diese Ergebnisse passen für den SHR-6^{MWF}-Stamm sehr gut ins Gesamtbild. Die Ergebnisse der Albuminbestimmung dieses Stammes deuteten bereits stark auf eine Funktionseinschränkung der Nieren hin. Durch die Ergebnisse der Cystatin C- und Ngal-Bestimmung konnte diese Vermutung weiter gefestigt werden. Die lichtmikroskopische Sichtung und die Beurteilung der histologischen Befunde schlossen sich den vorhergehenden Untersuchungen an. Für die Kontroll-Tiere der Stämme SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF konnten nur geringe bis keine Schädigungen des Tubulus festgestellt werden. Unter L-NAME-Gabe wurden für SHR und MWF nur milde oder gar keine Veränderungen beobachtet. Die konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} entwickelte in der L-NAME Gruppe signifikant erhöhte Schädigungswerte gegenüber der Kontrolle. Interessanterweise konnte bei der Überprüfung des Glomerulosklerose-Indexes unter L-NAME bei keinem der untersuchten Stämme eine signifikante Verschlechterung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden, wobei der konsome Stamm SHR-6^{MWF} auch auf histologischer Ebene eine zwei Gruppen-Bildung demonstrierte (siehe Abb. 24). MWF-Tiere der Kontroll-Gruppe wiesen, trotz Albuminurie und angeborenem Nephrondefizit, signifikant weniger sklerotische Veränderungen im Glomerulum gegenüber SHR und den konsomen Tieren auf. Es existieren verschiedene Substämme der SHR-Ratte, einige neigen zur Entwicklung von Nierenschäden, während andere resistent sind (Dmitrieva et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die Nephropathie bei diesen verschiedenen Substämmen unabhängig vom Blutdruck entsteht. Möglicherweise weist SHR in der 12. Woche eine größere Empfänglichkeit für die Entwicklung von strukturellen Nierenschäden auf als MWF, was die Vermutung nahe legt, dass die Entwicklung einer Glomerulosklerose nicht mit einer Albuminurie und reduzierten Nephronanzahl in Zusammenhang stehen muss (Esposito et al., 1999). Ältere MWF-Tiere entwickeln aber in der 24. Woche, neben einer stark ausgeprägten Proteinurie, auch eine deutliche Glomerulosklerose (Fassi et al., 1998). Es ist bekannt, dass SHR-Tiere bei chronischer L-NAME-Verabreichung durch die **NO-Inhibition** eine deutliche entwickeln, welche mit einer gesteigerten Proteinurie einhergeht. Glomerulosklerose Ono et al., konnten darüber hinaus eine gesteigerte Apoptose glomerulärer Zellen beobachten, die mit einer Abnahme der Glomerulianzahl vergesellschaftet war (Ono et al., 2001). Die gesteigerte Apoptose kann drei mögliche Ursachen haben, zum einen der stark erhöhte Blutdruck auf die Glomeruli nach Gabe des NO-Inhibitors L-NAME, welcher den renalen vaskulären Wiederstand erhöht, die lokale Induktion des renalen RAAS (Ang II induziert Apoptose), und/oder die Inhibition von NO, welches einer Apoptose unter Normalbedingungen entgegenwirken kann (Ono et al., 2001). Trotz höherer Blutdrücke der SHR entwickelte dieser Stamm eine schwächere Albuminurie und geringere strukturelle Nierenschäden in der L-NAME Gruppe als der konsome Stamm SHR-6^{MWF}. Wohingegen unter Kontrollbedingungen die SHR-6^{MWF} deutlich nierengesünder im Vergleich zu SHR waren. Die Theorie eines möglicherweise auf RNO6 existenten QTL, dessen Phänotyp durch oxidativen Stress ausgelöst wird, scheint damit nicht unwahrscheinlich.

Wissenschaftliche Untersuchungen der letzten Jahre demonstrierten, dass oxidativer Stress eine wichtige Rolle in der Hypertonie-Entwicklung spielt (Manning et al., 2005). Mehrere Studien haben gezeigt, dass induzierter oxidativer Stress zu Bluthochdruck führen kann oder in experimentellen Bluthochdruckmodellen den Blutdruck weiter erhöht (Manning et al., 2005). Darüber hinaus kann renaler oxidativer Stress zu Nierenschäden führen (Manning et al., 2005). Experimenteller NO-Abbau ist mit Blutdruckerhöhung und vermehrtem oxidativem Stress im Nierenkortex vergesellschaftet. Ist das Redox-Gleichgewicht zerstört, entsteht ein Überhang von Sauerstoffradikalen und es kann zu lokalen Entzündungen und interstitieller Fibrose kommen (Wesseling et al., 2007). Die Niere spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Blutdrucks. Kortex und Medulla sind gleichermaßen an der Steuerung beteiligt. Im Kortex findet der tubuloglomeruläre Feedback-Mechanismus statt, der ebenfalls einen Beitrag zur NO Antwort leistet und die Medulla sorgt für die druckinduzierte Natriurese. Extrazelluläre Stimuli, die in den Endothelzellen zu einer vermehrten eNOS-Aktivität führen, sind entweder biochemischer oder mechanischer Natur. Die wichtigste mechanische Kraft, die auf die Endothelzellen wirkt, ist die Schubkraft des strömenden Bluts, auch "mechanischer Stress" genannt. Zur Kompensierung des "mechanischen Stresses" wird vermehrt NO gebildet. In vivo konnte die Erhöhung des Blutdrucks und eine vermehrte NO-Freisetzung als Antwort auf die erhöhte Wandspannung nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen und die Hochregulation des NO-Pathways in hypertonen Tiermodellen legt die Vermutung nahe, dass NO vermehrt bei Bluthochdruck synthetisiert wird (Llorens et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde über die NO-

Inhibition ein wichtiger Mechanismus zur Gegenregulation des oxidativen Stresses blockiert. Dies lässt vermuten, dass es über die Blutdruckerhöhung zur Entwicklung von Nierenschäden und daraus folgend zur Albuminurie kommen könnte. Da aber weder SHR noch SHR-8^{MWF} trotz hoher Blutdrücke eine derart hohe Albuminentwicklung mit darauffolgender Sterblichkeit zeigten, ist es nicht unwahrscheinlich, dass eine genetische Ursache, die über L-NAME induziert wurde, eine Rolle spielen könnte. Ist das Endothel bei gleichzeitiger NOS-Hemmung einem hohen "mechanischen Stress" ausgesetzt, so wird die Modulation verschiedenster Gene verhindert (Braam et al., 2005). Wesseling et al., konnten in einem Versuchsprotokoll mit N^G-nitro-L-arginin (L-NNA) als NO-Inhibitor zeigen, dass experimenteller NO-Mangel bei Ratten neben Bluthochdruck, erhöhtem oxidativen Stress im Nierenkortex und Proteinurie auch zu komplexen Störungen bei antioxidativen Systemen führt, insbesondere bei der Glutathion- (GSH) und Bilirubin-Synthese (Wesseling et al., 2007). Nach NO-Inhibition nahm die Genexpression der regulatorischen und katalytischen Untereinheit von GCL (Glutamat-Cystein-Ligase), dem geschwindigkeits bestimmenden Enzym der GSH-Synthese drastisch ab, dies trug zu einer fortschreitenden Nierenschädigung bei. Wesseling et al. nahmen an, dass eine physiologische NO-Produktion die GSH-Synthese aus glatten Muskelzellen und Endothelzellen des Nierenkortex induziert (Wesseling et al., 2007). Möglicherweise spielt im vorliegenden NO-Inhibitions-Modell die verminderte Glutathion-Synthese als Antioxidans eine Rolle bei der progressiven Entwicklung der Albuminurie des SHR-6^{MWF}-Stamms. NO induziert das Enzym GCL und erhöht die GSH-Konzentration. Bluthochdruck ist in SHR mit einem erhöhten oxidativen Stress assoziiert. GSH spielt eine zentrale Rolle für den Schutz der Zellen vor oxidativem Stress und damit ist eine ausreichende Synthese von entscheidender Bedeutung in der Hypertonie. L-NAME verringert die GCL-Aktivität signifikant und führt zur generalisierten endothelialen Dysfunktion. Chronische L-NAME Gaben spiegeln sich nicht nur durch erhöhten Blutdruck wieder, sondern auch durch kardiovaskuläre und renale Schädigungen (Levonen et al., 2000). In wie weit die Blockierung der GSH-Synthese im vorliegenden konsomen Stamm SHR-6^{MWF} für die dramatischen Entwicklungen der Nierenschäden verantwortlich sind, bleibt festzustellen. Da MWF unter endothelialer Dysfunktion leidet (Gschwend et al., 2002) und SHR per se durch hohen Blutdruck möglicherweise vermehrtem oxidativen Stress ausgesetzt ist (Olzinski et al., 2005), könnte durch den Austausch des RNO6 Geninteraktionen aufgetreten sein, die sich potenzierten und zu dem vorliegendem Phänotypen führten. Zukünftig könnten Microarray-Analysen weiteren Aufschluss auf differenziell exprimierte Gene in diesem Zusammenhang geben.

Der QTL auf RNO6 umfasst eine Größe von ca. 18 cM, das entspricht etwa 720 Genen. Über vergleichende Genomanalysen konnte für den QTL auf RNO6 beim Menschen die syntäne Region auf Chromosom 14q23.1 bis 14q31.3 bestimmt werden. Diese Region enthält bei der Ratte ca. 150 kartierte Gene (Schulz et al., 2007). Kandidatengenanalysen in Assoziationsstudien, die renale Charakteristika bezogen auf die Hypertonie untersuchten, konnten gemeinsame Proteine oder Peptide identifizieren, die unter anderem das RAAS, das adrenerge System, oxidativen Stress, Entzündungsprozesse, die Regulierung der extrazellulären Matrix, die Fibrinolyse, den Fettstoffwechsel und natriuretische Peptide betrafen (Martinez et al., 2010).

4.2 Nx Studie

Die 3. Versuchsgruppe der vorliegenden Studie wurde nach der unilateralen Nephrektomie in der 6. Woche über 18 Wochen phänotypisch charakterisiert. SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF zeigten im Altersverlauf unter Nx erhöhte U_{Alb} Werte gegenüber der Kontrolle. Die Werte des konsomen Stamms SHR-6^{MWF} in der 18. und 24. Woche waren signifikant niedriger gegenüber SHR. Dies bestätigt das RNO6 nicht in der Lage ist, isoliert eine Albuminurie zu induzieren und dass der Transfer zur antagonistischen Epistatik führt (Desai et al., 2007). Die MWF-Allele auf RNO6, die im Zusammenhang mit der Albuminurie stehen, werden vom SHR-Genom nicht nur gehemmt, sondern es scheinen reziproke Mechnismen ausgelöst zu werden. Nach 50% iger Reduktion der Glomeruli im konsomen SHR-6^{MWF}-Stamm konnten niedrigere Albuminwerte im Vergleich zu SHR festgestellt werden. Yagil et al., konnte in SBH/y- und SBN/y-Ratten ebenfalls auf RNO6 ein protektives QTL für die Proteinurie nach Nx feststellen (Yagil et al., 2010). Möglicherweise kommt es im vorliegenden Tiermodell von MWF durch Interaktionen mit dem SHR-Hintergrund zu ähnlich protektiven Effekten. Da auch eine Reduzierung der Nephronanzahl von 50% nach unilateraler Nephrektomie den Phänotyp der Albuminurie nicht induzierte, wurden im weiteren Untersuchungsverlauf keine weiteren Daten des konsomen Stamms SHR-6^{MWF} erhoben. SHR-8^{MWF} dagegen zeigte bereits unter Kontrollbedingungen in den L-NAME Studien A und B spontan eine Albuminurie. Während MWF unter Nx eine Verdoppelung der Albuminwerte verglichen mit der Kontrolle demonstrierte, konnte bei SHR-8^{MWF} eine knappe Verdreifachung der Albuminausscheidung detektiert werden. Der Albumin-resistente SHR-Stamm entwickelte unter unilateraler Nephrektomie analog zur Kontrollgruppe nur eine milde Albuminurie. Es ist fraglich, ob diese Ergebnisse blutdruckabhängig sind oder ob es sich um einen rein genetisch regulierten Mechanismus handelt. Während SHR-8^{MWF} unter Kontrollbedingungen bei der Tail-Cuff-Blutdruckmessung nur geringfügig niedrigere Werte als SHR aufwies, konnten unter Nx in der 18. und 24. Woche signifikant niedrigere Werte gemessen werden. SHR-6^{MWF} verhielt sich in beiden Gruppen im Altersverlauf wie SHR, obwohl bei diesem Stamm niedrigere Albuminwerte bestimmt werden konnten. Im Gegensatz dazu entwickelte MWF über den Untersuchungszeitraum, trotz signifikant höherer Albuminwerte gegenüber den übrigen Stämmen, nur eine milde Hypertonie, die signifikant niedriger gegenüber SHR war. Der direkt gemessene MAD in der 24. Woche zeigte für SHR-8^{MWF} in der Nx-Gruppe deutlich niedrigere Blutdruckwerte im Vergleich zu SHR, die jedoch nicht signifikant waren. Die Ergebnisse des linksventrikulären Gewichts passen zu den erhobenen Daten der Blutdrücke. SHR-8^{MWF} lag in der Kontroll- und der Nx-Gruppe signifikant zwischen den Parentaltierstämmen mit niedrigeren Gewichten des linken Ventrikels gegenüber SHR. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei SHR-8^{MWF} um eine blutdruckunabhängige Entwicklung der Albuminurie handelt. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass der bei MWF auf RNO8 lokalisierte QTL (Schulz et al, 2008) eine wesentliche Rolle bei der Albuminurieentwicklung spielen muss. Es ist hiermit zum ersten Mal gelungen, durch einen reziproken Transfer eines einzigen Chromosoms in den isolierten Albuminurie-resistenten Hintergrund von SHR unter Kontrollbedingungen eine Albuminurie zu induzieren.

Interessanterweise konnte bei der Überprüfung von Cystatin C im Plasma für SHR-8^{MWF} kein Unterschied zur Konzentration gegenüber SHR ermittelt werden. Beide Stämme verhielten sich hier gleich, während bei MWF signifikant höhere Plasmakonzentrationen in beiden Gruppen bestimmt werden konnten. Van Dokkum et al. beschrieben in ihrer Arbeit, dass keine Korrelation zwischen Proteinurie und GFR in den Versuchsgruppen mit unilateraler Nephrektomie und unter L-NAME Gabe und ACE Inhibitor festzustellen war. Weiter wurde festgestellte, dass Veränderungen in der glomerulären Permeabilität zur Entwicklung einer Proteinurie führen können, während die GFR bei verschiedenen Nierenerkrankungen innerhalb des Normbereichs verbleiben kann. Das Fortbestehen der Proteinurie, bei normaler GFR stellt einen unabhängigen Risikofaktor für Nierenversagen dar (van Dokkum et al., 2000). Um diese Hypothese weiter zu verfolgen, wurde über die Realtime-PCR die Genexpression von Ngal, Kim-1 und Col3 bestimmt. Bei der Beurteilung von Ngal konnte in den Kontroll-Gruppen für MWF eine signifikant höhere Expression gegenüber SHR festgestellt werden, währedn MWF unter Nx einen signifikanten Anstieg der Ngal Exprssion zeigte, konnte bei SHR und SHR-8^{MWF} kein Unterschied von Nx zur Kontrolle verzeichnet werden. Zu bemerken ist, dass sich SHR-8^{MWF} wie SHR verhielt. In früheren Studien der Arbeitsgruppe, in denen der reziproke Stamm MWF-8^{SHR} gezüchtet und phänotypisiert wurde, konnte bei der Überprüfung der Ngal-Expression eruiert werden, dass sich MWF-8^{SHR} wie MWF verhielt. Obwohl in diesem Stamm die Albuminurie signifikant verringert wurde, konnten dennoch signifikant höhere Werte bei Parametern erhoben werden, die auf eine Nierenschädigung hindeuten (Schulz et al., 2008).

Der Nierenfunktionsparameter Kim-1 wurde ursprünglich bei einem Genexpressionsvergleich zwischen gesunden und regenerierten Nieren nach Ischämie bestimmt (Rosner er al., 2009). Es wurde festgestellt, dass bei gesunden Nieren wenig bis gar keine Expression stattfindet, nach Ischämie die Expression aber dramatisch hochreguliert ist. Über immunhistologische Studien wurde Kim-1 in den Epithelzellen des proximalen Tubulus lokalisiert

(Rosner er al., 2009). Kim-1 und Ngal konnten über Microarray-Analysen und Realtime-PCR als Gene detektiert werden, die eine mögliche Rolle im Übergang von akuten zu chronischen Nierenschäden spielen (Ko et al., 2010). Die Kim-1 Expression war auf Nierenareale begrenzt, die Entzündungen, Fibrose oder tubuläre Schädigungen aufwiesen. Dies führte zu der Annahme, das Kim-1 in renale Schädigungen involviert sein könnte, die durch Proteinurie verursacht werden (van Timmeren et al., 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen von Kim-1 demonstrierten für SHR-8^{MWF} in der Kontroll-Gruppe signifikant höhere Werte gegenüber SHR und signifikant niedrigere gegenüber MWF. Unter Nx zeigte jedoch nur MWF eine signifikante Expressionserhöhung zur Kontrolle. Für SHR und SHR-8^{MWF} konnten nur geringe Veränderungen in der Nx-Gruppe festgestellt werden. Um eine bessere Basis für die Beurteilung der Ergebnisse zu erlangen, wurde Col3 als weiterer Nierenfunktionsmarker überprüft. Col3 ist ein Parameter für fibrotische Umbauvorgänge und einhergehenden Funktionsverluste der Niere. In früheren, nicht publizierten Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der SHR-Stamm eine signifikant niedrigere Col3-Expression verglichen mit MWF demonstrierte. Unter Kontrollbedingen auch in der 24. Woche Konnte bei MWF kein Expressionsunterschied zu SHR detektiert werden. In der Nx-Gruppe war dagegen ein hoch signifikanter Unterschied gegenüber SHR und SHR-8^{MWF} festzustellen. Während SHR unter Nx signifikant höhere Col3-Werte aufwies, so verhielt sich SHR-8^{MWF} unauffällig. Es konnte kein Expressionsunterschied zwischen der Kontroll- und Nx-Gruppe in diesem Stamm festgestellt werden. Die lichtmikroskopische Beurteilung der Nieren zeigte für MWF der Kontroll- und Nx-Gruppe einen signifikant höheren tubulointerstitiellen Schädigungsgrad gegenüber SHR und SHR-8^{MWF}. Während unter Kontroll-Bedingungen SHR-8^{MWF} signifikant mehr tubulointerstitiellen Schädigungen im Vergleich zu SHR demonstrierte, verhielten sich SHR und SHR-8^{MWF} unter Nx gleich, dennoch wurde ein signifikant höhere tubulointerstitieller Schädigungsgrad der beiden Stämme in der Nx Gruppe gegenüber den Kontroll Tieren ermittelt. Der Glomerulosklerose-Index zeigte in der Kontroll-Gruppe für SHR signifikant niedrigere Werte verglichen mit MWF. SHR-8^{MWF} Stamm lag hier intermediär Der konsome zwischen den beiden Parentaltierstämmen. Unter Nx allerdings verhielt sich SHR-8^{MWF} wie MWF und zeigte eine signifikant höhere Glomerulosklerose gegenüber SHR. Neben einer Albuminurie entwickelte sich nach der unilateralen Nephrektomie bei SHR eine Glomerulosklerose. Protektive Effekte, die unter Kontroll-Bedingungen trotz des hohen Blutdrucks diese Art des Funktionsverlusts unterbinden, konnten den 50% igen Verlust der Glomeruli nicht mehr kompensieren. Die Widerstandskraft der afferenten Arteriolen sinkt, so dass auf diese Weise der hohe Blutdruck ins Kapillarnetzwerk des Glomerulums weitergegeben wird (van Dokkum et al., 2000). Demzufolge ist RNO8 in der Lage eine Albuminurie zu induzieren, ohne jedoch die GFR zu verringern. Zur Klärung der genetischen Mechanismen, die mit RNO8 transferiert wurden, muss der glomeruläre Filtrationsapparat in seiner Gesamtheit betrachten werden. Der glomeruläre Filtrationsapparat setzt sich aus dem endothelialen Oberflächengewebe, den glomerulären endothelialen Fenstern, der glomerulären Basalmembran, den Podozytenfortsätzen und dem subpodozytären Raum zusammen (Salmon et al., 2009). Reife Podozyten verfügen über Zellausläufer, den sogenannten Fußfortsätzen, die die Kapillarschlingen der Glomeruli umfassen. Diese Fußfortsätze sind durch eine poröse Schlitzmembran miteinander verbunden und bilden mit der glomerulären Basalmembran die Filtrationsbarriere des Glomerulums. Podozyten sind mit Membranproteinen ausgestattet, die ihre Struktur aufrechterhalten und Nährstoffe aus dem glomerulären Filtrat zurückgewinnen. Die Podozytenform kann sich durch verschiedene extazelluläre Stimuli schnell und reversibel verändern. Ihre Zellmembran enthält Proteine, die das Zytoskelett der Fußfortsätze veranlassen, die Struktur beizubehalten oder zu modifizieren. Trotz ihrer offensichtlichen Bedeutung für die glomeruläre Funktion ist nur eine kleine Anzahl von Podozyten-Membranproteinen zur Zeit identifiziert, wie gp330/megalin, ein großer LDL-Rezeptor-abhängiger polyspezifischer Rezeptor, der die Aufnahme von Lipoproteinen durch den Podozyten reguliert. Ein anderes Beispiel ist Podocalyxin und p5 1. Weiter wurde das 43-kD große Membranprotein Podoplanin beschrieben, welches eine wichtige Rolle im Aufbau der Fußfortsätze innehat. Bei Podoplaninverlust flachen die Podozytenfortsätze ab und es kommt zur Proteinurie (Matsui et al., 1998). Dies zieht die Möglichkeit in Betracht, dass Podoplanin als Membranprotein ein Kandidat sein könnte, der die Podozytenform reguliert. Matsui et al., konnten diese Hypothese untermauern, indem Ratten mit einzelnen Injektionen von anti-IgG Podoplanin behandelt wurden, dies hatte eine reversible Abflachung der Fußfortsätze und die Entwicklung einer schweren Proteinurie zur Folge (Matsui et al., 1998). In der MWF-Ratte wurde über immunhistochemische Untersuchungen ein signifikanter Podoplaninverlust gegenüber der SHR-Ratte festgestellt al., 2007). Korrelationsstatistik zwischen Albuminentwicklung (ljpelaar et und Podozytenparameter ergaben eine positive Korrelation zwischen dem Grad der Albuminurie und dem prozentualem Podoplaninverlust im Glomerulum (Ijpelaar et al., 2007). Podozyten Bestandteile der glomerulären stellen wichtige Barriere dar, ihr Beitrag zur Flüssikeitsrestriktion und Proteintransport ist jedoch unklar. Es wird angenommen, das Podozyten der hohen transmuralen Spannung entgegenwirken, die durch den hohen Perfussionsdruck in den glomerulären Kapillaren entsteht (Pavenstädt et al., 2003). Des Weiteren tragen sie vermutlich entscheidend zu den Permeabilitätseigenschaften des glomerulären Filters bei (Pavenstädt et al., 2003). Möglicherweise übernehmen Podozyten auch bei der Reinigung des Filters eine entscheidende Rolle, es ist aber zurzeit nicht bekannt wie diese Reinigung ausgeführt wird (Pavenstädt et al., 2003). Ein Funktionsverlust der Podozyten kann die erste Stufe zur Entwicklung einer progressiven Nierenerkrankung sein, die zum totalen Nierenversagen führt (Pavenstädt et al., 2003). Podozyten spielen eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Albuminurie, auch wenn die Mechanismen zwischen glomerulärer Schädigung, Podozytenschädigung und Albuminurie nicht geklärt sind. Kürzlich konnte in Studien der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass RNO8 für einen Podopalninverlust bei MWF-Ratten verantwortlich ist (Ijpelaar et al., 2007). Durch den Transfer von RNO8 aus dem MWF- in den SHR-Hintergrund wurde dieser Podoplaninverlust im Glomerulum beobachtet, der sich in Form der Albuminurie niederschlägt, zum Podoplaninverlust wurden keine eindeutigen Hinweise auf eine verminderte GFR oder fibrotische Umbauvorgänge im SHR-8^{MWF}-Stamm detektiert. Während unter Kontroll-Bedingungen der TSI von SHR-8^{MWF} gegenüber SHR signifikant erhöht ist, zeigte sich unter Nx kein Unterschied zwischen diesen beiden Stämmen. Zur Theorie der glomerulären Schädigung passt das Bild der GSI, bei der für SHR-8^{MWF} unter Kontrolle höhere Werte im Vergleich zu SHR detektiert wurden. In der Nx-Gruppe zeigten SHR-8^{MWF} und MWF eine ausgeprägte Glomerulosklerose, die signifikant höher gegenüber SHR war. Kuhlmann et al. konnten zeigen, dass es durch eine unilaterale Nephrektomie zu einem signifikanten Podozytenverlust pro Glomerulum, mit gleichzeitiger Hypertrophie der verbleibenden Podozyten kommt (Kuhlmann et al., 2003). Es konnte festgestellt werden, dass durch die Gabe von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ (1,25(OH)2 D₃) Podozyten eine geringere Schädigung nach Nx aufwiesen und eine verminderte Albuminurie und Glomerulosklerose bestimmt werden konnten (Kuhlmann et al., 2003). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass sowohl ein angeborenes Nephrondefizit, als auch ein Podozytenverlust mit der Entwicklung einer Albuminurie und der Entstehung der Glomerulosklerose bei der MWF-Ratte in Zusammenhang stehen können. Wie die Arbeitsgruppe in vorherigen Studien demonstrierte, ist RNO6 für das Nephrondefizit und die histologische Veränderungen im Nierengewebe der MWF-Ratte verantwortlich (Schulz et al., 2003). RNO8 dagegen übt keinen Einfluss auf die untersuchten histologischen Parameter aus, da der Austausch durch das gesunde RNO8 aus SHR keine Veränderungen der TSI mit sich brachte (Schulz et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit, konnte jedoch durch den reziproken Austausch von RNO8 unter Kontrollbedingungen eine Erhöhung der TSI im konsomen Stamm im Vergleich zu SHR festgestellt werden. Diese Veränderungen kommen möglicherweise durch veränderte interaktionen von Genen zustande, die durch den transfer des kranken Chromosoms aus MWF in den SHR hintergrund aktiviert wurden.

Esposito et al. demonstrierten in Mäusen, dass die Entwicklung der Glomerulosklerose stammabhängig sein kann, da selbst Tiere mit 75%igen Verlust der Nephronen keine Glomerulosklerose entwickelten (Esposito et al., 1999). SHR-8^{MWF} demonstrierte in der vorliegenden Studie eine ähnliche Tendenz zur Glomerulosklerose wie MWF. Auf RNO6 konnte die Ursache eines angeborenen Nephrondefizits festgestellt werden (Schulz et al., 2007). Für RNO8 bleibt die Vermutung, den Grund für die Entstehung der Albuminurie und Glomerulosklerose bei einem möglichen Podozytenverlust zu suchen. Piecha et al. zeigte, dass nach Nephrektomie von Sprague-Dawley-Ratten diese eine erhöhte Glomerulosklerose entwickelten, die mit Albuminurie und Podozytenverlust pro Glomerulum einherging, bei

gleichzeitiger Hypertrophie der verbleibenden Podozyten (Piecha et al., 2008). Allerdings konnte in dieser Studie, im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, auch signifikante Blutdruckerhöhungen der Nx-Gruppe beobachtet werden (Piecha et al., 2008). Diese Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass RNO8 für die Entstehung der Albuminurie entscheidend verantwortlich ist. In wieweit Gene auf RNO8 zu einem Podozyten- bzw. Podoplaninverlust beitragen, muss in späteren Studien eruiert werden.

Yagil et al., untersuchten in SBH/y und SBN/y-Ratten die Hypothese, dass bei beiden Geschlechtern unterschiedliche Pathomechanismen der Entstehung der Proteinurie zugrundeliegen (Yagil et al., 2010). Die relativ große Anzahl von Kandidatengenen, die innerhalb jedes Geschlechts identifiziert wurden und die möglicherweise mit der Pathophysiologie der Proteinurie in Zusammenhang stehen, sind mit vielen weiteren molekularen Mechanismen verbunden. Kein Pathway war ausschließlich oder überwiegend mit der Entwicklung der Proteinurie assoziiert (Yagil et al., 2010). In männlichen und weiblichen unilateral nephrektomierten SBH/y konnten 4 Gene auf RNO20 detektiert werden, die verglichen mit Kontrollgruppen von SBH/y und SBN/y differenziell exprimiert wurden (Yagil et al., 2010). Tubb5 wurde im Glomerulum lokalisiert, C2 im Mesangium des Glomerulums und in proximalen Tubuluszellen, Ubd in tubulären Epithelzellen und Psmb8 im Glomerulum. Selbst die kleine Anzahl von Kandidatengenen, die in beiden Geschlechtern im Zusammenhang mit der Proteinurie stehen, scheinen bei einer Vielzahl von zellulären Funktionen einen Beitrag zu leisten, einschließlich der Zellstruktur, Immunität und Apoptose. Wie auch bei anderen komplexen Erkrankungen, scheinen mehrere Gene an der Entstehung der Proteinurie beteiligt zu sein, die jeweils über viele kleine Effekte mehrere pathophysiologische Vorgänge induzieren (Yagil et al., 2010).

Der auf RNO8 befindliche QTL weist eine Größe von ca. 45 cM auf und enthält rund 1800 Gene. Diese Region entspricht der syntänen Region auf Chromosom 15q22-15q25 des Menschen. Im angrenzendem Bereich dieser Region auf dem Abschnitt 15q26.3 wird eine Verknüpfung zur Albuminurie vermutet, die aber mit dem RNO8-QTL nicht kolokalisiert ist (Schulz et al., 2008).

Das Gen MYH9, auf Chromosom 22 beim Menschen identifiziert, steht in Verbindung mit der Entwicklung einer hypertensiven Nephropathie (Bostrom et al., 2010). Dieses Gen wird ebenfalls mit der Entstehung der Glomerulosklerose und Podozytenverlust in Verbindung gebracht (Bostrom et al., 2010). Polymorphismen von Podocin, alpha-Actinin-4 und TRPC6 scheinen zur Entwicklung einer Glomerulosklerose beizutragen (Bostrom et al., 2010). TRPC6 befindet sich bei der Ratte auf RNO8 randständig und liegt damit außerhalb des QTL während MYH9 auf RNO7 kartiert.

MYH9 allein induziert möglicherweise nicht eine signifikante Störung der Zytoskelettstruktur des Podozyten. Die Mutation von weiteren Zytoskelett-Komponenten kann erheblich zur Strukturschädigung der Podozyten und zur Beeinträchtigung seiner Funktion als Filtrationsbarriere beitragen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass durch den Transfer von RNO8 eine progressiv kontinuierlich ansteigende Albuminurie und die Entstehung von Glomerulosklerose induziert werden kann. Dies könnte u. a. mit einem Podozytenverlust assoziierte sein. Bei TRPC6 handelt es sich um ein interessantes Gen auf RNO8, dessen differenzielle Expression einen möglichen Aufschluss bezüglich potentielle des Zusammenhangs zwischen Glomerulosklerose und Podozytenverlust gibt. Wie oben beschrieben, wird MYH9 ebenfalls in Verbindung mit Glomerulosklerose und Podozytenverlust gebracht.

Aufgrund der Ergebnisse des hier untersuchten Tiermodells ist es möglich, dass diese Gene eine nicht unwichtige Rolle bei Geninteraktionen spielen, die möglicherweise zur Induktion der komplexen Mechanismen der Albuminurie führen. In weiterführenden Studien können über Realtime-PCR- oder Microarray-Analysen diese aus der Literatur bekannten Gene auf differenzielle Genepression analysiert werden, um so potentielle Kandidatengene auf RNO8 zu identifizieren bzw. zu bestätigen.

Mit Hilfe der für die Entwicklung einer Albuminurie konfirmierten Kandidatengene besteht die Möglichkeit, neue Therapieansätze zu schaffen, die gezielt in ursächliche Pathways eingreifen, um Genaktionen zu blockieren, die die Pathomechanismen der Albuminurie aktivieren.

5 Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der Albuminurie ist polygenetisch determiniert und geht mit renalen Endorganschäden und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko beim Menschen einher. Des Weiteren ist die Albuminurie als möglicher Prädiktor von arteriosklerotischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen in nicht-diabetischen Individuen bekannt und kann eine generalisierte vaskuläre endotheliale Schädigung reflektieren. Die primäre Hypertonie wiederum erhöht das Risiko, chronische Nierenerkrankungen zu entwickeln. Eine adaptive Reaktion auf erhöhten Blutdruck ist die vermehrte Stickstoffmonoxid (NO) Produktion, die präventiv gegen Endorganschäden vorbeugt. Ein Defizit oder Verlust von NO führt wiederum zu Bluthochdruck und Nierenschäden.

Die MWF-Ratte stellt ein genetisches Inzuchtmodell dar, das neben einem angeborenen Nephrondefizit von 30-50%, eine spontane Albuminurie, eine moderate Hypertonie und eine endotheliale Dysfunktion entwickelt. In vorangehenden Studien wurden wichtige Albuminurie-QTL (Quantitative Trait Loci) auf Rattenchromosom (RNO)6 und RNO8 identifiziert. Durch den Transfer von RNO6 und RNO8 aus dem nierengesunden SHR-Stamm in den isogenetischen MWF-Hintergrund konnte die Albuminurie jeweils deutlich gesenkt und die strukturellen Nierenschäden reduziert sowie das Nephrondefizit eliminiert werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu ermitteln, ob mittels eines reziproken Ansatzes QTL auf RNO6 und RNO8 in der Lage sind einen Albuminurie-Phänotyp im isolierten, albuminurieresistenten Hintergrund der SHR-Ratten zu induzieren. Um die Suszeptibilität von Nierenschäden zu untersuchen, wurde zwischen der 6. und 24. Woche (Studie A) eine Gruppe der Parentaltiere MWF und SHR und der konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} mit normalem Wasser (Kontrolle), eine zweite Gruppe mit 20 mg/l N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) behandelt und eine dritte Gruppe wurde unilateral nephrektomiert (Nx). Aufgrund einer hohen Letalität bei parentalen SHR und konsomen SHR-6^{MWF} unter L-NAME-Behandlung vor Erreichen der 24. Woche, wurde die Studie von der 6. - 12. Woche wiederholt (Studie B).

In der bis zur 24. Woche geführten Studie A zeigte sich, dass SHR und SHR-6^{MWF} eine ausgeprägte L-NAME Sensitivität mit Todesfolge entwickelten, während MWF und SHR-8^{MWF} die Behandlung mit dem NO-Inhibitor ohne Ausfälle tolerierten. Im Verlauf der Studie A demonstrierten SHR- und SHR-6^{MWF}-Tiere unter L-NAME Behandlung ein stark beeinträchtigtes Allgemeinbefinden das mit torti collis, Manegebewegung und hoher Mortalität zwischen der 12. und 15. Woche einherging. Der Parentalstamm MWF wie auch der konsome Stamm SHR-8^{MWF} zeigten hingegen keine Beeinträchtigung und tolerierten die L-NAME-Behandlung bis zum Studienende in der 24. Woche. MWF entwickelte bis zur 24. Woche in der Kontrollgruppe einen signifikanten progressiven Anstieg der Albuminurie

gegenüber den albuminresistenten SHR und den konsomen Stämmen SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF}. Der konsome Stamm SHR-8^{MWF} zeigte unter Kontrollbedingungen spontan einen signifikanten Anstieg der Albuminurie im Vergleich zu SHR. Die Stämme MWF und SHR-8^{MWF} entwickelten signifikant erhöhte Albuminurie-Werte in der L-NAME Gruppe verglichen mit der Kontrolle in der 24. Woche.

In der 12. Woche der Studie B konnten mit Studie A vergleichbare Ergebnisse der Albuminbestimmung generiert werden. SHR und SHR-8^{MWF} zeigten in Studie B erneut nur eine milde Erhöhung der Albuminurie gegenüber der Kontrollgruppe, während SHR-6^{MWF} und MWF eine signifikant höhere Albuminausscheidung gegenüber der Kontrolle demonstrierten. Durch den Transfer von RNO6 erhöhte sich nicht nur die Albuminausscheidung unter L-NAME im Vergleich zur Kontrolle für SHR-6^{MWF} und SHR, es entwickelte sich zudem eine hohe Variabilität der Einzelwerte im konsomen Stamm SHR-6^{MWF}. Durch den Transfer von RNO8 dagegen erreichte die Kontrollgruppe von SHR-8^{MWF} signifikant höhere Albuminwerte verglichen mit SHR. Desweiteren zeigten die konsomen Stämme SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} signifikant mehr tubulointerstitielle Schädigungen unter L-NAME gegenüber der Kontrolle, während SHR und MWF nur milde tubulointerstitielle Schädigungen unter L-NAME Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe entwickelten. Der systolische Blutdruck war bei SHR, SHR-6^{MWF} und SHR-8^{MWF} signifikant in der 12. Woche unter L-NAME-Behandlung verglichen mit der Kontrolle erhöht. Im MWF-Stamm konnte kein signifikanter Unterschied der Blutdruckwerte zwischen Kontroll- und L-NAME Gruppe ermittelt werden, jedoch zeigte dieser Stamm in beiden Gruppen signifikant niedrigere Blutdrücke gegenüber den übrigen drei Stämmen.

Für SHR-6^{MWF} konnte in der Kontroll- und Nx-Gruppe keine Albuminurie ermittelt werden. In der 18. und 24. Woche wurden dagegen unter Nx signifikant niedrigere Albuminwerte im Vergleich zu SHR bestimmt. Kontrastierend zeigte SHR-8^{MWF} unter Kontroll- wie auch unter Nx-Bedingungen eine spontane Albuminurieentwicklung, die signifikant höher gegenüber SHR war, während der Blutdruck in der Nx-Gruppe jedoch deutlich niedrigere Werte erreichte. Bei der histologischen Beurteilung der Niere wiesen SHR-8^{MWF}- und MWF-Tiere in der Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Glomerulosklerose im Vergleich zu SHR auf, während unter Nx nur MWF signifikant höhere Werte gegenüber SHR demonstrierte.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass MWF-RNO6 im isolierten SHR Hintergrund nicht in der Lage ist eine Albuminurie unter basalen Bedingungen bzw. unter 50%iger Reduktion der Glomeruli zu induzieren. Nach chronischer NO-Blockade wiesen SHR-Tiere trotz erhöhtem Blutdruck keine Albuminurie auf. Im Gegensatz dazu konnte beim konsomen Stamm SHR-6^{MWF} durch NO-Blockade ein Albuminurie-Phänotyp mit erhöhten Blutdruckwerten ermittelt werden. Diese Ergebnisse lassen neben dem konfirmierten QTL für Albuminurie auf RNO6 einen möglichen zweiten QTL vermuten, der durch die chronische NO-Blockade induziert wurde und unabhängig agiert. Im Gegensatz dazu tolerierten SHR-8^{MWF} und MWF die L-NAME-Behandlung während des gesamten Untersuchungszeitraums. In der vorliegende Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der isolierte Einfluss des QTL auf RNO8 eine spontane Albuminurie und Nierenschäden in einem nierengesunden Hintergrund wie dem des SHR-Stamms unter basaler als auch 50%iger Nephronreduktion induzieren konnte. Eine NO-Inhibition nahm hingegen keinen Einfluss auf den Phänotyp.

Die Ergebnisse belegen, dass unter NO-Inhibition ein oder mehrere Gene auf RNO6 zur Entwicklung der Albuminurie führen. RNO8 dagegen agiert völlig unabhängig von genetischen Faktoren des MWF-Hintergrunds und ist in die Entwicklung der Albuminurie und struktureller Nierenschäden im isolierten SHR-Hintergrund involviert.

In weiterführenden Studien soll die Pathophysiologie der Albuminurie und der Nierenschäden im MWF-Stamm weiter geklärt werden.

6 Summary Characterization of the genetic basis of albuminuria and renal damage in the Munich Wistar Frömter (MWF) rat.

Albuminuria is an important polygenetic quantitative trait indicating renal target organ damage and an increased cardiovascular risk in humans. Furthermore, primary hypertension is a risk factor for the development of albuminuria and chronic kidney disease. Elevated blood pressure values may lead to a compensatory increase in nitric oxide (NO) production, which protects against end organ damages. In contrast, a reduction in NO availability leads to higher blood pressure and kidney damage.

The Munich Wistar Frömter (MWF) rat is an inbred genetic model that develops spontaneous and progressive albuminuria, moderate hypertension, a congenital nephron deficit of 30-50%, and endothelial dysfunction. Previous studies showed that in MWF rats albuminuria development is determined by an interaction between multiple quantitative trait loci (QTL). Replacement of two major loci on rat chromosome 6 (RNO6) or 8 (RNO8) leads to a marked suppression of early onset albuminuria in these animals. The aim of this study was to test whether QTL on RNO6 and RNO8 are capable of inducing the albuminuria phenotype in albuminuria-resistant SHR rats after isolation from the permissive disease background in MWF. In order to analyse the susceptibility to renal damage, one set of parental MWF and SHR and the consomic strains SHR-6^{MWF} and SHR-8^{MWF} was treated with normal tap water (Sham), while a second set was treated with 20 mg/l N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) between 6 and 24 weeks of age, respectively, while a third set was unilaterally nephrectomised (Nx) (study A). Because of premature deaths of parental SHR and consomic SHR-6^{MWF} under L-NAME treatment before the scheduled end of the observation period at week 24, the study was repeated between 6 and 12 weeks of age (study B).

In response to L-NAME until week 24 (study A) the overall condition of SHR and SHR-6^{MWF} rats were markedly impaired and they demonstrated premature death between week 12 and 15. In contrast, MWF and SHR-8^{MWF} rats tolerated the L-NAME treatment between 6 and 24 weeks of age. Sham treated MWF developed a significant increase in UAE up to week 24 compared with albuminuria-resistant SHR and consomic SHR-6^{MWF} and SHR-8^{MWF}. In response to L-NAME MWF exhibited mean UAE levels that were significantly higher compared with Sham. Consomic SHR-8^{MWF} animals demonstrated a significant increase of albuminuria in the Sham group compared to SHR Sham. Under L-NAME treatment UAE in MWF and SHR-8^{MWF} increased significantly compared to Sham in week 24.

At 12 weeks of age (study B), UAE levels were comparable with the data obtained in study A. In study B, UAE under L-NAME treatment in SHR and SHR-8^{MWF} were still low and only slightly higher compared with Sham, while SHR-6^{MWF} and MWF exhibited significant higher

UAE levels compared to Sham. Transfer of RNO6 resulted in significantly higher UAE values demonstrating a large variability in SHR-6^{MWF} L-NAME compared with SHR-6^{MWF} Sham and L-NAME-treated SHR. Transfer of RNO8 resulted in a significant higher mean UAE level in the Sham group of SHR-8^{MWF} compared with SHR Sham. Furthermore, SHR-6^{MWF} and SHR-8^{MWF} showed significantly increased tubulo-interstitial damage in the L-NAME group compared with Sham, while SHR and MWF only exhibited low or no change of tubulo-interstitial damage under L-NAME treatment compared to Sham. Systolic blood pressure (SBP) revealed a significant increase of SBP at 12 weeks of age in L-NAME treated SHR, SHR-6^{MWF} and SHR-8^{MWF} compared to Sham. MWF under L-NAME treatment showed no significant changes in blood pressure vales compared to Sham, but significantly lower SBP compared with the other strains in both the Sham and the L-NAME group.

SHR-6^{MWF} exhibited no albuminuria under Sham and Nx conditions. However, UAE was significantly lower in week 18 and 24 of age compared to SHR in the Nx group. In contrast, SHR-8^{MWF} developed a significant increase in albuminuria under Sham and Nx conditions, with significantly higher values compared to SHR. In contrast, SBP of SHR-8^{MWF} Nx was markedly lower. SHR-8^{MWF} and MWF showed a significantly increased glomerular damage index compared to SHR in the Sham treated group, while under Nx only MWF exhibited significant glomerular damages compared to SHR.

Taken together the results demonstrate that isolation of the RNO6 QTL by transfer from MWF into the SHR background is not capable of inducing an albuminuria phenotype during normal conditions or after 50% nephron reduction. After NO inhibition, normal SHR rats showed no albuminuria, although SBP was increased in these animals. In contrast, in response to NO inhibition consomic SHR-6^{MWF} exhibited an albuminuria phenotype. Thus, transfer of MWF-RNO6 into SHR influences albuminuria and blood pressure development during NO inhibition. This suggests that these genetic mechanisms are probably different from the QTL responsible for the induction of albuminuria identified on RNO6 in the MWF strain. In contrast, SHR-8^{MWF} and MWF animals tolerated treatment with L-NAME during the entire observation period. Moreover, this study shows for the first time the induction of spontaneous albuminuria and renal damage by transfer of albuminuria QTL on RNO8 into a resistant recipient background in a consomic rat strain under both normal conditions and 50% nephron reduction, but not under NO inhibition. These findings demonstrate that one or more genes on RNO6 contribute to the development of albuminuria during NO inhibition. Moreover, genes on RNO8 act independently of other genetic factors and were involved in the pathophysiology of both albuminuria and structural kidney damage in the SHR background. Further studies should elucidate the pathophysiology of albuminuria and renal damage in the MWF rat strain.

7 Verzeichnisse

7.1 Abbildungen

Abb. 1. Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) 2
Abb. 2. Schematische Darstellung der wechselseitigen Entstehungsmechanismen von Herz- Kreislauf- und Nierenerkrankungen
Abb. 3. Strukturformeln von L-Arginin und L-NAME und schematische Darstellung der NO- Synthese und NO-Synthese-Hemmung über L-NAME
Abb. 4. Schematische Darstellung des Backcross-Züchtungsschemas
Abb. 5. Phänotypisierungsprotokoll der Studie A von er 6. bis zur 24. Woche
Abb. 6. Phänotypisierungsprotokoll der Studie B von der 6. bis zur 12. Woche21
Abb. 7. Katheter-Implantation zur direkten Blutdruckmessung bei Ratten. a) Schematische Darstellung des OP-Feldes im Leistenspalt; b) fixierte A. femoralis; c) Schnittstelle in der A. femoralis
Abb. 8. Schematische Darstellung des Katheters für die direkte Blutdruckmessung bei Ratten
Abb. 9. Albumin-Exkretion im Urin (U _{Alb}) aus Studie A der Kontroll-Gruppe von SHR-, SHR-6 ^{MWF} -, SHR-8 ^{MWF} - und MWF-Tieren
Abb. 10. Kaplan-Meier-Überlebenskurve aus Studie A der Stämme SHR, SHR-6 ^{MWF} , SHR-8 ^{MWF} und MWF unter L-NAME im Zeitgang von der 6. bis zur 24. Woche
Abb. 11. Albumin-Exkretion im Urin (U _{Alb}) aus Studie A der L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR-6 ^{MWF} , SHR-8 ^{MWF} und MWF-Tiere

Abb. 16. Systolischer Blutdruck (SBD) mittels Tail-Cuff-Bestimmung aus Studie B der Kontroll-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF40

Abb. 17. Systolischer Blutdruck (SBD) mittels Tail-Cuff-Bestimmung aus Studie B der L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF......41

Abb. 19. Relatives Linksventrikuläres-Gewicht (rel LVG) aus Studie B der Kontroll- und L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF......43

Abb. 21. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (Ngal)-Genexpression aus Studie B der Kontroll- und L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF45

Abb. 22. Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI) aus Studie B der Kontroll- und L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF......46

Abb. 23. Glomeruloskleros-Index (GSI) aus Studie B der Kontroll- und L-NAME-Gruppe männlicher SHR, SHR-6 ^{MWF} , SHR-8 ^{MWF} und MWF47
Abb. 24. Histopathologie der rechten Niere aus Studie B48
Abb. 25. Albumin-Exkretion im Urin (U _{Alb}) der Nx-Gruppe männlicher SHR, SHR-6 ^{MWF} , SHR-8 ^{MWF} und MWF
Abb. 26. Systolischer Blutdruck (SBD) der Nx-Gruppe männlicher SHR, SHR-6 ^{MWF} , SHR-8 ^{MWF} und MWF
Abb. 27. Mittlerer arterieller Druck (MAD) der Nx-Gruppe männlicher SHR, SHR-8 ^{MWF} und MWF
Abb. 28. Relatives linksventrikuläres Gewicht (rel LVG) der Nx-Gruppe männlicher SHR, SHR-8 ^{MWF} und MWF
Abb. 29. Cystatin C im Plasma der Nx-Gruppe männlicher SHR, SHR-8 ^{MWF} und MWF56
Abb. 30. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (Ngal)-Genexpression der Nx-Gruppe männlicher SHR, SHR-8 ^{MWF} und MWF
Abb. 31. Kollagen 3 (Col3)-Expression bei männlichen SHR, SHR-6 ^{MWF} , SHR-8 ^{MWF} und MWF
Abb. 32. Kidney Injury Molecule 1 (Kim-1)-Expression bei männlichen SHR, SHR-8 ^{MWF} und MWF
Abb. 33. Tubulointerstitieller-Schädignugsindex (TSI) männlicher SHR, SHR-8 ^{MWF} und MWF60
Abb. 34. Glomerulosklerose-Index (GSI) männlicher SHR, SHR-8 ^{MWF} und MWF61

Abb. 35. Histopathologie der rechten Niere der Kontroll- und Nephrektomie (Nx)-Gruppe männlicher SHR, SHR-8^{MWF} und MWF......62

7.2 Tabellen

Tab. 1 Bewertungsschema für den Glomerulosklerose Index

Tab. 2 Bewertungsschema für den Tubulointerstitiellen Schädigungsindex

Tab. 3 Phänotypische Charakterisierung der Stämme SHR, SHR-6^{MWF}, SHR-8^{MWF} und MWF der Kontroll- und L-NAME -Gruppe

Tab. 4 Phänotypische Charakterisierung der Stämme SHR, SHR-8^{MWF} und MWF der Kontroll- und Nx-Gruppe

7.3 Abkürzungen

0	Grad
%	Prozent
Α.	Arteria
Abb.	Abbildung
ADH	Adiuretin
Ang	Angiotensin
ANOVA	Analysis of variance
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
BC-Generation	Backcross-Generation
bzw.	beziehungsweise
С	Celsius
ca.	cirka
cDNA	Cyclic DANN
сM	Centimorgan
Coll 3	Kollagen 3
C _T	Cycle Treshold
D	Delta
DNA	Desoxiribunukleinacid
E	Expression

Ethylendiamintetraessigsäure
Enzyme linked immunosorbent assay
endotheliale Stickoxidsynthase
et alia
forward
1. Filialgeneration
2. Filialgeneration
induzierbare Stickoxidsynthase
neuronale Stickoxidsynthase
Cyclic Guanosinmonophosphat
Guanosintriphosphat
Glomärulärefiltrationsrate
Glomeruloskleroseindex
Stunde
Hämatoxylin-Eosin
Kilogramm
Körpergewicht
Kidney Injury Molecule 1
Liter
Logarithmic odd ratio
N ^G -Nitro-L-Arginin-Methylester
Milimeter Quecksilbersäule
Minuten
massager RNA
Munich Wistar Frömter
Nervus
Natriumchlorid
Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin
Nanometer
nano Mol
nicht untersucht
Nephrektomie
Periodic Acid Schiff
Phosophate buffered saline
Porphobilinogen deaminase
Polymerase Chain Reaction
Quantitative Trait Loci
Renin-Angiotensin-System

RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribunukleinacid
RNO	Rattus norvegicus
ROS	Reaktive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur
S. C.	sub cutan
sec	Sekunden
SHR	Spontanues Hypertensive Rat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TSI	Tubulointerstitielle Schädigung
u. a.	unter anderem
U _{Alb}	Albumin gemessen im Urin
Upm	Umdrehungen pro Minute
V.	Vena
Wo.	Woche

7.4 Tierversuchsantragsnummer

G 0278/07

8 Literatur

Akintunde AA, Akinwusi PO, Familoni OB, Opadijo OG. Effect of systemic hypertension on right ventricular morphology and function: an echocardiographic study. *Cardiovasc J Afr.* 2010; 21:252-6.

Andersen TB, Eskild-Jensen A, Frøkiaer J, Brøchner-Mortensen J. Measuring glomerular filtration rate in children; can cystatin C replace established methods? A review. *Pediatr Nephrol.* 2009; 24:929-41.

Bostrom MA, Freedman BI. The spectrum of MYH9-associated nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010; 5:1107-13.

Böger RH, Bode-Böger SM, Gerecke U, Frölich JC. Long term administration of L-arginine, L-NAME and the exogenous NO donor molsidomine modulates urinary nitrate and cGMP excretion in rats. *Cardiovasc Res.* 1994; 28:494-9.

Braam B, de Roos R, Bluyssen H, Kemmeren P, Holstege F, Joles JA, Koomans H. Nitric oxide-dependent and nitric oxide-independent transcriptional responses to high shear stress in endothelial cells. *Hypertension.* 2005; 45:672-80.

Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*. 2000; 101:329-35.

Chaudhary K, Phadke G, Nistala R, Weidmeyer CE, McFarlane SI, Whaley-Connell A. The emerging role of biomarkers in diabetic and hypertensive chronic kidney disease. *Curr Diab Rep.* 2010; 10:37-42.

Deng LY, Schiffrin EL. Endothelin-1 gene expression in blood vessels and kidney of spontaneously hypertensive rats (SHR), L-NAME-treated SHR, and renovascular hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998; 31:S380-3.

Desai MM, Weissman D, Feldman MW. Evolution can favor antagonistic epistasis. *Genetics*. 2007; 177:1001-10.

Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL[®] Deutsche Hypertonie Gesellschaft , Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie (http://leitlinien.net/046-001.pdf).

Diercks GFH, Boven AJ van, Hillege HL, Janssen WMT, Kors JA, Jong PE de, Grobbee DE, Crijns HJGM, Gilst WH van. Microalbuminuria is independently associated with ischaemic electrocardiographic abnormalities in a large non-diabetic population. The PREVEND study. *Eur Heart J* 2000; 21:1922-7.

Dmitrieva RI, Hinojos CA, Boerwinkle E, Braun MC, Fornage M, Doris PA. Hepatocyte nuclear factor 1 and hypertensive nephropathy. *Hypertension*. 2008; 51:1583-9.

Dobre D, Nimade S, De Zeeuw D. Albuminuria in heart failure: what do we really know? *Curr Opin Cardiol* 2009; 24:148-54.

Van Dokkum RP, Jacob HJ, Provoost AP. Genetic Differences Define Serverity of Renal Damage after L-NAME Induced Hypertension in Rats. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9:363-71.

Van Dokkum RP, Jacob HJ, Provoost AP. Blood pressure and the susceptibility to renal damage after unilateral nephrectomy and L-NAME-induced hypertension in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15:1337-1343.

Esposito C, He CJ, Striker GE, Zalups RK, Striker LJ. Nature and severity of the glomerular response to nephron reduction is strain-dependent in mice. *Am J Pathol.* 1999; 154:891-7.

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 Defizit. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:1399-1406.

Gschwend S, Pint-Sietsma SJ, Buikema H, Pinto YM, Van Gilst WH, Schulz A, De Zeeuw D, Kreutz R. Impaired coronary endothelial function in a rat model of spontaneous albuminuria. *Kidney Int.* 2002;62:181-91.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996; 6:986-94.

Ijpelaar DH, Schulz A, Koop K, Schlesener M, Bruijn JA, Kerjaschki D, Kreutz R, de Heer E. Glomerular hypertrophy precedes albuminuria and segmental loss of podoplanin in podocytes in Munich-Wistar-Frömter rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 294:F758-67.

Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005; 365: 217–23.

Ko GJ, Grigoryev DN, Linfert D, Jang HR, Watkins T, Cheadle C, Racusen L, Rabb H. Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI-to-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010; 298:F1472-83.

Koa GJ, Grigoryeva DN, Linferta D, Janga HR, Watkinsa T, Cheadlea C, Racusenb L, Rabba H. Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI to CKD transition *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;298:F1472-83.

Kuhlmann A, Haas CS, Gross ML, Reulbach U, Holzinger M, Schwarz U, Ritz E, Amann K. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotally nephrectomized rat. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004; 286:F526-33.

Kurtz TW, Morris RC, jr. Biological Variability in Wistar-Kyoto Rats Implications for Research with the Spontaneously Hypertensive Rat. *Hypertension* 1987;10:127-31.

Kyhse-Andersen J, Schmidt C, Nordin G, Andersson B, Nilsson-Ehle P, Lindström V, Grubb A. Serum cystatin C, determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate. *Clin Chem.* 1994; 40:1921-6.

Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: An overview. *J Lab Clin Med* 2005;146:160-73.

Levonen AL, Laakso J, Vaskonen T, Mervaala E, Karppanen H, Lapatto R. Down-regulation of renal glutathione synthesis by systemic nitric oxide synthesis inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Pharmacol.* 2000; 59:441-3.

Levy AS, Chung JC, Kroetsch JT, Rush JW. Nitric oxide and coronary vascular endothelium adaptations in hypertension. *Vasc Health Risk Manag.* 2009; 5:1075-87.

Llorens S, Fernández AP, Nava E. Cardiovascular and renal alterations on the nitric oxide pathway in spontaneous hypertension and ageing. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2007; 37:149-56.

Manning RD Jr, Tian N, Meng S. Oxidative stress and antioxidant treatment in hypertension and the associated renal damage. *Am J Nephrol.* 2005; 25:311-7.

Martinez F, Mansego ML, Chaves FJ, Redon J. Genetic bases of urinary albumin excretion and related traits in hypertension. *J Hypertens.* 2010; 2:213-25.

Mattson DL, Dwinell MR, Greene AS, Kwitek AE, Roman RJ, Cowley AW Jr, Jacob HJ. Chromosomal mapping of the genetic basis of hypertension and renal disease in FHH rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 293:F1905-14.

Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:2534-43.

Matsui K, Breiteneder-Geleff S, Kerjaschki D. Epitope-specific antibodies to the 43-kD glomerular membrane protein podoplanin cause proteinuria and rapid flattening of podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9:2013-26.

Miyagawa Y, Takemura N, Hirose H. Evaluation of the measurement of serum cystatin C by an enzyme-linked immunosorbent assay for humans as a marker of the glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Med Sci.* 2009; 71:1169-76.

Olzinski AR, McCafferty TA, Zhao SQ, Behm DJ, Eybye ME, Maniscalco K, Bentley R, Frazier KS, Milliner CM, Mirabile RC, Coatney RW, Willette RN. Hypertensive target organ damage is attenuated by a p38 MAPK inhibitor: role of systemic blood pressure and endothelial protection. *Cardiovasc Res.* 2005; 66:170-8.

Ono H, Ono Y, Takanohashi A, Matsuoka H, Frohlich ED. Apoptosis and glomerular injury after prolonged nitric oxide synthase inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2001; 38:1300-6.

Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* 2003; 83:253-307.

Piecha G, Koleganova N, Gross ML, Geldyyev A, Adamczak M, Ritz E. Regression of glomerulosclerosis in subtotally nephrectomized rats: effects of monotherapy with losartan, spironolactone, and their combination. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 295:F137-44.

Ponnuchamy B, Khalil RA. Cellular mediators of renal vascular dysfunction in hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296: R1001–R1018.

Pravenec M, Kurtz TW. Recent Advances in Genetics of the Spontaneously Hypertensive Rat. *Curr Hypertens Rep* 2010; 12:5-9.

Rapp JP. Genetic Analysis of Inherited Hypertension in the Rat. *Physiological Reviews* 2000; 80:135-72.

Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int.* 1984; 26:137-143.

Raij L. Workshop: hypertension and cardiovascular risk factors: role of the angiotensin Ilnitric oxide interaction. *Hypertension* 2001;37:767-73.

Remuzzi G, Weening JJ. Albuminuria as early test for vascular disease. *The Lancet* 2005; 365:556-7.

Rosario RF, Wesson DE. Primary hypertension and nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006; 15:130-4.

Rosner MH. Urinary biomarkers for the detection of renal injury. *Adv Clin Chem.* 2009; 49:73-97.

Rothermund L, Nierhaus M, Fialkowski O, Freese F, Ibscher R, Mieschel S, Kossmehl P, Grimm D, Wehland M, Kreutz R. *J Hypertens.* 2006; 24:1857-64.

Salmon AH, Neal CR, Harper SJ. New aspects of glomerular filtration barrier structure and function: five layers (at least) not three. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009 May; 18:197-205.

Schmidt BMW, Schmieder RE. Established and new parameters of hypertensive target organ damage, *Dtsch Med Wochenschr* 2006; 131: 20–23.

Schulz A, Litfin A, Kossmehl P, Kreutz R. Genetic dissection of increased urinary albumin excretion in the munich wistar frömter rat. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:2706-14.

Schulz A, Standke D, Kovacevic L, Mostler M, Kossmehl P, Stoll M, Kreutz R. A major gene locus links early onset albuminuria with renal interstitial fibrosis in the MWF rat with polygenetic albuminuria. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14:3081-9.

Schulz A, Litfin A, Kossmehl P, Kreutz R. Genetic Dissection of Increased Urinary Albumin Excretion in the Munich Wistar Frömter Rat. *J Am Soc Nephrol* 2002;13: 2706–2714.

Schulz A, Weiss J, Schlesener M, Hänsch J, Wehland M, Wendt N, Kossmehl P, Sietmann A, Grimm D, Stoll M, Nyengaard J R, Kreutz R. Development of Overt Proteinuria in the Munich Wistar Frömter Rat Is Suppressed by Replacement of Chromosome 6 in a Consomic Rat Strain. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:113-21.

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; 114:305-11.

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 Frömter rat *Physiol Genomics.* 2008; 35:30-5.

Tsioufis C, Dimitriadis K, Stefanadis C, Kallikazaros I. The Emerging Role of Subclinical Inflammation in Hypertension-Associated Early Renal Dysfunction: Focus on Microalbuminuria. *Hellenic J Cardiol* 2006; 47: 361-365.

Van Timmeren MM, Bakker SJ, Vaidya VS, Bailly V, Schuurs TA, Damman J, Stegeman CA, Bonventre JV, van Goor H. Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 291:F456-64.

Versari D, Daghini E, Virdis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension *British Journal of Pharmacology* 2009; 157:527–536.

Weir MR. Microalbuminuria and Cardiovascular Disease. *Clin J Am Soc Nephrol 2007;* 2: 581-590.

Wesseling S, van Goor H, Bluyssen HA, Kemmeren P, Holstege FC, Koomans HA, Braam B. Transcriptome-based identification of pro- and antioxidative gene expression in kidney cortex of nitric oxide-depleted rats. *Physiol Genomics.* 2007; 28:158-67.

Whaley-Connell AT, Chowdhury NA, Hayden MR, Stump CS, Habibi J, Wiedmeyer CE, Gallagher PE, Tallant EA, Cooper SA, Link CD, Ferrario C, Sowers JR. Oxidative stress and glomerular filtration barrier injury: role of the renin-angiotensin system in the Ren2 transgenic rat. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 29:F1308-14.

Yagil Y, Hessner MJ, Schulz H, Gosele C, Lebdev L, Barkalifa R, Sapojnikov M, Hubner N, Yagil C. Geno-transcriptomic dissection of proteinuria in the uninephrectomized rat uncovers a molecular complexity with sexual dimorphism. *Physiol Genomics.* 2010; 42A:301-16.

Publikationsverzeichnis

Publikationen

Schulz A, Schütten S, Schulte L, Kossmehl P, Nyengaard JR, Vetter R, Huber M, Kreutz R. A genetic locus on MWF rat chromosome 6 affects kidney Damage in response to L-NAME treatment in Spontaneously hypertensive rats; *Physiol Genomics* 2010; 42:126-33.

van Es N, Schulz A, Ijpelaar D, van der Wal A, Kuhn K, Schütten S, Kossmehl P, Nyengaard JR, de Heer E, Kreutz R. Elimination of Severe Albuminuria in Aging Hypertensive Rats by Exchange of 2 Chromosomes in Double-Consomic Rats. *Hypertension.* 2011; 58:219-24

Schulz A, Schütten-Faber S, van Es N, Unland J, Schulte L, Kossmehl P, de Heer E, Kreutz R. Induction of albuminuria and kidney damage in SHR rats by transfer of chromosome 8 from Munich Wistar Fromter rats. *Physiol Genomics*. 2011

Abstracts

2009

Schulz A, Schütten S, Wendt N, Vetter R, Steireif SC, Bublath B, Reinhold Kreutz (2009): Single Chromosome 6 transfer from Munich Wistar Frömter rats into SHR induces severe albuminuria during NO-inhibition. (ESH; Mailand, Italien 2009)

Schulz A, Schuetten S, Vetter R, Steireif SC, Bublath B, Kreutz R (2009): The induction of albuminuria in SHR by NO-inhibition is aggravated in a SHR-derived consomic strain carrying chromosome 6 from the Munich Wistar Frömter rat. Hypertension 54:1182. (ECCR; Nizza, Frankreich 2009)

Schulz A, Schütten S, Schulte L, Unland J, Bublath B, Kreutz R (2009): Deprivation of androgens protects against albuminuria in the Munich Wistar Frömter rat. (4th Congress International Society of Gender Medicine: Sex and Gender in Medicine; Berlin, Deutschland 2009

Schütten S, Schulte L, Vetter R, Steireif SC, Bublath B, Kreutz R, Schulz A (2009): NO-Inhibition und Transfer von Chromosom 6 von der MWF-Ratte induziert Blutdruckanstieg und Nierenschädigung bei spontan hypertensiven Ratten. DMW 134, S7 (Abstractband). (Hochdruckliga; Lübeck, Deutschland 2009)

Schulte L, Schütten S, Unland J, Bublath B, Kreutz R, Schulz A (2009): Androgenverlust schützt vor progressiver Albuminurie bei der Munich Wistar Frömter-Ratte. (Hochdruckliga; Lübeck, Deutschland 2009)

2010

Schütten S, Schulte L, Unland J, Vetter R, Bublath B, Kreutz R, Schulz A (2010): Ein Albuminurie-QTL der Munich Wistar Frömter-Ratte vermag bei Albuminurie-resistenten SHR-Ratten eine Albuminurie zu induzieren. (Hochdruckliga; Berlin, Deutschland 2010)

Unland J, Schütten S, Schulte L, Kreutz R, Schulz A (Hochdruckliga; Berlin, Deutschland 2010): Interaktionen zwischen Testosteron und Genloci auf Chromosom 6 und 8 sind für die Entwicklung einer progressiven Albuminurie bei Munich Wistar Frömter-Ratten verantwortlich.

Schulz Angela, Schuetten Sabrina, Schulte Leonard, Vetter Roland, Bublath Bettina, Kreutz Reinhold: Induction of spontaneous albuminuria in SHR rats by transfer of a genetic locus from the Munich Wistar Frömter rat (ECCR; Nizza, Frankreich 2010)

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz für die Bereitstellung des interessanten Themas und die exzellente Betreuung während der Durchführung der Arbeit und Frau Prof. Dr. Heidrun Fink, die mich bei meiner externen Dissertation an der Charité betreut hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Angela Schulz die stets ein offenes Ohr für Fragen und Schwierigkeiten hatte. Sie hat es verstanden, mich auch in scheinbar ausweglosen Situationen mit konstruktiver Kritik zu motivieren um Lösungswege zu finden.

Ich möchte mich herzlich bei Sabine Wunderlich und Claudia Plum bedanken, die mit viel Geduld nicht nur geholfen haben meine Proben zu bearbeiten, sondern mir mit großer Herzlichkeit bei allen Anforderungen des Lebens unter die Arme gegriffen haben.

Bettina und Gerd-Jürgen Bublath sowie Christiane Priebsch möchte ich für ihre freundlich bestimmte Art in der Tierzucht und -haltung danken. Und dafür dass Sie mich im Arbeitsalltag stets unterstützt und mit einem Lachen den Tag verschönert haben.

Meinen Kollegen Norbert Wendt, Leonard Schulte, Johannes Unland und Johannes Fredrich möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung danken. Sie sind in meiner Zeit im Institut längst zu Freunden geworden.

Ein besseres Arbeitsklima hätte ich mir nicht wünschen können, es gab wenige Tage an denen ich mich nicht gefreut habe zur Arbeit zu gehen. Vielen Dank an alle mit denen ich Hand in Hand gearbeitet habe und die dazu beigetragen haben, dass ich wirklich traurig bin dieses Institut zu verlassen.

Abschließend möchte ich natürlich meiner Familie danken, der ich diese Arbeit auch widme. So chaotisch und laut wie sie alle sind haben sie mich doch immer in dem was ich mir vorgenommen habe unterstützt. Und sind wir ehrlich, der Apfel fällt nicht weit vom Stamm. Danke, auch dafür.
Eidesstattliche Erklärung

Ich, Sabrina Marliese Renate Schütten-Faber, geb. Schütten, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Untersuchung der genetischen Grundlage der Albuminurie und chronischen Nierenschädigung bei der Munich WistarFrömter (MWF)-Ratte.

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

Duisburg, 26.09.2011

S. Schütten-Faber