

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

DISSERTATION

**Untersuchung des konsomen Rattenstammes MWF-8<sup>SHR</sup>  
zur Analyse eines Albuminurie-QTL bei der MWF-Ratte**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jonna Hänsch

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Kreuz  
2. Prof. Dr. med. M. Tepel  
3. Prof. Dr. M. Stoll

Datum der Promotion: 03.09.2010

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Einleitung</b> .....  | <b>1</b>  |
| 1.1. Zwei interagierende kardiovaskuläre Risikofaktoren: Hypertonie und Albuminurie | 1         |
| 1.2. Tiermodelle zur Untersuchung komplexer Erkrankungen.....                       | 6         |
| 1.3. Die Rattenmodelle MWF und SHR.....   | 7         |
| 1.4. Identifizierung krankheitsrelevanter Genloci bei komplexen Krankheiten.....    | 9         |
| 1.5. Albuminurie-QTL bei der Ratte.....   | 11        |
| 1.6. Ziel der Arbeit.....   | 12        |
| <br>  |           |
| <b>2. Material und Methoden</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>2.1. Materialien</b> .....   | <b>14</b> |
| 2.1.1. Chemikalien.....   | 14        |
| 2.1.2. Puffer und Lösungen.....   | 15        |
| 2.1.3. Primer und Sonden für die TaqMan-PCR.....                                    | 15        |
| 2.1.4. Enzyme.....  | 16        |
| 2.1.5. Betäubungsmittel.....  | 16        |
| 2.1.6. Materialien und Futtermittel.....  | 16        |
| 2.1.7. Geräte und Software.....   | 16        |
| <b>2.2. Methoden</b> .....  | <b>17</b> |
| 2.2.1. Parentaltiere.....   | 17        |
| 2.2.2. Haltung.....   | 17        |
| 2.2.3. Zuchten.....   | 18        |
| a) Zucht des konsomen Stammes MWF-8 <sup>SHR</sup> .....                            | 18        |
| b) Zucht des F1-(MWFxMWF-8 <sup>SHR</sup> )-Stammes.....                            | 18        |
| c) Zucht der kongenen Linien.....   | 20        |
| 2.2.4. Studiendesign.....   | 21        |
| a) MWF-8 <sup>SHR</sup> Altersverlaufsstudie.....                                   | 21        |
| b) F1-(MWFxMWF-8 <sup>SHR</sup> ) Altersverlaufsstudie.....                         | 21        |
| c) Untersuchung der kongenen Linien.....  | 21        |
| 2.2.5. Blutdruckmessung.....  | 21        |
| 2.2.6. Uringewinnung in Stoffwechsellkäfigen.....                                   | 22        |
| 2.2.7. Messung der Albuminausscheidung.....   | 23        |
| 2.2.8. Präparationen und Aufarbeitung von Organen und Geweben.....                  | 23        |
| 2.2.9. Biochemische Analysen.....   | 24        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.10. Bestimmung der Gesamt-Nephronenanzahl .....   | 25        |
| 2.2.11. Histologie.....   | 25        |
| a) Herstellung der Nierenschnitte.....  | 25        |
| b) Zählung der subkapsulären Glomeruli .....  | 25        |
| c) Glomeruoskeroseindex .....   | 26        |
| d) Renale interstitielle Fibrose.....   | 26        |
| e) Tubulärer Schädigungsindex .....   | 26        |
| 2.2.12. Differentielle Genexpressionsanalyse .....  | 27        |
| a) Isolierung der RNA .....   | 27        |
| b) cDNA Synthese durch reverse Transkription .....  | 27        |
| c) Quantitative Real-Time PCR.....  | 28        |
| 2.2.13. Statistische Analysen.....  | 29        |
| <b>3. Ergebnisse.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>3.1. Altersverlaufstudie A: Phänotypische Beurteilung männlicher MWF-8<sup>SHR</sup>- und F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>)-Tiere .....</b> | <b>30</b> |
| 3.1.1. Frühzeitige Albuminausscheidung in der 4. und 8. Woche.....  | 30        |
| 3.1.2. Altersverlauf der Albuminausscheidung .....  | 31        |
| a) Altersverlauf bei MWF-8 <sup>SHR</sup> -Männchen.....  | 31        |
| b) Altersverlauf bei F1(MWFxMWF-8 <sup>SHR</sup> )-Männchen .....   | 32        |
| 3.1.3. Systolischer Blutdruck.....  | 33        |
| 3.1.4. Biochemische Analysen .....  | 34        |
| 3.1.5. Gesamt-Nephronenanzahl in der Niere.....   | 36        |
| 3.1.6. Histologische Untersuchung der Nieren .....  | 37        |
| 3.1.7. Differentielle Genexpressionsanalyse .....   | 38        |
| 3.1.8. Entwicklung im Alter – 32. Woche.....  | 40        |
| <b>3.2. Verlaufstudie B: Phänotypische Beurteilung weiblicher MWF-8<sup>SHR</sup>- und F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>)-Tiere .....</b>       | <b>42</b> |
| 3.2.1. Verlauf der Albuminausscheidung bis ins Alter .....  | 42        |
| a) Altersverlauf bei MWF-8 <sup>SHR</sup> -Weibchen.....  | 42        |
| b) Altersverlauf bei F1-(MWFxMWF-8 <sup>SHR</sup> )-Weibchen.....   | 42        |
| 3.2.2. Systolischer Blutdruck.....  | 43        |
| 3.2.3. Biochemische Analysen .....  | 44        |
| 3.2.4. Untersuchung der Nieren .....  | 46        |
| <b>3.3. Untersuchung des sexuellen Dimorphismus beim konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Stamm ..</b>  | <b>47</b> |
| 3.3.1. Albuminexkretion .....   | 47        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.3.2. Systolischer Blutdruck.....  | 48        |
| 3.3.3. Strukturelle Veränderungen der Niere.....                                | 49        |
| <b>3.4. Beurteilung der Albuminurie kongener Tiere in der achten Woche.....</b> | <b>51</b> |
| <br>  |           |
| <b>4. Diskussion.....</b>   | <b>54</b> |
| <br>  |           |
| <b>5. Zusammenfassung .....</b>   | <b>68</b> |
| <br>  |           |
| <b>6. Verzeichnisse .....</b>   | <b>70</b> |
| 6.1. Abbildungen.....   | 70        |
| 6.2. Tabellen.....  | 72        |
| 6.3. Abkürzungen.....   | 70        |
| <br>  |           |
| <b>7. Literatur .....</b>   | <b>75</b> |
| <br>  |           |
| <b>Anhang .....</b>   | <b>82</b> |
| <b>Veröffentlichungen.....</b>  | <b>82</b> |
| Publikationen .....   | 82        |
| Poster .....  | 82        |
| Auszeichnungen .....  | 82        |
| <b>Lebenslauf .....</b>   | <b>83</b> |
| <b>Danksagung.....</b>  | <b>84</b> |
| <b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>   | <b>70</b> |

# 1. Einleitung

## 1.1. Zwei interagierende kardiovaskuläre Risikofaktoren: Hypertonie und Albuminurie

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit die Hauptursache für Morbidität und Mortalität und waren im Jahr 2005 allein für 30% aller Todesfälle verantwortlich (WHO 2007). Neben einer steigenden Prävalenz in den westlichen Industrieländern stellen Herz-Kreislauf-Krankheiten besonders in den Entwicklungsländern ein stark zunehmendes gesundheitliches Problem dar. Bereits im Jahr 1990 wurden in Entwicklungsländern annähernd doppelt so viele Herz-Kreislauf-Erkrankungen assoziierte Todesfälle verzeichnet wie in Industrieländern (Reddy et al., 1998). Eine stetig steigende und älter werdende Weltbevölkerung stellt die Medizin vor neue Herausforderungen.

Ein lange bekannter Hauptrisikofaktor für Schlaganfall, Herzinfarkt und Nierenversagen ist der Bluthochdruck, wobei die Beziehung zwischen der Höhe des Blutdrucks und kardiovaskulären Erkrankungen ab einem Wert von 115/75 mmHg log-linear verläuft (Prugger et al., 2006). Obgleich die Festlegung eines exakten Grenzwerts zur Einteilung gesund/krank aufgrund der kontinuierlichen Risikozunahme beim Blutdruck nur willkürlich ist, werden für eine bessere Operationalisierung Werte von systolisch >140 mmHg und diastolisch >90 mmHg als krankhaft erhöht angesehen (Leitlinien der Deutschen Hochdruckliga e.V.).

Ein Internationaler Vergleich der Prävalenz der Hypertonie bei 35-75-Jährigen belegt für Deutschland alarmierend hohe Werte. Mit durchschnittlich 55% sind hierzulande doppelt so viele Menschen von Bluthochdruck betroffen wie in den USA und Kanada. Hierbei steigen die systolischen Blutdruckmittelwerte in der Bevölkerung mit zunehmendem Alter kontinuierlich an und in der Gruppe der über 65-Jährigen beträgt die Hypertonieprävalenz über 80% (Wolf-Maier et al., 2003). Insgesamt 26% aller Todesfälle in Deutschland stehen im Zusammenhang mit Bluthochdruck (Prugger et al., 2006).

Obwohl der Bluthochdruck seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung ist, können auch heute in 95% der Fälle keine organischen Ursachen für die Hypertonie

nachgewiesen werden. Bei dieser Form des Bluthochdrucks, die als primäre, essentielle oder auch idiopathische Hypertonie bezeichnet wird, handelt es sich um eine komplexe, multifaktoriell beeinflussbare, polygenetische Erkrankung. Neben Umweltfaktoren und Größen der individuellen Lebensführung wie Übergewicht, Kochsalz- und Alkoholaufnahme sowie körperlicher Aktivität, haben vor allem genetische Faktoren einen großen Einfluss von 30-40% auf die Hypertonieentwicklung. Die übrigen 5% der Hypertonieformen, bei denen der Bluthochdruck als Folge einer anderen Grunderkrankung auftritt, werden als sekundäre Hypertonie bezeichnet (Kreutz, Bolbrinker, Ganten, 2007).

Trotz der Schwierigkeiten die genauen Mechanismen, die zur Ausbildung einer essentiellen Hypertonie führen, aufzuklären, deuten zahlreiche Studien auf eine Schlüsselrolle der Niere in der Pathogenese der Krankheit hin. Die Schädigung dieses zentralen Regulationsorgans des Wasser- und Elektrolythaushaltes, kann sowohl Folge als auch Ursache eines Bluthochdrucks sein (Hall et al., 1996; Nadim et al., 2004; Rettig, Grisk 2005).

Die gravierende Rolle der Niere in der Pathogenese der Hypertonie wird zum einen durch die Aufklärung verschiedener monogenetischer Hypertonieformen deutlich. Alle bislang charakterisierten Veränderungen betreffen Gene, welche die Volumen- und Elektrolytregulation der Niere steuern (Lifton et al., 2001; Vehaskari 2007; Williams 2007). Hierbei lassen sich die Erkrankungen zwei Gruppen zuordnen. Bei der ersten Gruppe ist die Natriumreabsorption im kortikalen Sammelrohr durch eine Mutation hochreguliert. Beispielhaft hierfür sind das Liddle-Syndrom, das Gordon-Syndrom sowie der augenscheinliche Mineralkortikoidexzess. Bei der zweiten Gruppe kommt es zu einer Überproduktion adrenerger Steroidhormone, welche den Mineralkortikoidrezeptor im distalen Nephron stimulieren. Hierzu gehören der glukokortikoidreagible Aldosteronismus, die familiäre Glukokortikoidresistenz sowie der kürzlich beschriebene nichtglukokortikoidreagible Aldosteronismus (Geller et al., 2008; Vehaskari 2007).

Bekannt ist außerdem, dass eine genetisch oder durch Störungen der fetalen Nierenentwicklung bedingte Reduktion der Nephronenzahl, und somit der glomerulären Filtrationsfläche, für eine Hypertonieentwicklung prädisponiert (Brenner et al., 1988; Groß et al., 2005; Keller et al., 2003).

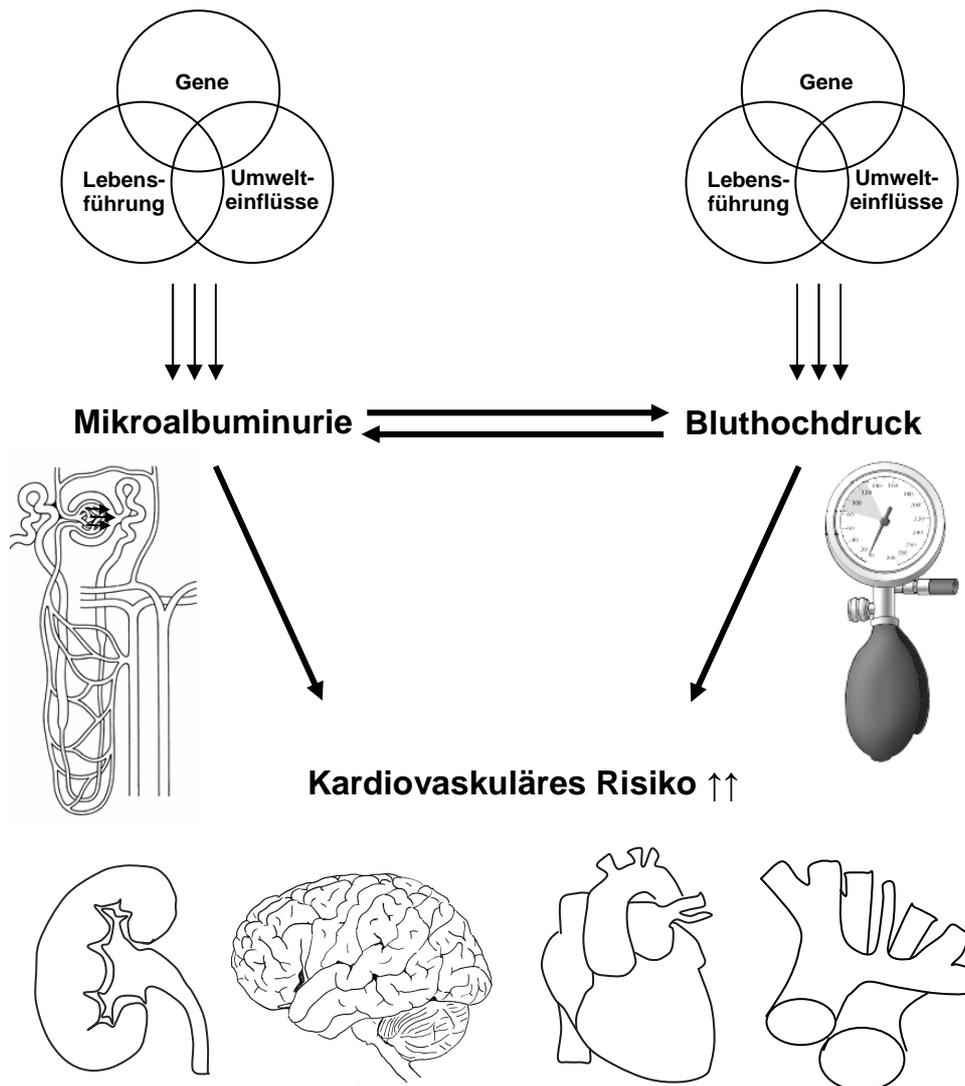
Auch klinische Beobachtungen von nierentransplantierten Patienten sowie Transplantationsstudien zwischen normotensiven- und hypertensiven Rattenstämmen

belegen die Relevanz der Niere bei der Hypertonieentwicklung. Es konnte gezeigt werden, dass die Höhe des Blutdruckes nach einer Nierentransplantation im höheren Maße vom Genom der Spenderniere abhängt als vom Genom des Empfängers. Normotensive Empfänger, die ein Organ von einem hypertensiven Spender bekamen, entwickelten in der Folge meist ebenfalls einen Bluthochdruck und umgekehrt (Guidi et al., 1996; Rettig, Grisk 2005).

Ein prognostisch aussagekräftiger Marker zur Früherkennung einer beginnenden Nephropathie bei Diabetikern und Hypertonikern ist der Nachweis einer erhöhten Albuminausscheidung über den Urin ( $U_{\text{Alb}}$ ) (Atkins 2005; Mann et al., 2003; Parving et al., 2006). Die  $U_{\text{Alb}}$  ist Ausdruck einer Störung des glomerulären molekularen Filterapparates und/oder der tubulären Albuminrückresorption.

Die Durchlässigkeit des glomerulären Filters, der aus gefenstertem Endothel, Basalmembran, Podozytenfortsätzen und Glykoproteinen besteht, hängt von der Größe und Ladung der Moleküle ab. Große und negativ geladene Proteine, wie Albumin, werden physiologischerweise zurückgehalten (Tryggvason et al., 2008). Erscheint Albumin dennoch im Primärharn, wird es durch rezeptorvermittelte Endozytose in proximale Tubuluszellen aufgenommen, lysosomal gespalten und resorbiert, so dass es kaum im Urin erscheint (Zhai et al., 2000). Es wird vermutet, dass die  $U_{\text{Alb}}$  eine generalisierte endotheliale Dysfunktion reflektiert, die zu einer soweit erhöhten Menge filtrierten Albumins führt, dass die Rückresorptionskapazität entlang des Nephrons überschritten wird (de Zeeuw et al., 2006; Deckert et al., 1989; Jensen et al., 1995). Große Mengen filtrierten Albumins können zusätzlich eine toxische Wirkung auf den proximalen Tubulus ausüben und durch eine nachfolgende tubulointerstitielle Entzündung zur Ausbildung einer renalen interstitiellen Fibrose und weiterer Verschlechterung der Nierenfunktion führen (Zoja et al., 1997; Remuzzi 2000). Der Nierenschaden kann aber auch primär tubulär lokalisiert sein (Comper et al., 2008).

Beim Menschen ist der Schwellenwert zur Abgrenzung einer pathologisch erhöhten Albuminausscheidung gegenüber physiologischen Werten praktikabel, aber relativ willkürlich, bei 30 mg/24h gesetzt. Bei einer Albuminausscheidung zwischen 30-300 mg/24h wird von einer Mikroalbuminurie gesprochen, ab Werten über 300 mg/24h liegt eine manifeste Proteinurie vor (de Zeeuw et al., 2006).



**Abb. 1:** Mikroalbuminurie und Bluthochdruck stellen zwei individuelle Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen dar, deren Pathophysiologie eng verknüpft ist.

Neben der prädiktiven Bedeutung für die Nierenfunktion ließ sich ein linearer Zusammenhang zwischen Höhe der Albuminausscheidung und kardiovaskulärem Risiko nachweisen, welcher bereits bei Werten unterhalb der pathologischen Grenze von 30 mg/24h besteht (Arnlöv et al., 2005; Gerstein et al., 2001; Hillege et al., 2002). Für kardiovaskuläre Risikopatienten, sowie Patienten mit Diabetes oder Bluthochdruck, potenziert sich das Risiko einer Herz-Kreislauf-Erkrankung bei gleichzeitigem Vorliegen einer Mikroalbuminurie (Biagazzi et al., 1998; Dinneen et al., 1997; Gerstein et al., 2001; Jager et al., 1999; Weir 2004). Aber auch in der Gesamtbevölkerung stellt die Mikroalbuminurie einen aussagekräftigen, unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor

dar (Hillege et al., 2002). Die Framingham Studie untersuchte die Assoziation zwischen Albuminausscheidung und kardiovaskulärem Risiko sowie Mortalität gezielt bei normotensiven Personen, mit uneingeschränkter Nierenfunktion und ohne Diabetes (Arnlöv et al., 2005). Das Ergebnis, dass eine positive Korrelation zeigte, belegt, dass eine bestehende  $U_{\text{Alb}}$  auch bei Patienten ohne typisches Risikoprofil als prognostischer Marker angesehen werden kann (Abb. 1).

Eine 2007 von Bramlage et al. im Rahmen der HYDRA Studie veröffentlichte Untersuchung gibt Auskunft über die Verbreitung der Mikroalbuminurie in der hiesigen Bevölkerung (Bramlage et al., 2007). Deutschlandweit wurden 39025 Hausarztpatienten (Durchschnittsalter 52,8 Jahre) einmalig getestet, von denen sich bei insgesamt 19% eine Mikroalbuminurie feststellen ließ. In Beziehung zu Diabetes- und Bluthochdruck gesetzt ergaben sich folgende Prävalenzen: Diabetespatienten mit Bluthochdruck 36,3%, Diabetespatienten ohne Bluthochdruck 20,6 - 29,2%, Patienten ohne Diabetes mit Bluthochdruck 19,8%, Patienten ohne Diabetes und Bluthochdruck 13,3 – 15,6%. Die Beziehung zwischen Höhe der Albuminausscheidung und Maß der Komorbidität verlief hierbei linear. Die Daten zeigen, dass die Mikroalbuminurie in der öffentlichen Gesundheitsversorgung einen ernstzunehmenden Faktor darstellt, von dem rund jeder fünfte Patient betroffen ist (Bramlage et al., 2007). Ähnliche Studien, mit vergleichbaren Ergebnissen, wurden in den USA, Kanada und einigen europäischen Ländern durchgeführt (Atkins et al., 2005; Gerstein et al., 2001; Hillege et al., 2001; Parving et al., 2006).

Bei der Betrachtung der Verteilung von kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität fällt außerdem auf, dass Männer deutlich häufiger betroffen sind als Frauen. Auch eine erhöhte Albuminausscheidung lässt sich bei Männern gut zwei Mal so häufig nachweisen, wie bei Frauen; ein Phänomen, das heute noch nicht hinreichend erklärbar ist (Verhave et al., 2003).

Wie bei anderen komplexen Erkrankungen besteht auch bei der Albuminurie neben diversen äußeren Einflüssen eine genetische Komponente bei der Manifestation und Ausprägung der Krankheit. Eine Studie, die den Phäno- und Genotyp von 2589 Personen aus hypertensiven Familien untersuchte, fand Hinweise für Albuminurie-regulierende Gene auf den Chromosomen 19 und 12 (Freedman et al., 2003). Eine andere, im Rahmen der Framingham Heart Study durchgeführte Studie, fand dagegen

auf Chromosom 8 eine Region, für welche die wahrscheinlichste Assoziation mit  $U_{A1b}$  bestand (Fox et al., 2005). Weitere Albuminurie-regulierende Regionen beim Menschen sind auf Chromosom 13 (Freedman et al., 2008), 20 (Arar et al., 2007), 2, 15 (Iyengar et al., 2007), 7 (Iyengar et al., 2007; Krolewski et al., 2007), 5 und 22 (Krolewski et al., 2007) beschrieben. Da bei diesen Studien unterschiedliche Populationen mit verschiedenen Grunderkrankungen betrachtet wurden, ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse nur bedingt möglich.

Große interindividuelle Unterschiede, sowohl den genetischen Kontext betreffend, als auch bezüglich Umwelteinflüssen und Lebensführung, begründen die Limitation humaner Studien. Die hohe Prävalenz der Mikroalbuminurie in der Bevölkerung und ihre gleichzeitige Brisanz im Rahmen von Nieren- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen machen jedoch eine sorgfältige Erforschung von genetischen Ursachen und Pathomechanismen notwendig, um zukünftig möglichst frühzeitig in das Krankheitsgeschehen eingreifen zu können.

## **1.2. Tiermodelle zur Untersuchung komplexer Erkrankungen**

Bei der Suche nach Chromosomenregionen, welche ein oder mehrere Gene umfassen, die die Ausprägung komplexer Erkrankungen beeinflussen, so genannten QTL (Quantitative Trait Loci), stellen ingezüchtete Rattenmodelle eine interessante Alternative zu klinischen Studien dar.

Um einen ingezüchteten Stamm zu generieren, bei dem ein bestimmter Phänotyp genetisch fixiert ist, werden solche Tiere einer Kolonie, welche den Phänotypen von Interesse zeigen, gezielt untereinander verpaart, bis sämtliche Nachkommen diesen Phänotyp aufweisen. Nach ca. 20 Generationen kontrollierter Bruder-Schwester Verpaarung unter diesen Nachkommen, wird eine fast vollständige genetische Homogenität von über 99% innerhalb des neu etablierten Stammes erzielt (Kreutz, Hübner 2002).

Auf diese Weise konnten in den vergangenen Jahrzehnten zahlreiche verschiedene Inzuchtstämme entwickelt werden, welche verschiedene Krankheiten wie kardiovaskuläre-, Nieren- oder Stoffwechselerkrankungen als ein spontan auftretendes- oder induzierbares Merkmal aufweisen. Hierbei stellt jeder ingezüchtete Stamm einen eigenen Subtyp der jeweiligen komplexen Erkrankung dar. Aufgrund der gut

bestimmbaren genetischen Homogenität sowie regulierbarer Umwelteinflüsse erlauben ingezüchtete Rattenstämme gezielte Kreuzungsexperimente im Rahmen von genetischen Kosegregations- und Kopplungsanalysen, welche humanen Studien weit überlegen sind (Kreutz, Hübner 2002).

### 1.3. Die Rattenmodelle MWF und SHR

Die Munich Wistar Frömter-Ratte (MWF) ist Beispiel eines ingezüchteten Rattenstammes, welcher für die Erforschung genetischer Grundlagen und Pathomechanismen von chronischen Nierenerkrankungen besonders geeignet ist. Der Inzuchtstamm MWF wurde seit 1978 als Sublinie der Munich Wistar-Ratte für den Phänotypen „subkapsuläre Glomeruli“ gezüchtet, um die Durchführung von Mikropunktionsstudien zu erleichtern (Hackbarth et al., 1980). Es konnte ein Tiermodell etabliert werden, bei welchem sich Glomeruli direkt unter der Nierenoberfläche im Cortex corticis befinden, einer Zone die normalerweise keine Glomeruli enthält (Hackbarth et al., 1983).

Phänotypische Untersuchungen des MWF-Stammes zeigten, dass die Tiere neben dem Vorkommen subkapsulärer Glomeruli eine Vergrößerung des Bowmann'schen Kapseldurchmessers sowie eine spontane Hypertonie und frühzeitige Proteinurie aufweisen (Hackbarth et al., 1983; Hackbarth et al., 1991). Bei der Proteinurie macht Albumin den größten Anteil der ausgeschiedenen Proteine aus (Remuzzi et al., 1992). Kreuzungsexperimente mit nierengesunden Wistar-Ratten ergaben eine Korrelation von Bluthochdruck und Proteinurie mit der Anzahl subkapsulärer Glomeruli (Hackbarth et al., 1991). Eine weitere Auffälligkeit der MWF-Ratte ist eine verglichen mit Lewis- und Wistar-Ratten um 27-50% verminderte Anzahl der Gesamt-Nephronen (Kaufmann, Hackbarth 1990; Fassi et al., 1998). Außerdem kommt es bei den Tieren im Verlauf der mit zunehmendem Alter progredienten Nephropathie zur Ausbildung einer leichten Glomerulosklerose (Fassi et al., 1998)

Der MWF Inzuchtstamm wird seit 1996 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhold Kreutz, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (CBF) untersucht. Die phänotypischen Eigenschaften des Stammes konnten durch verschiedene Studien bestätigt werden (Kreutz et al., 2000; Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003; Schulz et

al., 2007; Schulz et al., 2008). Zusätzlich zur Glomerulosklerose wurde die Entwicklung einer tubulointerstitiellen Schädigung und renaler interstitieller Fibrose nachgewiesen (Schulz et al., 2003). Gegenüber SHR-Männchen weisen die MWF-Männchen eine um 27% reduzierte Anzahl der Gesamt-Nephronen auf (Schulz et al., 2007).

Wie auch beim Menschen kann bei vielen Ratteninzuchtstämmen ein geschlechtsspezifischer Effekt bei der Ausprägung von kardiovaskulären Krankheiten beobachtet werden. Die Ursachen hierfür sind noch recht unerforscht. Bei der MWF-Ratte drückt sich dieser sexuelle Dimorphismus in einer geringeren Ausprägung der Hypertonie, sowie einer weit moderateren Albuminexkretion im Urin und dem Ausbleiben einer Glomeruloskleroseentwicklung bei den Weibchen aus (Kreutz et al., 2000; Remuzzi et al., 1988; Schulz et al., 2008). Im Vergleich zu nierengesunden Wistar-Weibchen zeigen jedoch auch MWF-Weibchen eine deutliche Reduktion der Gesamt-Nephronenanzahl (Remuzzi et al., 1988; Remuzzi et al., 1998). Möglicherweise liegt bei den Weibchen ein protektiver Faktor vor, der die Progression einer Nephropathie verhindert.

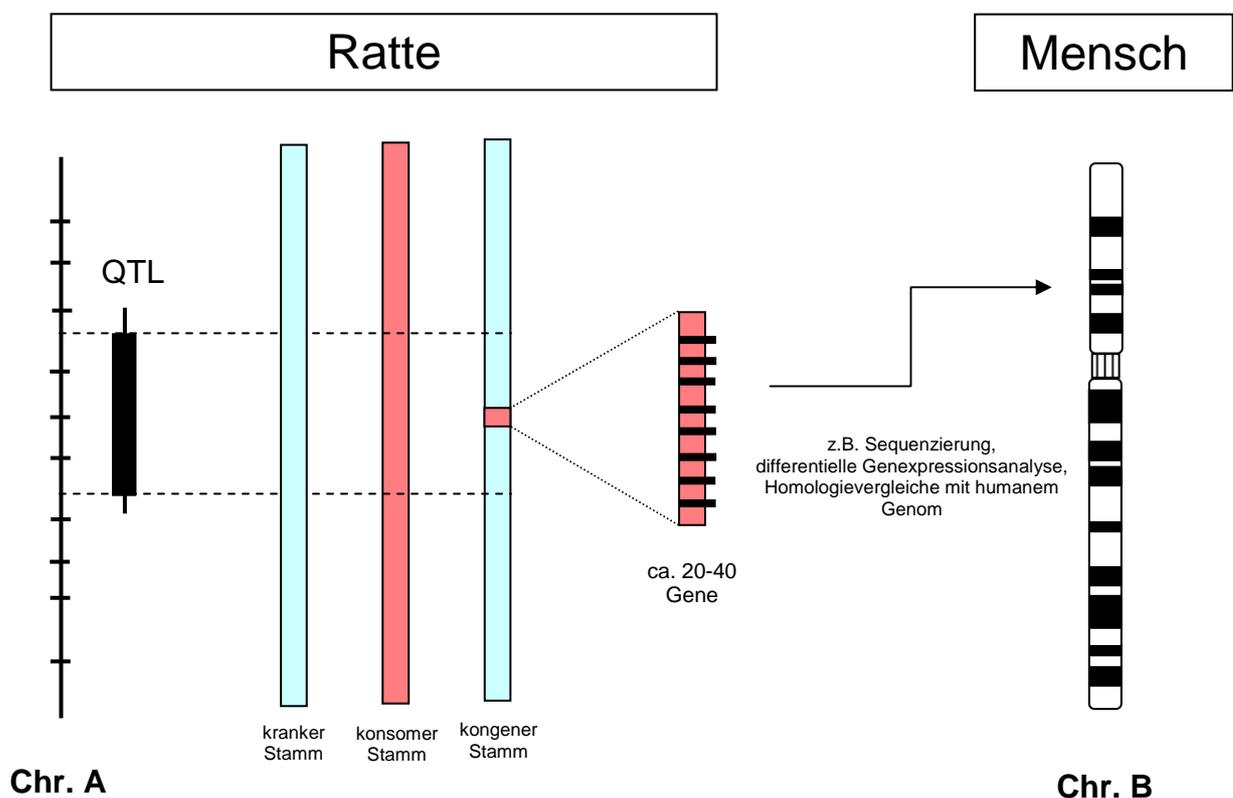
Der weltweit am häufigsten verwendete Ratteninzuchtstamm zur Erforschung kardiovaskulärer Krankheiten ist die Spontan Hypertensive-Ratte (SHR). Dieser Stamm wurde 1963 von Okamoto und Aoki, von der Wistar-Ratte ausgehend, etabliert (Okamoto, Aoki 1963, Pinto et al., 1998). Bei diesen Tieren manifestiert sich im Alter von 5 bis 6 Wochen ein spontaner Bluthochdruck, der bei adulten Männchen auf systolische Werte von 180 – 200 mmHg ansteigt (Pinto et al., 1998). Obgleich bei SHR-Ratten im Vergleich zu Wistar-Ratten eine verminderte Glomerulianzahl vorliegt, weisen die Tiere eine histologisch gesunde Nierenstruktur mit nicht vergrößerten Glomeruli auf (Skov K et al., 1994). Auch eine erhöhte Albuminausscheidung über den Urin lässt sich bei der SHR-Ratte nicht nachweisen (Poyan Mehr et al., 2003; Schulz et al., 2003). Vaskuläre Fehlfunktionen, welche häufig im Zusammenhang mit Bluthochdruck beobachtet werden, und die zu Schlaganfall, Atherosklerose sowie Thrombosen führen können, sind ebenso untypisch für dieses Tiermodell (Pinto et al., 1998).

#### 1.4. Identifizierung krankheitsrelevanter Genloci bei komplexen Krankheiten

Eine erfolgreiche Methode zur Identifizierung unbekannter Genloci komplexer Krankheiten ist die Kosegregations- und Kopplungsanalyse. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der gekoppelten Vererbung von Krankheitsgenen mit bestimmten Mikrosatelliten. Eine ausreichend große Studienpopulation ist Voraussetzung. Bei Mikrosatelliten handelt es sich um überwiegend innerhalb nicht kodierender Abschnitte vorkommender, sich wiederholender Sequenzen von Di-, Tri- oder Tetranukleotiden, die zwischen unterschiedlichen Ratteninzuchtstämmen polymorph sein können. Da die Mikrosatelliten auf den Rattenchromosomen (RNO1-20 + Gonosomen) gut kartiert sind, können sie als Marker dienen. Aus zwei phänotypisch kontrastierenden ingezüchteten Stämmen wird eine heterozygote F1-Generation generiert. Anschließend wird eine F2-Generation oder durch Rückkreuzung mit Parentaltieren eine Backcrossgeneration gezüchtet. Mikrosatellitenmarker, die sehr dicht am Krankheitslocus liegen, kosegregieren mit dem Phänotyp, während weiter entfernt liegende Marker unabhängig vom Phänotyp vererbt werden. Das gesamte Genom der F2- oder Backcrosstiere wird im ungefähren Abstand von 10 cM untersucht und die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung von Markern mit dem Phänotypen mit Hilfe eines Computerprogramms (Mapmaker) errechnet. Diese, als Logarithmus ausgedrückte Zahl nennt sich LOD-Score (Rapp 2000, Kreutz, Hübner 2002). Nach Lander und Kruglyak liegt bei der Backcrossgeneration eine wahrscheinliche Kopplung zwischen Mikrosatellit und Krankheitslocus bei einem LOD-Score von  $\geq 1,9$  und eine signifikante Kopplung bei einem LOD-score von  $\geq 3,3$  vor. Wird eine F2- Generation betrachtet ist ab einem LOD-Score von  $\geq 2,8$  eine wahrscheinliche- und ab einem LOD-Score von  $\geq 4,3$  eine signifikante Kopplung gegeben (Lander, Kruglyak 1995).

Zur Verifizierung beschriebener QTL werden konsome Stämme entwickelt, bei denen das QTL-tragende Chromosom von einem ingezüchteten Stamm in den isogenetischen Hintergrund des kontrastierenden Stammes überführt wird. Hierfür werden zwei Parentaltiere der kontrastierenden ingezüchteten Stämme zu einer heterozygoten F1-Generation verpaart. Es folgt eine Serie von Rückkreuzungen jeder Filialgeneration mit dem Empfängerstamm (Backcross). Bei der Auswahl der Tiere wird die natürliche genetische Varianz innerhalb jeder Backcross-Generation ausgenutzt. Durch markergestützte Genomanalyse werden jeweils solche Tiere zur Weiterzucht gewählt,

die das Zielchromosom in heterozygoter Form tragen und zusätzlich für alle Hintergrundchromosomen ein möglichst homozygotes Empfänger-genom aufweisen. Nach 4 bis 8 Backcross-Generationen ist eine Generation entstanden, deren genetischer Hintergrund zu über 99% dem des Empfängerstammes entspricht, und das transferierte Spenderchromosom in heterozygoter Form aufweist. Werden zwei solche Tiere der letzten Backcross-Generation durch Bruder-Schwester-Verpaarung miteinander gekreuzt, finden sich unter den Nachkommen konsome Tiere, welche für alle Allele des Empfänger-genoms homozygot sind und auch ein homozygotes Spenderchromosom in ihrem Genom tragen. (Cowley et al., 2004; Kreutz, Hübner, 2002; Wakeland et al., 1997).



**Abb. 2: Identifizierung krankheitsrelevanter Gene bei polygenetischen Erkrankungen.**

QTL die im Tiermodell ermittelt wurden, können durch Züchtung konsomer Stämme verifiziert werden. Kongene Stämme ermöglichen eine Eingrenzung des QTL auf unter 1 cM, wodurch eine effiziente Suche nach Kandidatengenen erfolgen kann. Durch Homologievergleiche mit dem humanen Genom können entsprechende chromosomale Regionen beim Menschen detektiert werden.

Chr. = Chromosom

Ausgehend von konsomen Tieren können in der Folge kongene Linien etabliert werden, bei denen der Senderchromosomenabschnitt verkleinert wird. Auf diese Weise ist eine Eingrenzung des Krankheitslocus auf einen Bereich, der kleiner als 1 centiMorgan ( $1 \text{ cM} = 2 \times 10^6$  Basenpaare ca. 40 Gene) ist, möglich (Kreutz, Hübner, 2002).

Die Identifizierung krankheitsverursachender Gene, zum Beispiel durch nachfolgende differentielle Genexpressionsanalysen, kann auf diese Weise durch die gezielte Betrachtung bestimmter Gene weitaus effizienter durchgeführt werden. Durch Homologievergleiche mit dem humanen Genom könnten wichtige Rückschlüsse auf analoge pathogene Mechanismen im menschlichen Körper gezogen werden. Aufgrund der so gewonnenen Erkenntnisse wird es möglich kausale, patientenangepasste Therapiekonzepte und Präventionen zu entwickeln (Stoll et al., 2000) (Abb. 2).

### **1.5. Albuminurie-QTL bei der Ratte**

Tierexperimentelle Untersuchungen bei der Ratte unter Verwendung der Kosegregations- und Kopplungsanalyse führten bislang zu der Identifizierung von über 270 wahrscheinlichen und signifikanten Blutdruck-QTL auf verschiedenen Chromosomen (Cowley 2006; Rapp 2000). Auch bei der Suche nach Albuminurie-QTL konnte diese Methode bereits erfolgreich angewendet werden. Fünf ingezüchtete proteinurische Rattenmodelle, die Fawn-hooded hypertensive-Ratte (Brown et al., 1996; Shiozawa et al., 2000), die Dahl salz-sensitive-Ratte (Garett et al., 2003; Garrett et al., 2006; Poyan Mehr et al 2003; Siegel 2004), die Buffalo/Mna-Ratte (Murayama S et al., 1998), die Sabra-Ratte (Yagil et al., 2006) und die MWF-Ratte (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003) wurden in verschiedenen Kosegregations- und Kopplungsanalysen mit nierengesunden Kontraststämmen gekreuzt. Hierbei konnten auf insgesamt 14 Chromosomen verschiedene Albuminurie-QTL detektiert werden. Die Vielzahl der beschriebenen QTL bestätigt den polygenetischen Einfluss bei der Albuminurieentstehung. Hierbei scheint die Auswirkungen der einzelnen Gene auf die  $U_{\text{Alb}}$  relativ gering zu sein und von Gen-Gen-Interaktionen abzuhängen (Schulz et al., 2007).

Aufgrund ihres komplexen Phänotyps, sowie einer Pathogenese, die den Vorgängen bei menschlichen Nierenerkrankungen recht ähnlich ist, ist die MWF-Ratte ein ausgesprochen interessantes Tiermodell zur Erforschung von Nephropathien.

Untersuchungen zur Identifizierung krankheitsrelevanter Genloci der MWF-Ratte wurden erstmals in dieser Arbeitsgruppe unternommen (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). In einer der vorliegenden Arbeit vorangehenden Studie wurde eine Kosegregations- und Kopplungsanalyse zwischen MWF- und SHR-Ratten durchgeführt. Mindestens acht QTL konnten in Zusammenhang mit Albuminurie identifiziert werden, mit besonders eindeutigen Ergebnissen für Chromosom 6 und 8. Beide QTL sind zusammen für 33,5% der Varianz der Albuminausscheidung verantwortlich (Schulz et al., 2003). Während das QTL auf RNO6 mit einer frühzeitig einsetzenden Albuminurie assoziiert ist, ist für das QTL auf RNO8 eine Kopplung mit Albuminurie ab der 14. Woche feststellbar. Um die Relevanz der beiden QTL getrennt zu bestimmen, wurden in der Folge die konsomen Rattenstämme MWF-6<sup>SHR</sup> und MWF-8<sup>SHR</sup> durch selektive Züchtung etabliert. Bei diesen Tieren wurde das gesamte Chromosom 6 bzw. 8 der SHR-Ratte in den isogenetischen Hintergrund der MWF-Ratte überführt. In einer kürzlich von der Arbeitsgruppe veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung einer früh einsetzenden  $U_{\text{Alb}}$  im konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm in der 8. Woche vollständig unterdrückt werden konnte. Auch die für MWF typischen strukturellen Nierenveränderungen und die verminderte Nephronenzahl war im konsomen Stamm normalisiert (Schulz et al., 2007).

## 1.6. Ziel der Arbeit

Bluthochdruck und Mikroalbuminurie stellen zwei individuelle, interagierende Hauptrisikofaktoren für die Morbidität und Mortalität von Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar. Die Niere nimmt als wichtigstes Regulatororgan des Wasser- und Elektrolythaushalts eine zentrale Stellung in deren Pathogenese ein. Ein großer Einfluss bei der Ausbildung kardiovaskulärer Erkrankungen wird genetischen Faktoren zugesprochen, welche für die Entwicklung eines Nierenschadens prädisponieren können. Geeignete Tiermodelle mit uniformem, genetischem Hintergrund ermöglichen die gezielte Erforschung physiologischer Abläufe sowie zugrunde liegender genetischer Ursachen und können zum Gewinn wichtiger Grundlagenerkenntnisse erheblich beitragen.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die phänotypische Charakterisierung des konsomen Stammes MWF-8<sup>SHR</sup>, um den Einfluss des QTL auf RNO8 auf die Entwicklung und Progression der frühzeitigen und adulten Albuminurie, sowie dessen mögliche Assoziation mit strukturellen Veränderungen in der Niere zu ermitteln.

Über einen Zeitraum von 32. Wochen wurde eine Altersverlaufsstudie durchgeführt und zu verschiedenen Messzeitpunkten die Parameter Blutdruck und Albuminausscheidung bestimmt. Am Ende der Studie wurden zusätzlich organspezifische und klinisch-chemische Daten sowie Daten zur Nierenhistologie erhoben. Alle Ergebnisse wurden mit denen der Parentaltiere verglichen. Aufgrund des bei MWF- und SHR-Ratten vorliegenden sexuellen Dimorphismus wurden beide Geschlechter getrennt betrachtet, um einen möglichen geschlechtsrelevanten Einfluss von RNO8 nicht zu übersehen.

In einem zweiten Schritt wurde eine konsome F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>)-Generation untersucht. Bei diesen Tieren liegt das RNO8 in heterozygoter Form vor. Analog zu den MWF-8<sup>SHR</sup>-Tieren wurde eine Altersverlaufsstudie der Albuminexkretion durchgeführt. Der Gendosiseffekt bzw. eine Rezessivität oder Dominanz der überführten Allele sollte hierdurch ermittelt werden.

Da das QTL auf RNO8 mit ca. 30 cM einen relativ großen Bereich des Chromosoms umfasst, wurde in der Arbeitsgruppe mit der Züchtung kongener Linien mit unterschiedlich großem Spenderchromosomenabschnitt begonnen. Bislang gelang es 4 kongene Linien zu etablieren. Teil dieser Arbeit war die Bestimmung der Albuminausscheidung dieser Tiere in der 8. Woche zur weiteren Eingrenzung des QTL. Auf Grundlage der hier gewonnenen Ergebnisse sollen in der Folge weitere kongene Stämme gezüchtet werden, so dass eine zusätzliche Einengung der Zielregion erfolgen kann. Hierdurch wird eine anschließende gezielte Suche nach Kandidatengenen möglich.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien

| Substanz  | Firma              |
|---|--------------------|
| Agarose   | Roth               |
| Albumin, Rat; Polyklonaler Antikörper, Anti-Rat     | ICN                |
| Bromphenolblau                                      | Merck              |
| Chlorophorm   | Sigma              |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC)                          | Sigma              |
| Diethylmalonsäure (98%)                             | Aldrich            |
| Di-Natrium-EDTA-Dihydrat                            | Roth               |
| Di-Natriumhydrogenphosphat                          | Merck              |
| Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat                 | Merck              |
| dNTP's (2,5 mM)                                     | Rapidozym          |
| Essigsäure (100%)                                   | Merck              |
| Ethanol (100%)                                      | J.T. Baker         |
| Ethidiumbromid (10 mg/ml)                           | Merck              |
| Formaldehyd (37%)                                   | J.T. Baker         |
| Gelantine (75 bloom)                                | Sigma              |
| Glycerin  | Roth               |
| Isopropanol   | Sigma              |
| Kaliumchlorid                                       | Merck              |
| Kaliumdihydrogenphosphat                            | Merck              |
| Methanol  | J.T. Baker         |
| Natriumchlorid                                      | Merck              |
| Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat                  | Merck              |
| Natriumdihydrogenphosphat                           | Merck              |
| Natriumdihydrogencarbonat                           | Aldrich            |
| Perjodsäure   | Merck              |
| Ratten-Serum-Albumin (RSA)                          | Sigma              |
| 5x Reaction buffer                                  | Fermentas          |
| Schiffreagenz                                       | Merck              |
| Schwefelsäure (96%)                                 | Merck              |
| Sirius Rot  | Chroma             |
| TaqMan 2x Universal PCR MasterMix                   | Applied Biosystems |
| 3,3', 5,5' Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid (TMB) | Sigma              |
| Trizma Base   | Sigma              |
| Trizol  | Invitrogen         |
| Tween 20  | Roth               |
| Wasserstoffperoxid (30%)                            | Sigma              |
| Xylen Cyanol FF                                     | Sigma              |

## 2.1.2. Puffer und Lösungen

| Puffer/Lösung                    | Bestandteile  | Konzentration   |
|----------------------------------|---|---|
| 5x PBS-Puffer                    | Natriumchlorid<br>Kaliumdihydrogenphosphat<br>Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat<br>Aqua bidest.       | 218,75 g<br>5,375 g<br>35,0 g<br>ad 5 l, pH 7,4                         |
| 10x Laufpuffer                   | Glycerin<br>Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat<br>Bromphenolblau<br>Xylen Cyanol FF                     | 50 %<br>10,0 mM, pH 7,0<br>0,25 %<br>0,25 %                             |
| 50x TAE                          | Trizma Base<br>Essigsäure (100%)<br>Di-Natrium-EDTA-Dihydrat  | 2,0 M<br>5,71%<br>50,0 mM   |
| Coating solution                 | Rattenserum-Albumin<br>Natriumhydrogencarbonat  | 0,2 mg/ml<br>0,1 M  |
| Formaldehydphosphat-Puffer       | Formaldehyd (37%)<br>Dinatriumhydrogenphosphat<br>Natriumdihydrogenphosphat<br>Aqua bidest.             | 10,8%<br>5,8%<br>4,2%<br>79,2%  |
| Methacarn                        | Methanol<br>Chloroform<br>Essigsäure  | 60 %<br>30 %<br>10 %  |
| Phosphat Puffer                  | Dinatriumhydrogenphosphat<br>Natriumdihydrogenphosphat<br>Aqua bidest.                                  | 5,8%<br>4,2%<br>90%   |
| Puffer A                         | Diethylmalonsäure<br>Natriumchlorid<br>Di-Natrium-EDTA-Dihydrat<br>Tween 20<br>Gelatine<br>Aqua bidest. | 20,0 mM<br>150,0 mM<br>0,1 mM, pH 8,0<br>0,1 %<br>5 g<br>ad 1 l, pH 7,4 |
| Rattenserum-Albumin-Stock-Lösung | Rattenserum-Albumin<br>Natriumhydrogencarbonat  | 1,0 mg/ml<br>0,1 M  |
| Substrat                         | 3,3',5,5'-TMB- Dihydrochlorid<br>Aqua bidest.<br>Puffer A<br>Wasserstoffperoxid 30 %                    | 2 Tabletten<br>10 ml<br>10 ml<br>4 µl                                   |

## 2.1.3. Primer und Sonden für die TaqMan-PCR

| Gene         | Name  | Sequenz  | Firma   |
|--------------|---|--|---------|
| Kollagen III | Kollagen3-F<br>Kollagen3-R<br>Kollagen3-Sonde | TGTTAACGGACAAATAGAGAGTCTTATCAG<br>CATCTTGCAGCCTTGGTTAGG<br>FAM-TTCTGCCACCCTGAACTCAAGAGCG-TAMRA   | Proligo |
| PBGD         | PBGD-F<br>PBGD-R<br>PBGD-Sonde                | TGAAAACCTTGTACCCTGGCATA<br>TCCAATCTTAGAGAGTGCAGTATCAAGA<br>FAM-TTGAATCATTGCTATGTCCACCACAGG-TAMRA | Proligo |

2.1.4. Enzyme

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

2.1.5. Betäubungsmittel

| Substanz                                    | Firma  |
|---|--------|
| Esketaminhydrochlorid (KetanestS®) 25 mg/ml | Pfizer |
| Xylazinhydrochlorid (Rompun®) 2%            | Bayer  |

2.1.6. Materialien und Futtermittel

| Artikel  | Firma          |
|--|----------------|
| Braunüle (22G)                                     | BD Biosciences |
| Haltungsfutter für Ratten und Mäuse (Normalfutter) | Altromin       |
| Kanülen  | BD Biosciences |
| Lochzange für Labortiere                           | Esculap        |
| Makrolonkäfige Typ III und Typ IV                  | Ebeco          |
| Objektträger                                       | Menzel-Gläser  |
| PCR-Tubes 0,2 ml                                   | Biozym         |
| Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml   | Eppendorf      |
| Restrainer   | Werkstatt UKBF |
| Standardpipetten                                   | Eppendorf      |
| Einwegspritzen aus Kunststoff (20 ml)              | BD Biosciences |
| Standardtips 20 µl, 100 µl, 1000 µl                | Eppendorf      |
| Stoffwechselkäfige für Ratten bis 300 g            | Ehret          |
| Szintillationsgefäße aus Glas (für die Histologie) | Packard        |
| Szintillationsgefäße aus Kunststoff                | Packard        |
| Thermo-Fast 96-Mikrotiterplatten (ohne Rand)       | ABgene         |
| Verpackungsfolie                                   | Saran          |

2.1.7. Geräte und Software

| Artikel                                  | Firma              |
|--|--------------------|
| ABI Prism 7000 Sequence Detection System | Applied Biosystems |
| Agarose-Gelkammer                        | Bio-Rad            |
| Analysen-Waage BP 610                    | Sartorius          |
| Analytik Software                        | SPSS               |
| Bildanalyseprogramm Scion Image 1.62a    | Scion Co.          |

| Artikel                               | Firma                  |
|---------------------------------------|------------------------|
| Blutdruckmessgerät                    | TSE                    |
| ELISA-MRX-Plate-Reader                | Dynex                  |
| Färbeautomat Robot-Stainer HM 760     | Microm                 |
| Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R          | Heraeus Sepatech       |
| Magnetrührer mit Heizfunktion MR 2002 | Heidolph               |
| Mikrotiterplattenschüttler            | Roth                   |
| PCR-Cycler                            | MJ Research            |
| pH-Meter                              | Knick                  |
| Photometer UV-1202                    | Shimadzu               |
| Photomikroskop Axiophot               | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Präparationsbesteck                   | Aesculap               |
| Rotationsmikrotom HM 355              | Microm                 |
| Tischzentrifuge 5415 R                | Eppendorf              |
| Trockenschrank                        | Heraeus Instruments    |
| Ultra Turrax T25                      | Janke & Kunkell        |

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Parentaltiere

Im Jahr 1996 übernahm die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhold Kreutz, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (CBF), Tiere der MWF/Ztm-Kolonie des Zentralen Tierlaboratoriums der Medizinischen Hochschule in Hannover. Die Tiere wurden in der Arbeitsgruppe als eigene Kolonie weitergeführt und in der Folge als MWF/<sub>Rkb</sub> bezeichnet. Die SHR/<sub>Rkb</sub>-Ratten entstammen der Kolonie von SHR/Mol-Ratten der Firma M&B, Bomholtvej, Dänemark und wurden 1997 in die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kreutz eingeführt.

Die Erhaltungszucht der beiden Inzuchtstämme MWF/<sub>Rkb</sub> und SHR/<sub>Rkb</sub> erfolgt an der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

### 2.2.2. Haltung

Alle für diese Arbeit verwendeten Tiere wurden an der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM), in Absprache mit dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, CBF, unter streng standardisierten und kontrollierten Bedingungen gehalten. Diese beinhalteten ein konstantes Raumklima von 22°C, einen regelmäßigen, durch eine automatische Lichtanlage imitierten, 12 h Tag-Nacht Zyklus sowie freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Unterbringung erfolgte, nach

Geschlechtern getrennt, in Makrolonkäfigen Typ IV mit maximal 4 Tieren pro Käfig. Für Verpaarungen wurden Makrolonkäfige Typ III benutzt.

Zur Kennzeichnung wurden die Tiere nach dem Absetzen von der Mutter im Alter von 4 Wochen systematisch fortlaufend nummeriert und unter Verwendung einer Lochzange eine entsprechende Ohrmarkierung vorgenommen.

### 2.2.3. Zuchten

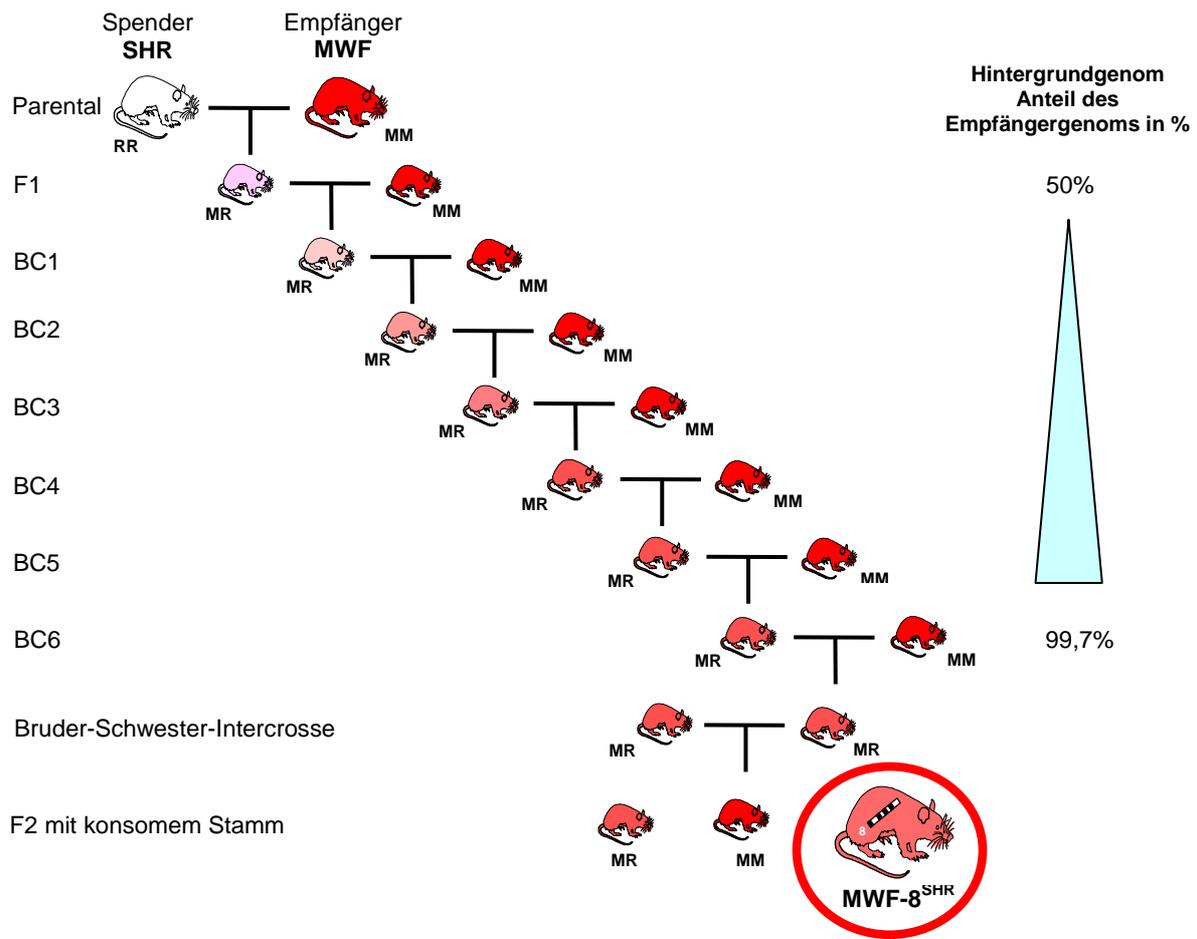
#### a) Zucht des konsomen Stammes MWF-8<sup>SHR</sup>

In Vorarbeiten gelang es der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kreutz den konsome Stamm MWF-8<sup>SHR</sup> zu etablieren. Die Zucht erfolgte ausgehend von den Parentaltierstämmen MWF/<sub>Rkb</sub> und SHR/<sub>Rkb</sub> nach dem Prinzip seriellen Rückkreuzens und markergestützter Selektion (Schulz et al., 2008).

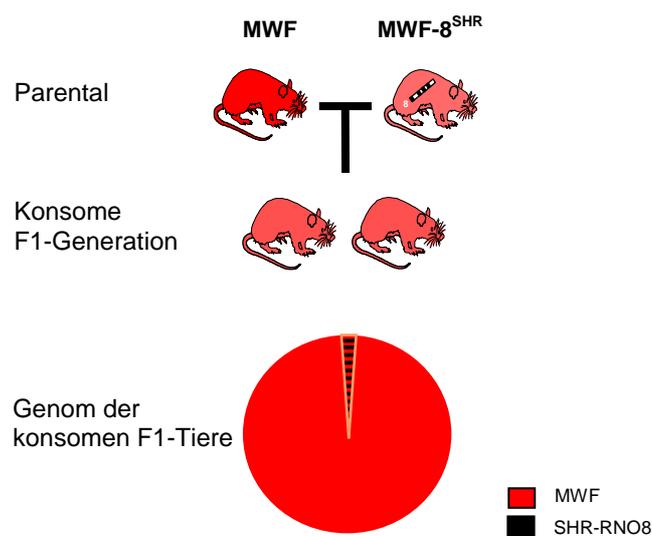
Um das Y-Chromosom vom Empfängerstamm MWF in allen männlichen Nachkommen zu fixieren, wurde initial ein MWF-Männchen mit einem SHR-Weibchen zur F1-Generation verpaart. Ein Männchen dieser F1-Generation wurde mit vier MWF-Weibchen zur ersten Backcross-Generation verpaart. Ein Männchen der folgenden Backcross-Generationen wurde seinerseits wieder mit vier MWF-Weibchen zur jeweils nächsten Backcross-Generation verpaart. Nach 6 Generationen wurde der konsome MWF-8<sup>SHR</sup> etabliert. Bei diesen Tieren liegt RNO8 von SHR homozygot vor. Alle anderen Chromosomen entsprechen dem Genom von MWF (Abb. 3).

#### b) Zucht des F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>)-Stammes

Durch Paarung von drei weiblichen konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Tieren mit einem männlichen MWF-Tier wurde eine konsome F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>)-Generation etabliert. Die konsomen F1-Tiere tragen ein SHR RNO8 und ein MWF RNO8. Das Chromosom 8 liegt demzufolge in heterozygoter Form vor. Der übrige genetische Hintergrund der konsomen F1-Tiere entspricht dem von MWF (Abb. 4).



**Abb. 3:** Züchtung des konsomen Stammes MWF-8<sup>SHR</sup> durch serielles Rückkreuzen über 6 Generationen.  
 M = MWF-Allel; R = SHR-Allel; F = Filialgeneration; BC = Backcross-Generation

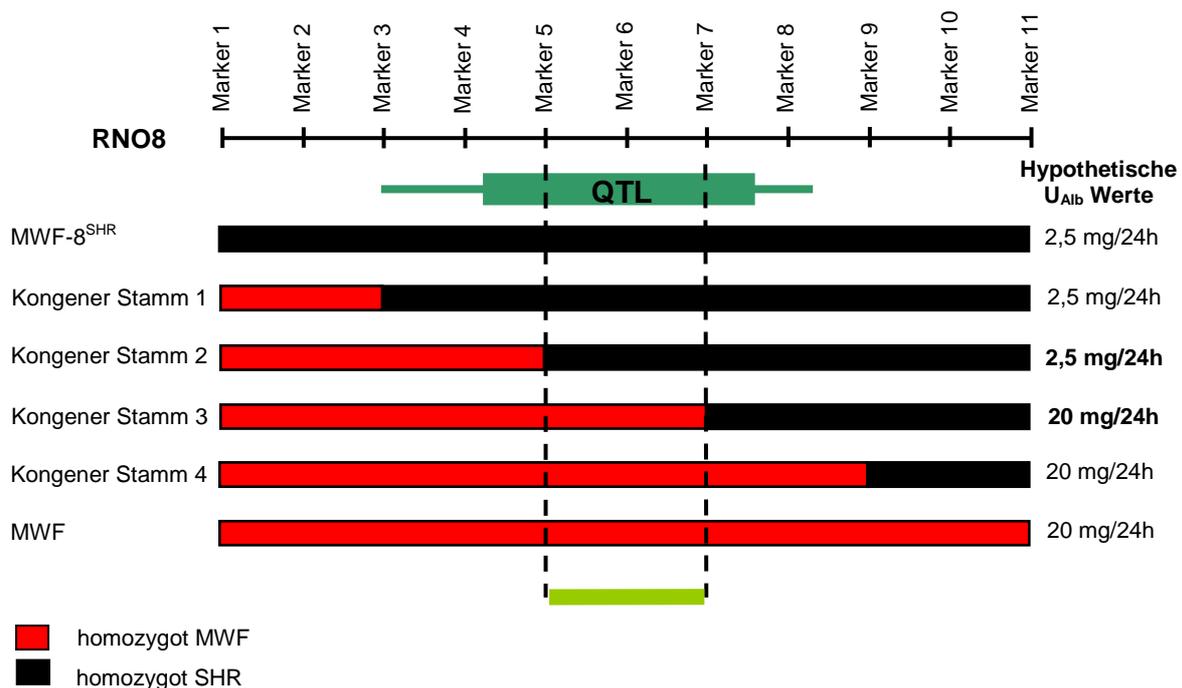


**Abb. 4:** Züchtungschema der F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>)-Generation.  
 Bei den konsomen F1-Tieren liegt nur RNO8 heterozygot vor.

## c) Zucht der kongenen Linien

Während der Zucht des konsomen Stammes MWF-8<sup>SHR</sup> wurden zusätzlich solche Tiere selektiert, die einen unterschiedlich langen Abschnitt des SHR RNO8 aufwiesen. Durch markergestützte Rückkreuzungen und weitere Selektion konnten hieraus kongene Linien gezüchtet werden. Diese tragen einen durch zwei begrenzende Marker definierten Abschnitt des SHR RNO8. Alle übrigen Allele sind MWF-Allele (Abb. 5).

Bislang konnten folgende kongene Linien mit zunehmend kleineren Abschnitten des Spenderchromosoms in der Arbeitsgruppe etabliert werden: MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat163), MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat46), MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat35) und MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat19). Der Marker D8Rat71 gibt hierbei jeweils den Anfangspunkt des vorliegenden Abschnitts von SHR RNO8 an, der zweite Marker den Endpunkt. Die Größe des übertragenen Chromosomenfragments wurde durch Genotypisierung des entsprechenden Chromosoms nachgewiesen.



**Abb. 5:** Prinzip der QTL-Eingrenzung mittels kongener Stämme. Die Balken stellen beispielhaft die Allelverteilung auf RNO8 bei Parentaltierstämmen und kongenen Linien dar.

#### 2.2.4. Studiendesign

##### a) MWF-8<sup>SHR</sup> Altersverlaufsstudie

Für die MWF-8<sup>SHR</sup> Altersverlaufsstudie wurden je 18 männliche und weibliche Ratten bis zur 24. Woche untersucht. Die Hälfte dieser Tiere, 9 männliche sowie 9 weibliche, wurden weiter bis zur 32. Woche gehalten. Während dieses Intervalls wurde an 7 Zeitpunkten, in der 4., 8., 12., 14., 18., 24. sowie 32. Woche, ein 24h-Sammelurin für biochemische Analysen und die Bestimmung des altersabhängigen Verlaufs der Albuminausscheidung abgenommen. In der 14. und 24. Woche wurde der systolische Blutdruck der Tiere gemessen. Die Tiere wurden am Ende der Verlaufsstudie in der 24. und 32. Woche zur Organ- und Gewebsentnahme präpariert.

7 zusätzliche männliche MWF-8<sup>SHR</sup>-Tiere wurden bis zur 4. Woche gehalten. In diesem Alter wurden bei den Tieren zur Bestimmung der Gesamt-Nephronenzahl die Nieren präpariert.

##### b) F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>) Altersverlaufsstudie

Die F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>) Altersverlaufsstudie erfolgte mit je 10 männlichen und weiblichen Tieren. Ein 24h-Sammelurin wurde in der 4., 8., 14., 18., 24. und 32. Woche abgenommen. Durch Vergleiche der Werte der konsomen F1-Generation mit MWF-Tieren und dem konsomen Stamm, wurde der Dosisseffekt des heterozygoten RNO8 auf den Phänotyp untersucht.

##### c) Untersuchung der kongenen Linien

Zur Beurteilung der Albuminausscheidung der vier kongenen Linien wurde im Alter von 8 Wochen bei je 20 Tieren pro Stamm ein 24h-Sammelurin abgenommen und der Albumingehalt bestimmt.

#### 2.2.5. Blutdruckmessung

Die Messung des systolischen Blutdrucks wurde mittels der nicht invasiven Tailcuff-Methode an wachen Tieren vorgenommen. Diese Methode funktioniert entsprechend der Methode nach Riva-Rocci beim Menschen.

Über eine an der Schwanzwurzel platzierte Druckmanschette und einem distal von dieser platzierten Pulsaufnehmer wurde die Pulsationswelle der Schwanzarterie aufgezeichnet und der systolische Blutdruck durch eine automatisierte, computergestützte, oszillatorische Technik erfasst. Hierzu wurden der Druck, bei dem

die aufgepumpte Manschette eine Pulsation der Schwanzarterie unterband sowie der Druck, der bei darauf folgendem Erschlaffen der Manschette eine erneute Pulsation der Arterie ermöglichte, aufgezeichnet. Beide Werte wurden zu einem Blutdruckwert gemittelt.

Um die Ratten warm zu halten und zu starke Bewegungen zu verhindern, wurden diese während der Messungen in, an ihre Körpergröße angepasste, Röhren aus Polyacryl oder Metall gesetzt, welche dann in eine auf ca. 39°C temperierte Wärmebox platziert wurden. Es erfolgten 3-10 Probemessungen pro Ratte, um die Tiere an die neuen Verhältnisse zu adaptieren. Die Ergebnisse dieser Messungen wurden verworfen. Nach Eingewöhnung der Tiere wurde der Blutdruck jeder Ratte in drei getrennten Messungen bestimmt und die Ergebnisse dieser Messungen auf einen Computer gespeichert. Dieser Vorgang wurde an drei Tagen in der jeweiligen Woche unter gleichen Bedingungen und unter Berücksichtigung zirkadianer Rhythmen zu ähnlichen Zeiten durch dieselbe Person wiederholt. Die Ergebnisse aller Messungen wurden gemittelt.

#### 2.2.6. Uringewinnung in Stoffwechselkäfigen

Für die Beurteilung der mit dem Urin ausgeschiedenen Albuminmenge und der Erhebung klinisch-chemischer Daten wurde jeweils ein 24h-Urin gesammelt. Die Ratten wurden zu diesem Zweck einzeln unter ansonsten gleich bleibenden Haltungsbedingungen in Stoffwechselkäfige gesetzt. Durch eine einfache Konstruktion wird in diesen Käfigen der Urin getrennt von anderen Fäzes aufgefangen.

Der über 24 h gesammelte Urin wurde aus den Auffangbehältern in ein Szintillationsgefäß aus Kunststoff dekantiert, an dem sich Albumin nicht ablagert. Zur Volumenbestimmung der Urinmenge wurde der Urin ausgewogen, wobei davon ausgegangen wurde, dass 1 g Urin etwa 1 ml entspricht. Für die folgende Albuminbestimmung wurde je ca. 1 ml Urin nach gründlichem Durchmischen in vorbereitete 2,0 ml Eppendorfgefäße abgefüllt. Um Schmutzpartikel oder bakterielle Verunreinigungen zu entfernen, wurde das Eppendorfgefäß bei 900 Upm für 10 min bei RT zentrifugiert und der Überstand in ein weiteres Eppendorfgefäß dekantiert. Die restliche Urinmenge wurde bei -20°C in Szintillationsgefäßen aus Polyethylen aufbewahrt.

### 2.2.7. Messung der Albuminausscheidung

Die Messung der Albuminausscheidung erfolgte mittels eines, in der Arbeitsgruppe etablierten, direkten, kompetitiven Albumin-ELISAs (enzyme linked immunosorbent assay) (Schulz 2002). Bei dieser Methode wird in einem ersten Schritt gereinigtes Rattenalbumin als Antigen an eine als feste Phase fungierende Mikrotiterplatte gebunden. Nach Zugabe von Rattenurin sowie enzymgekoppelten Albumin-Antikörpern konkurrieren das im Urin enthaltene Albumin und das an die feste Phase gebundene Albumin um die Bindung an die Antikörper. In einer zweiten Reaktion wird ein Substrat durch das Enzym der an die feste Phase gebundenen Antikörper umgesetzt und das Produkt photometrisch bei 450 nm mittels eines ELISA-MRX-Plate-Readers gemessen. Über eine Eichgerade werden hieraus die Albuminwerte in den Proben errechnet.

### 2.2.8. Präparationen und Aufarbeitung von Organen und Geweben

Alle Tiere der MWF-8<sup>SHR</sup>-Verlaufsstudie wurden im Alter von 24 bzw. 32 Wochen zur Organ- und Gewebsentnahme präpariert. Vor der Präparation wurden sie gewogen. Um eine tiefe nebenwirkungsarme Narkose und Analgesie zu garantieren wurde den Tieren, angepasst an ihr Gewicht, 87 mg/kg KG S-(+)-Ketamin und 13 mg/kg KG Xylazin intraperitoneal injiziert. Zur Überprüfung der Wirksamkeit der Narkose wurden mit je ca. 30 Sekunden Abstand einige gezielte Schmerzreize gesetzt, bis eine Reaktion auf diese komplett ausblieb. Anschließend wurde das Abdomen mit einem Medianschnitt eröffnet und zur Plasma- und Serumgewinnung über eine Kanüle Blut aus der Aorta abdominalis entnommen. Dieses wurde sofort in auf Eis stehende 2,0 ml Eppendorfgefäße gefüllt.

Der Thorax der Tiere wurde eröffnet, das Herz entnommen und zum Beenden der Herzaktion in eine kardioplegische 1 molare Kaliumchloridlösung gegeben. Die Aorta wurde herauspräpariert, periaortales Gewebe entfernt und die Länge der Aorta gemessen. Danach wurden beide Nieren entnommen, von den Nierenkapseln befreit und gewogen. Die rechte Niere wurde mit einem Skalpell transversal am Nierenhilus halbiert und die eine Hälfte in einem 2,0 ml Eppendorfgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Fixierung für die histologische Aufbereitung wurde die zweite Nierenhälfte in ein vorbereitetes Methacarn-gefülltes Szintillationsgefäß aus Glas gelegt. Nach Erlöschen der Herzaktion wurde das Herzgewicht bestimmt und anschließend der rechte Ventrikel von Septum und linkem Ventrikel abpräpariert. Beide Ventrikel wurden ebenfalls gewogen.

Alle Gewebe und Organe wurden in 2,0 ml Eppendorfgläsern in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80°C gelagert. Das gewonnene Blut wurde nach der Präparation bei 6.000 Upm für 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dieser wurde ebenfalls schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Nierenhälften wurden für 24h unter Lichtverschluss in der Methacarnlösung belassen. Danach wurde das Methacarn verworfen, die Nierenhälften in 80%igen Ethanol gebracht und darin bis zu ihrer Paraffineinbettung gelagert.

Für die Bestimmung der Gesamt-Nephronenzahl wurde bei je sieben Tieren der beiden Parentaltierstämme sowie des konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>- Stammes in der 4. Woche eine Niere entnommen. Die Tiere wurden wie oben beschrieben narkotisiert. Das Abdomen wurde mit einem Medianschnitt eröffnet. Eine Braunüle (22 G) wurde in die Aorta eingeführt und die Tiere mittels einer 20 ml Spritze mit Phosphatpuffer perfundiert. Die Vena cava wurde mit einem kleinen Schnitt eröffnet, um einen Abfluss für Blut und Puffer zu ermöglichen. Mit der Puffer-Perfusion wurde so lange fortgefahren, bis die abfließende Flüssigkeit klar und die Tiere somit weitgehend blutleer waren. Anschließend wurde über denselben Zugang mit einer 20 ml Spritze mit 4% Formaldehyd-Phosphat-Puffer perfundiert, bis eine deutliche Fixierung erkennbar wurde. Die Nieren wurden entnommen und in 4% Formaldehyd-Phosphat-Puffer gefüllte Szintillationsgefäße aus Glas gelegt.

#### 2.2.9. Biochemische Analysen

Die Bestimmung der biochemischen Parameter erfolgte durch Standardmethoden im Labor 28 (Mecklenburgische Strasse 28, 14197 Berlin).

Aus den 24h-Urinen wurden die Kreatininkonzentrationen bestimmt. Durch zusätzliche Ermittlung der Kreatininkonzentration im Serum konnte die Kreatininclearance nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Kreatininclearance (ml/min)} = \frac{\text{Kreatinin im Urin (mmol/l)} * \text{Urinvolumen (ml)}}{\text{Sammelperiode (min)} * \text{Kreatinin im Serum (mmol/l)}}$$

Die Parameter Gesamtcholesterin, HDL, Triglyzeride und Harnstoff wurden ebenfalls im Serum der Ratten erhoben.

### 2.2.10. Bestimmung der Gesamt-Nephronenanzahl

Die Zählung der Nephrone an den Formaldehyd-fixierten Nieren erfolgte über eine Kooperation mit Prof. Dr. Jens Nyengaard, Aarhus University, Aarhus, Dänemark.

Nach Entwässerung und anschließender Einbettung in Glycomethacrylat wurden die Nieren mit einem Mikrotom gänzlich in 20 µm dicke Schnitte zerteilt. Jeder dreißigste sowie dessen angrenzender Schnitt wurden randomisiert ausgewählt und paarweise mit „Periodic Acid Schiff“ (PAS) und Meyer's Hämatoxylin gefärbt. Die computergestützte Zählung erfolgte am Mikroskop an 6 Schnittpaaren pro Niere. Die Gesamt-Nephronenanzahl wurde über die „physikal fraktionator“ Technik abgeschätzt.

### 2.2.11. Histologie

#### a) Herstellung der Nierenschnitte

Nach Entwässerung und Paraffineinbettung wurden aus den zuvor in Methacarn fixierten und in 80%igem Ethanol gelagerten rechten Nierenhälften 3 µm dicke transversale Schnitte angefertigt. Auf drei Objektträger pro Niere wurden jeweils 8 Schnitte übertragen, bei 37°C getrocknet und anschließend standardisiert im Färbeautomaten nach Hämatoxylin-Eosin (HE), PAS und Sirius Red gefärbt. Für die folgende Auswertung wurden die Nierenschnitte systematisch geblindet.

#### b) Zählung der subkapsulären Glomeruli

Die Bestimmung der Anzahl subkapsulärer Glomeruli wurde am Lichtmikroskop an HE-gefärbten Schnitten vorgenommen. Als subkapsuläre Glomeruli wurden alle Glomeruli definiert, die von der Kapsel ausgehend innerhalb des Cortex corticis in einer Zone von einem durchschnittlichen Glomerulidurchmesser lagen. Hierbei wurden Glomeruli mit Kapselkontakt von solchen ohne Kapselkontakt unterschieden. Bei den Glomeruli mit Kapselkontakt bestand ein direkter Kontakt von Bowman'scher Kapsel zur Nierenkapsel. Die subkapsulären Glomeruli ohne Kapselkontakt lagen in der oben beschriebenen Zone, ohne dass ein direkter Kontakt zur Nierenkapsel vorlag. Die Zählung erfolgte in einer 40er Vergrößerung an jeweils drei Schnitten pro Niere, wobei die Ergebnisse im Anschluss gemittelt wurden.

### c) Glomeruloskleroseindex

Für die Untersuchung der Glomerulosklerose wurde pro Tier 8 der nach PAS gefärbten Schnitte ausgewählt. Unter Verwendung eines Photomikroskops wurden insgesamt 40 Glomeruli, oberflächliche und juxtamedulläre, in 200facher Vergrößerung nach einem Score von 0 bis 4 bewertet (Raij et al., 1984). Bei dieser semiquantitativen Bewertung wurde die Ablagerung von PAS positivem Material in das Mesangium und um die Kapillarschlingen mit Verlegung des extrakapillären Raums als Schädigungsparameter herangezogen. Der Grad der pathologischen Veränderung in Prozent zur Gesamtfläche der Glomeruli wurde Anhand einer Bewertungsskala mit 0,5-Abständen angegeben, wobei „0“ keine Veränderungen, „0,5“ Veränderungen unter 12%, „1“ Veränderungen von 12 bis 25%, „1,5“ Veränderungen von 25 bis 37%, „2“ Veränderungen von 37 bis 50%, „2,5“ Veränderungen von 50 bis 62%, „3“ Veränderungen von 62 bis 75%, „3,5“ Veränderungen von 75 bis 90% und „4“ Veränderungen von mehr als 90% des jeweils untersuchten Glomerulums angaben. Aus den 40 Einzelwerten wurde der Mittelwert berechnet.

### d) Renale interstitielle Fibrose

Die computergestützte Auswertung der renalen interstitiellen Fibrose (RIF) erfolgte bei 100facher Vergrößerung unter dem Photomikroskop an 10 Bildausschnitten der Sirius Red gefärbten Präparate pro Tier. Da die Sirius Red Färbung spezifisch für Gesamtkollagen ist, lässt sich durch sie das Ausmaß der interstitiellen Fibrose quantifizieren. Für die Bildausschnitte wurde der Bereich des äußeren Nierenmarks gewählt, in dem sich die proximalen Tubuli, aber keine Glomeruli befinden. Dieser Bereich wurde je mit einer Flächengröße von  $301146,94 \mu\text{m}^2$  aufgenommen, digitalisiert und mit Hilfe des Programms Scion Image 1.62a ausgewertet. Die Software wandelt das farbige Bild anhand von Grauwerten in ein Schwarz-Weiß-Bild um, wobei schwarze Areale dem mit Sirius Red angefärbten Gesamtkollagen entsprechen. Es folgt eine Messung des prozentualen Anteils der schwarzen Areale am Gesamtbild. Die Werte der jeweils 10 ausgemessenen Bildausschnitte wurden gemittelt.

### e) Tubulärer Schädigungsindex

Die semiquantitative Bewertung der tubulären Schädigung wurde an einem Photomikroskop, bei 100facher Vergrößerung an PAS gefärbten Schnitten durchgeführt. Bei dieser Methode wird der gesamte Nierenschnitt in 20 Quadranten

eingeteilt, welche nach einem Score von 0-3 bewertet werden. Tubuliatrophie und -dilatation sowie vorhandene Zylinder dienen hierbei als Schädigungsparameter, wobei „0“ keine Veränderungen im Tubulointerstitium, „1“ Veränderungen von weniger als 30%, „2“, Veränderungen zwischen 30 und 60% und „3“ Veränderungen von über 60% der Untersuchungsprobe darstellte. Aus den 20 Einzelwerten wurde der Mittelwert gebildet (Raij et al., 1984).

### 2.2.12. Differentielle Genexpressionsanalyse

#### a) Isolierung der RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte durch die Trizol-Methode aus bei -80°C tiefgefrorenem Nierengewebe. Je 100 mg Gewebe wurden in 1 ml eisgekühltem Trizol für 2 x 30 sec. mit dem Ultra Turrax homogenisiert und anschließend bei 5000 Upm, für 10 min, bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und zur Proteindenaturierung für 40-60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden zur Phasenseparation 200 µl Chloroform zugemischt und nach weiterer Inkubation von 2-3 min bei RT, für 15 min bei 12000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige RNA-haltige Phase wurde in ein neues Gefäß pipettiert, 500 µl Isopropanol zur Ausfällung zugegeben und nach 10 minütiger Inkubation bei RT für weitere 10 min bei 12000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das so erhaltene Pellet wurde mit 1 ml eisgekühltem 75%igem Ethanol gewaschen, 10 min bei 4900 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Anschließend wurde das Pellet 20 min luftgetrocknet und danach in 50 µl DEPC-Wasser (0,1%) bei 60°C gelöst. Die photometrische Konzentrationsmessung erfolgte bei 260 und 280 nm. Zur Qualitätsprüfung der RNA wurden 1 µl RNA (ca. 500 ng) und 1 µl Laufpuffer auf ein 1%iges Agarose-Ethidiumbromid Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von ca. 75 V und Stromstärke von 200 mA über einen Zeitraum von etwa 40 min.

#### b) cDNA Synthese durch reverse Transkription

Die cDNA Synthese wurde mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas Life Sciences durchgeführt. Von jeder Probe wurden 42 µg RNA äquivalenter Volumina mit DEPC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt. In der PCR Maschine wurden die Proben nach Zugabe von 1 µl Random Hexamer Primer zur Hybridisierung für 5 min bei 70 °C und 5 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 4 µl 5x Reaction Buffer, 1 µl RNase

Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP-Mix sowie zuletzt 2 µl reverse Transkriptase (M-MULV) auf Eis zugefügt und der Ansatz in der PCR Maschine für 10 min bei 25°C, 60 min bei 37°C, 10 min bei 70°C und letztlich 10 min bei 4°C inkubiert.

### c) Quantitative Real-Time PCR

Kollagen III ist ein wichtiger Bestandteil des renalen Stützgewebes und wird bei fibrotischen Umbauvorgängen vermehrt gebildet. Die Quantifizierung der differentiellen Expression von Kollagen III im Nierengewebe der Parentaltierstämme und des konsomen Stammes wurde mittels der quantitativen Real-Time PCR nach dem TaqMan Prinzip vorgenommen (Livak et al., 1995). Bei dieser Methode wird das während der PCR entstehende Produkt mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während der PCR-Zyklen quantifiziert.

Eine Sonde, die an ihrem 3' Ende mit einem Quencher und an ihrem 5' Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, hybridisiert innerhalb des zu amplifizierenden, von beiden Primern flankierten, cDNA Bereichs. Bei der intakten Sonde wird die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors durch die räumliche Nähe zum Quencher durch strahlungsfreie Energieübertragung (FRET) unterdrückt. Während eines PCR-Zyklus schneidet und verdrängt die Taq-Polymerase aufgrund ihrer Exonucleaseaktivität das 5'-Ende und somit den Reporter von der Sonde. Hierdurch werden die räumliche Nähe und der damit zusammenhängende FRET zwischen Reporter und Quencher aufgehoben und es kommt zur Fluoreszenz des Reporters. Diese steigt mit jedem PCR-Zyklus proportional zum gebildeten PCR-Produkt an und wird mittels des ABI Prism 7000 Sequence Detection System detektiert.

Für die PCR-Reaktion wurden jeweils 2 µl cDNA mit 12,5 µl TaqMan 2x Universal PCR MasterMix, je 2,25 µl 10 µM sense- und antisense-Primer (Endkonzentration 900 nM), 0,5 µl 10 µM Sonde (Endkonzentration 200 nM) und nukleasefreiem Wasser zu einem Gesamt-Reaktionsvolumen von 25 µl angesetzt.

Da die bei dieser Quantifizierung von mRNA erhaltenen Werte jeweils in Abhängigkeit zur Gesamtmenge von RNA zu sehen sind, müssen sie zur Vergleichbarkeit normiert werden. Zu diesem Zweck wurde zusätzlich zu dem zu messenden Gen-Produkt jeweils die Amplifikation eines konstant in den Zellen exprimierten Gens (housekeeping Gen) durchgeführt. Für die Niere hat sich hierfür das Porphobilinogen-Desaminase-Gen (PBGD) als geeignet erwiesen. Über bei jedem Lauf mitgeführten Standardkurven wurde die Expression (E) des zu untersuchenden Gens sowie des Housekeeping-Gens

gemessen. Die relative Expression (rE) des zu untersuchenden Gens Kollagen III wurde anschließend nach folgender Formel berechnet:

$$rE_{\text{Kollagen III}} = \frac{E_{\text{Kollagen III}}}{E_{\text{PBGD}}}$$

Alle Proben wurden als Dreifachansatz bestimmt und die Werte hieraus gemittelt. Die Ergebnisse wurden mit der ABI Prism 7000 SDS Software ausgewertet.

### 2.2.13. Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Computerprogramms SPSS 16.0. durchgeführt. Alle Werte wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Bei Normalverteilung erfolgte die Auswertung bei zwei Gruppen über den T-Test und bei Drei- oder Mehrgruppenvergleichen über eine Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließender Post-Hoc-Testung (Bonferroni). Aufgrund der nicht-Normalverteilung der Albuminwerte wurden diese für die statistische Auswertung logarithmiert.

Bei auch nach Logarithmierung nicht normal verteilten Werten fand die statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney-U-Test statt. Als Signifikanzschwelle wurde ein p-Wert von  $p < 0,05$  definiert.

### 3. Ergebnisse

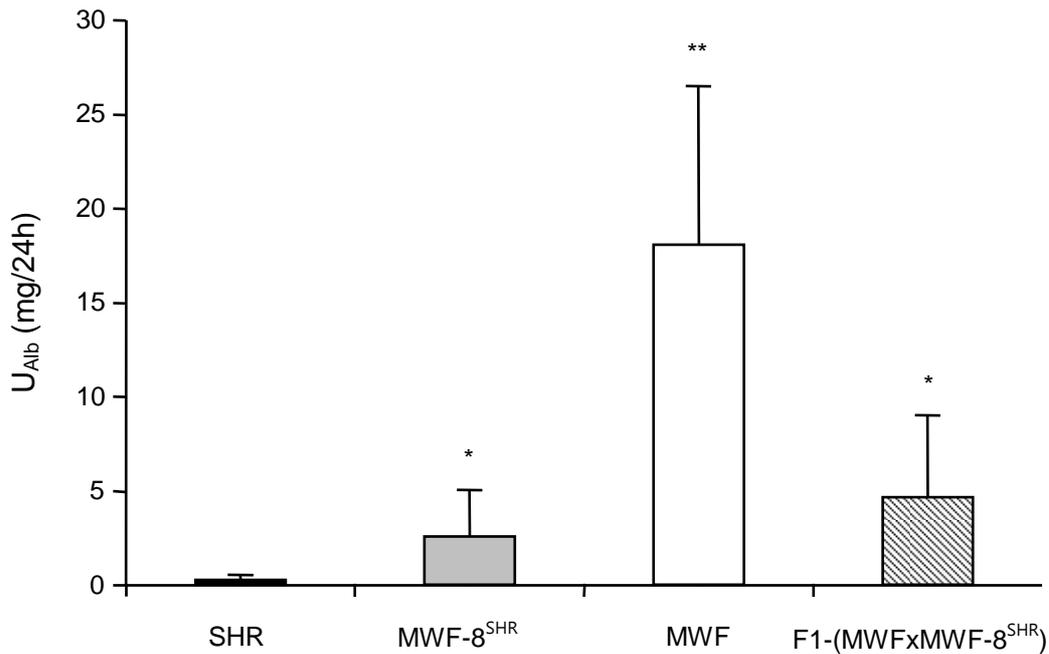
#### 3.1. Altersverlaufstudie A: Phänotypische Beurteilung männlicher MWF-8<sup>SHR</sup>- und F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>)-Tiere

##### 3.1.1. Frühzeitige Albuminausscheidung in der 4. und 8. Woche

Eine Urinsammlung in metabolischen Käfigen ist bei Ratten ab der 4. Woche möglich. In diesem Alter ließ sich bei männlichen Tieren aller betrachteten Stämmen eine Albuminausscheidung im physiologischen Bereich, unter 1 mg/24h, nachweisen (SHR 0,09±0,09 mg/24h; MWF-8<sup>SHR</sup> 0,06±0,03 mg/24h; MWF 0,12±0,05 mg/24h, F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>) 0,11±0,04 mg/24h).

Es konnte gezeigt werden, dass bei MWF-Männchen bereits in der achten Woche eine 55fache Erhöhung der Albuminausscheidung gegenüber SHR-Tieren vorliegt (18,14±8,39 mg/24h vs. 0,33±0,23 mg/24h, p<0.001). Dieser frühzeitige Anstieg eines Albuminverlusts über die Nieren war im konsomen Stamm fast vollständig aufgehoben. Bei MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen in der 8. Woche wurden Albuminwerte gemessen, die um 85% geringer waren als die der MWF-Tiere. Der Unterschied zwischen den Werten beider Gruppen war hochsignifikant (2,64±2,43 mg/24h vs. 18,14±8,39 mg/24h, p<0.001) (Abb. 6).

Um das Vorhandensein und Ausmaß eines Gen-Dosiseffekts des SHR RNO8 auf die Entwicklung der Albuminurie zu untersuchen, wurde eine konsome F1-Generation aus MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Tieren gezüchtet. Bei diesem Stamm liegt ein heterozygotes RNO8 vor. Im Alter von 8. Wochen unterschieden sich die Albuminwerte der konsomen F1-Tiere nicht signifikant von denen des konsomen Stammes. Gegenüber MWF-Männchen waren die Werte der konsomen F1-Männchen signifikant reduziert (18,78 ± 8,19 mg/24h vs. 4,72 ± 4,31 mg/24h, p<0.001) (Abb. 6).



**Abb. 6:** Albuminexkretion im Urin männlicher SHR-, MWF-8<sup>SHR</sup>-, MWF- und F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>)-Ratten in der 8. Woche.

\*  $p < 0,0001$  vs. SHR

\*\*  $p < 0,0001$  vs. SHR, MWF-8<sup>SHR</sup> und F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>)

### 3.1.2. Altersverlauf der Albuminausscheidung

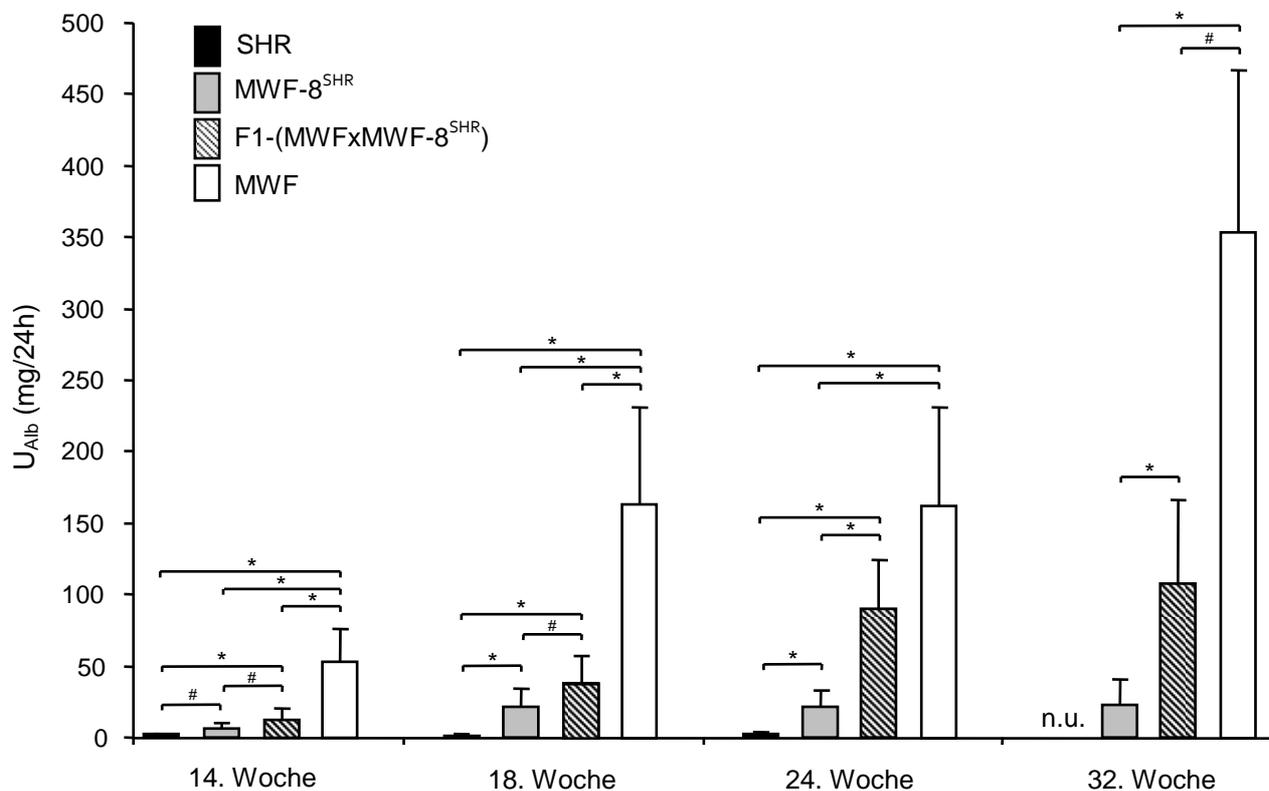
#### a) Altersverlauf bei MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen

MWF-Männchen entwickeln mit zunehmendem Alter eine kontinuierlich ansteigende Albuminausscheidung bis hin zu nephrotischen Werten (>150 mg/24h ab der 18. Woche). Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei den konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen ein deutlich moderaterer Anstieg der Albuminwerte, die von der 8. bis zur 32. Woche zu jedem untersuchten Zeitpunkt hochsignifikant von den Werten der MWF-Männchen abwichen. Anders als bei den MWF-Tieren, deren Albuminwerte stetig weiter bis auf Werte von  $354,61 \pm 112,92$  mg/24h in der 32. Woche anstiegen, erreichte die Albuminexkretion der MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen ab der 18. Woche ein Plateau. Bis zur 32. Woche erfolgte bei den konsomen Männchen kein weiterer signifikanter Anstieg der Werte (18.Wo vs. 32.Wo.  $21,13 \pm 13,73$  mg/24h vs.  $23,24 \pm 17,35$  mg/24h).

Verglichen mit SHR-Männchen, welche selbst im hohen Alter eine niedrige Albuminurie um 2 mg/24h aufweisen, ließ sich bei MWF-8<sup>SHR</sup>-Tieren ab der 8. Woche eine signifikant erhöhte Albuminexkretion messen (Abb. 7).

b) Altersverlauf bei F1(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>)-Männchen

Bei konsomen F1-Männchen wurden Albuminwerte gemessen, die ab der 8. Woche zu allen untersuchten Zeitpunkten intermediär zwischen denen von MWF- und MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen lagen (Abb. 6). In der 14. und 18. Woche wichen diese Werte signifikant und ab der 24. Woche hochsignifikant von denen der MWF-8<sup>SHR</sup>-Tiere ab. Während die Albuminausscheidung der MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen ab der 18. Woche stagnierte, stieg die  $U_{\text{Alb}}$  der konsomen F1-Männchen mit zunehmendem Alter weiter an. Gegenüber MWF-Tieren war die  $U_{\text{Alb}}$  der konsomen F1-Männchen zu allen untersuchten Zeitpunkten außer in der 24. Woche signifikant bis hochsignifikant reduziert (Abb. 7).



**Abb. 7:** Verlauf der Albuminexkretion im Urin männlicher SHR-, MWF-8<sup>SHR</sup>-, F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>)- und MWF-Ratten zwischen der 14.-32. Woche.

\*  $p < 0.001$

#  $p < 0,05$

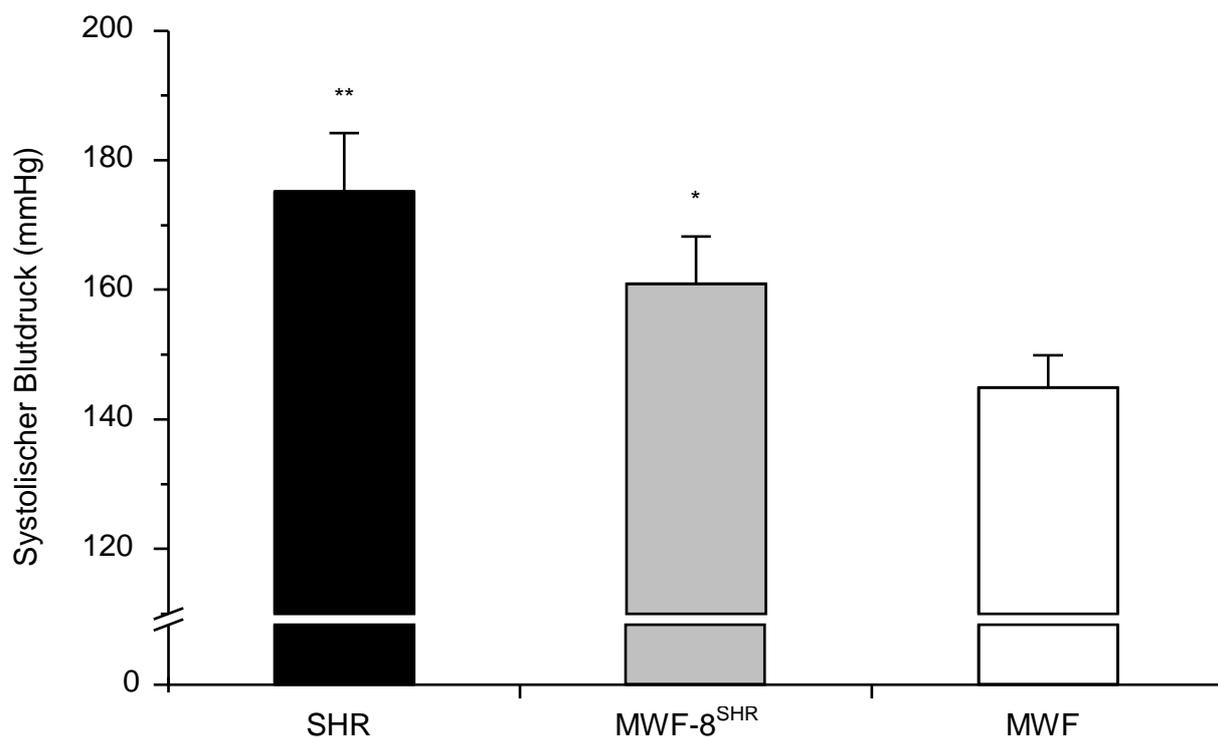
n.u., nicht untersucht

### 3.1.3. Systolischer Blutdruck

Die Messung des systolischen Blutdrucks von MWF, SHR und MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen wurde jeweils in der 14. und 24. Woche mittels nicht-invasiver Tailcuff-Methode vorgenommen. Bei allen drei Stämmen blieb der Blutdruck in diesem Zeitraum auf einem konstanten Niveau mit vergleichbaren Werten zu beiden Messzeitpunkten.

In der 14. Woche ließ sich bei den SHR-Männchen ein hochsignifikant erhöhter systolischer Blutdruck ( $177,5 \pm 7,2$  mmHg) gegenüber MWF-8<sup>SHR</sup>- ( $155,9 \pm 8,1$  mmHg) und MWF-Männchen ( $146,0 \pm 4,5$  mmHg) nachweisen ( $p < 0,001$ ). Der Blutdruck der MWF-Tiere war signifikant niedriger als der des konsomen Stammes ( $p < 0,05$ ).

Eine ähnliche Verteilung der Werte wurde für die 24. Woche bestimmt. Auch zu diesem Zeitpunkt war der Blutdruck von SHR ( $175,3 \pm 9,0$  mmHg) hochsignifikant höher als der von MWF-8<sup>SHR</sup> ( $161,1 \pm 7,2$  mmHg) und MWF ( $145,1 \pm 4,7$  mmHg), wobei sich MWF-8<sup>SHR</sup> und MWF ebenfalls hochsignifikant voneinander unterschieden (Abb. 8).



**Abb. 8:** Systolischer Blutdruck männlicher SHR-, MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 24. Woche.

\*  $p < 0,0001$  vs. MWF

\*\*  $p < 0,0001$  vs. MWF und MWF-8<sup>SHR</sup>

### 3.1.4. Biochemische Analysen

Zur Beurteilung einer Korrelation von Phänotyp und Grad der Organschädigung an Niere und Herz wurden neun der MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen in der 24. Woche zur Organ- und Gewebentnahme präpariert und die Befunde mit Daten der Parentaltiere verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Obwohl adulte SHR- und MWF-Männchen ein ähnliches Körpergewicht erreichen, weisen letztere, bezogen auf ihr Körpergewicht, ein signifikant vermindertes Nierengewicht auf ( $p < 0,05$ ). Verglichen mit den Parentaltieren zeigten auch die MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen ein entsprechendes Körpergewicht. Das zum Körpergewicht ins Verhältnis gesetzte, relative Nierengewicht der konsumierten Tiere lag intermediär zwischen den Werten der Parentaltiere und unterschied sich weder von MWF noch von SHR in signifikanter Weise.

Für absolutes und relatives Herzgewicht ließ sich zwischen MWF und dem konsumierten Stamm MWF-8<sup>SHR</sup> kein Unterschied feststellen. Die Werte beider Stämme waren jedoch signifikant niedriger als die der SHR-Tiere ( $p < 0,0001$ ). Das relative linksventrikuläre Herzgewicht differierte signifikant zwischen den Stämmen. MWF-Männchen zeigten den niedrigsten Wert, gefolgt von den MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen ( $p < 0,05$ ). Die Werte der SHR-Männchen wichen hochsignifikant von denen der anderen beiden Stämme ab ( $p < 0,0001$ ).

Zwischen MWF-, MWF-8<sup>SHR</sup>- und SHR-Männchen bestand kein signifikanter Unterschied der Serum-Kreatininwerte sowie der aufs Körpergewicht bezogenen Kreatininclearance. Die Serum-Harnstoff-Konzentration differierte dagegen signifikant zwischen den Stämmen, wobei die MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen den höchsten Harnstoffgehalt im Serum aufwiesen ( $p < 0,0001$ ).

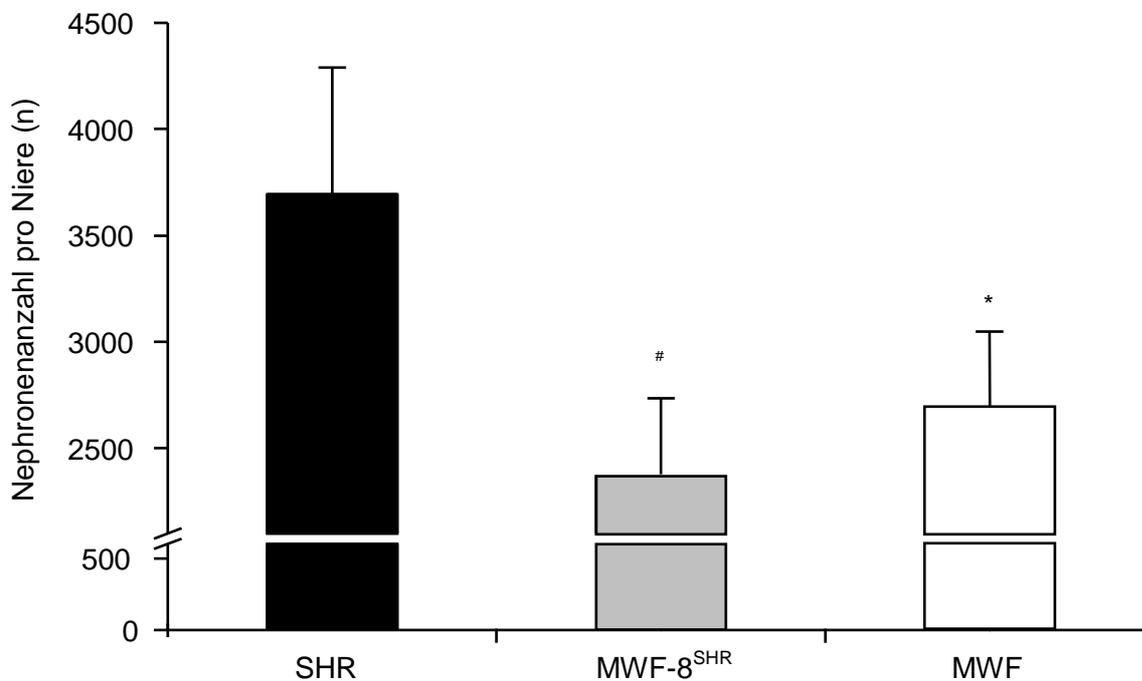
Für eine Einschätzung des Fettstoffwechsels wurden die Parameter Triglyzeride, Gesamtcholesterin und HDL-Cholesterin im Serum bestimmt. Während die Triglyzeride im Serum männlicher MWF-Ratten gegenüber SHR-Ratten signifikant erhöht waren ( $p < 0,05$ ), konnte bei MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen eine Reduktion der Triglyzeridwerte, auf Werte, vergleichbar mit denen der SHR-Tiere, nachgewiesen werden. Sowohl MWF- wie auch MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen wiesen für Gesamtcholesterin und HDL signifikant höhere Werte auf als SHR-Männchen. Im Vergleich mit MWF waren jedoch bei den konsumierten Tieren sämtliche Werte der betrachteten Cholesterinparameter signifikant geringer ( $p < 0,05$ ) (Tabelle 1).

**Tab. 1: Phänotypische Charakterisierung von männlichen SHR-, MWF-8SHR- und MWF-Ratten in der 24. Woche.**

|   | SHR<br>(n=10) | MWF-8 <sup>SHR</sup><br>(n=9) | MWF<br>(n=9) | overall<br>ANOVA  | MWF vs.<br>SHR    | MWF vs.<br>MWF-8 <sup>SHR</sup> | MWF-8 <sup>SHR</sup><br>vs. SHR |
|---|---------------|-------------------------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>Körpergewicht<br/>(g)</b>                            | 377,5±14,0    | 351,1±20,4                    | 363,9±33,9   | 0,074             |                   |                                 |                                 |
| <b>Nierengewicht<br/>(g)</b>                            | 2,23±0,08     | 1,99±0,12                     | 1,99±0,23    | <b>0,002</b>      | <b>0,007</b>      | 1,00                            | <b>0,007</b>                    |
| <b>Nierengewicht /<br/>KG (mg/g)</b>                    | 5,90±0,16     | 5,66±0,27                     | 5,44±0,18    | <b>0,0003</b>     | <b>0,0002</b>     |                                 |                                 |
| <b>Herzgewicht (g)</b>                                  | 1,11±0,04     | 0,84±0,06                     | 0,83±0,05    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | 1,00                            | <b>&lt;0,0001</b>               |
| <b>Herzgewicht /<br/>KG (mg/g)</b>                      | 2,93±0,10     | 2,40±0,12                     | 2,30±0,11    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | 0,19                            | <b>&lt;0,0001</b>               |
| <b>Rel. linksventri-<br/>kuläres Gewicht<br/>(mg/g)</b> | 2,51±0,09     | 2,00±0,13                     | 1,86±0,68    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | <b>0,02</b>                     | <b>&lt;0,0001</b>               |
| <b>Harnstoff im<br/>Serum (mmol/l)</b>                  | 7,07±0,39     | 10,81±1,16                    | 9,36±0,79    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | <b>0,003</b>                    | <b>&lt;0,0001</b>               |
| <b>Kreatinin im<br/>Serum (µmol/l)</b>                  | 35,7±3,3      | 38,7±3,9                      | 37,6±3,4     | 0,20              |                   |                                 |                                 |
| <b>Kreatinin im<br/>Urin (µmol/l)</b>                   | 11,3±2,7      | 12,4±1,7                      | 14,4±2,3     | <b>0,024</b>      | <b>0,02</b>       | 0,25                            | 0,87                            |
| <b>Kreatinin-<br/>Clearance<br/>(ml/min*100g)</b>       | 0,48±0,07     | 0,51±0,09                     | 0,46±0,15    | 0,55              |                   |                                 |                                 |
| <b>Triglyzeride<br/>(mmol/l)</b>                        | 0,70±0,12     | 0,77±0,19                     | 1,08±0,37    | <b>0,008</b>      | <b>0,009</b>      | <b>0,04</b>                     | 1,00                            |
| <b>Gesamt-<br/>cholesterin<br/>(mmol/l)</b>             | 1,58±0,14     | 2,36±0,23                     | 3,16±0,55    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | <b>0,0002</b>                   | <b>0,0002</b>                   |
| <b>HDL (mmol/l)</b>                                     | 1,26±0,13     | 1,74±0,18                     | 2,18±0,31    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | <b>0,0008</b>                   | <b>0,0001</b>                   |

### 3.1.5. Gesamt-Nephronenanzahl in der Niere

Die in der vierten Woche durchgeführte Ermittlung der Anzahl aller Nephrone pro Niere zeigte für die MWF-Männchen ( $27027,9 \pm 3498,1$ ) eine 27%ige Reduktion der Gesamt-Nephronenanzahl gegenüber den SHR-Männchen ( $36979,2 \pm 5907,7$ ) ( $p < 0,05$ ). Diese Verminderung der Gesamt-Nephronenanzahl konnte auch bei den MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen festgestellt werden ( $23770,8 \pm 3577,2$ ). Verglichen mit SHR-Tieren wies der konsome Stamm rund 36% weniger Nephrone pro Niere auf ( $p < 0,0001$ ). Insgesamt war der für die MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen ermittelte Wert am geringsten. Der Unterschied zwischen konsomen- und MWF-Männchen war jedoch nicht signifikant (Abb. 9).



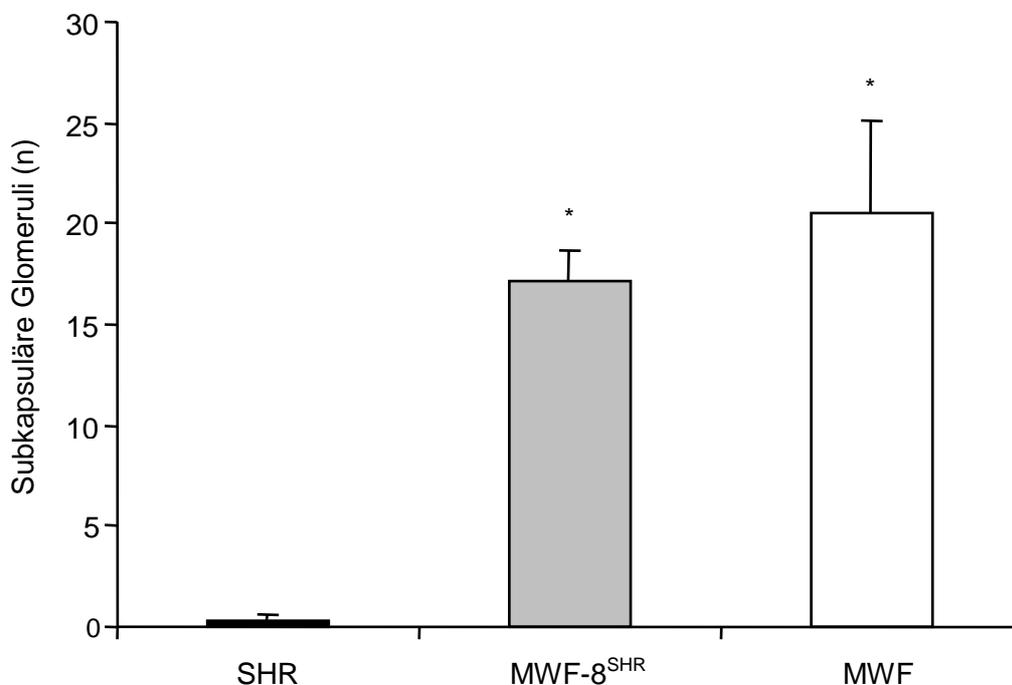
**Abb. 9:** Gesamt-Nephronenanzahl pro Niere bei männlichen SHR-, MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 4. Woche.

#  $p < 0,0001$  vs. SHR

\*  $p < 0,05$  vs. SHR

### 3.1.6. Histologische Untersuchung der Nieren

In Tabelle 2 findet sich eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen. Bei der Betrachtung der subkapsulären Glomeruli wurde zwischen solchen mit Kapselkontakt und solchen ohne Kapselkontakt unterschieden. Gegenüber männlichen SHR-Ratten, bei denen sich keine Glomeruli mit Kapselkontakt und nur vereinzelt oberflächliche Glomeruli ohne Kapselkontakt nachweisen ließen, wiesen sowohl MWF- als auch MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen eine hochsignifikant erhöhte Anzahl subkapsulärer Glomeruli auf ( $p < 0,0001$ ) (Abb. 10). Bei diesen beiden Stämmen fanden sich ähnlich viele kapselberührende Glomeruli. Die oberflächlichen Glomeruli ohne Kapselkontakt waren beim konsomen Stamm gegenüber MWF-Tieren signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 10:** Gesamtanzahl subkapsulärer Glomeruli pro Nierenschnitt bei männlichen SHR-, MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 24. Woche.

\*  $p < 0,0001$  vs. SHR

Der Glomeruloskleroseindex (GSI), der Index der tubulointerstitiellen Schädigungen (TSI) und das Ausmaß der renalen interstitiellen Fibrose (RIF), als Indikatoren einer strukturellen Nierenschädigung, sind in den Nieren der MWF-Männchen in der 24. Woche im Vergleich zu den SHR-Männchen hoch signifikant erhöht ( $p < 0,0001$ ). Die

Einführung von SHR RNO8 in den MWF Hintergrund zeigte keinen verbessernden Einfluss auf die Ausprägung dieser Veränderungen. Auch in den MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen waren alle drei Parameter gegenüber den SHR-Männchen hochsignifikant stärker ausgeprägt ( $p < 0,0001$ ). Zwischen den Werten von MWF und MWF-8<sup>SHR</sup> konnte dagegen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

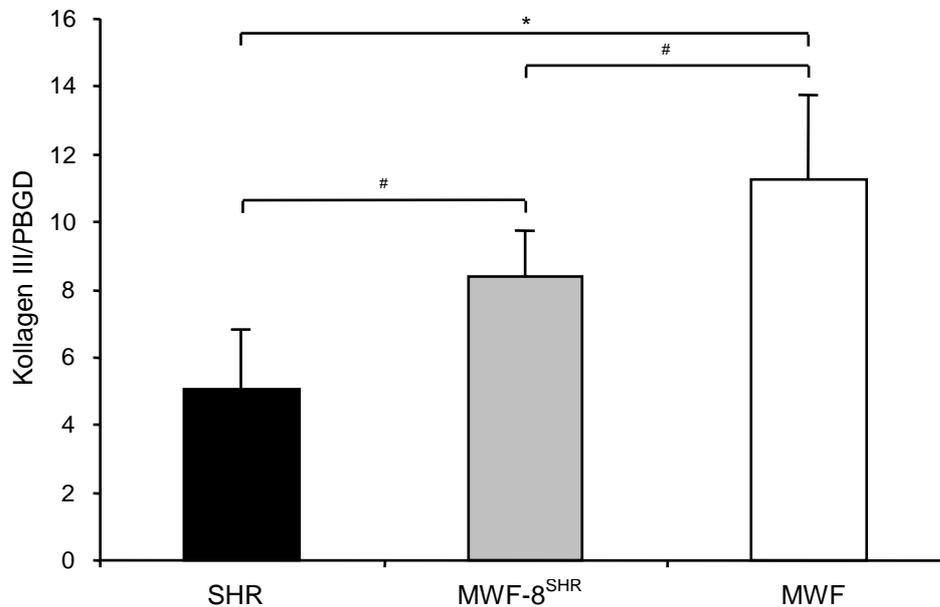
**Tab. 2: Auswertung der Nierenhistologie bei männlichen SHR-, MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 24. Woche.**

|  | SHR<br>(n=10) | MWF-8 <sup>SHR</sup><br>(n=9) | MWF<br>(n=9) | overall<br>ANOVA  | MWF vs.<br>SHR    | MWF vs.<br>MWF-8 <sup>SHR</sup> | MWF-8 <sup>SHR</sup><br>vs. SHR |
|--|---------------|-------------------------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>Subkapsuläre<br/>Glomeruli ohne<br/>Kapselkontakt (n)</b> | 0,3±0,3       | 13,2±1,7                      | 16,7±3,1     | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | <b>0,003</b>                    | <b>&lt;0,0001</b>               |
| <b>Subkapsuläre<br/>Glomeruli mit<br/>Kapselkontakt (n)</b>  | 0,0±0,0       | 4,4±1,8                       | 3,8±2,2      | <b>&lt;0,0001</b> | <b>0,0002</b>     | 1,00                            | <b>&lt;0,0001</b>               |
| <b>Gesamtanzahl<br/>subkapsulärer<br/>Glomeruli (n)</b>      | 0,3±0,3       | 17,7±2,6                      | 20,6±4,9     | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | 0,16                            | <b>&lt;0,0001</b>               |
| <b>Glomerulosklerose-<br/>index (Grad 0-4)</b>               | 0,92±0,17     | 1,68±0,30                     | 1,64±0,25    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | 1,00                            | <b>&lt;0,0001</b>               |
| <b>Tubulärer<br/>Schädigungsindex<br/>(Grad 0-3)</b>         | 0,04±0,03     | 0,50±0,21                     | 0,38±0,14    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>0,0004</b>     | 0,29                            | <b>&lt;0,0001</b>               |
| <b>Renale interstitielle<br/>Fibrose (%)</b>                 | 3,10±0,46     | 7,54±1,07                     | 7,5±1,30     | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | 1,00                            | <b>&lt;0,0001</b>               |

### 3.1.7. Differentielle Genexpressionsanalyse

Für eine bestmögliche Einschätzung einer Nierenschädigung wurde neben den histologischen Auswertungen bei männlichen SHR-, MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Tieren in der 24. Woche eine differentielle Genexpressionsanalyse durchgeführt. Die relative mRNA Expression von Kollagen III, als Parameter einer fortschreitenden Nierenfibrosierung und damit in Zusammenhang stehender Funktionseinschränkung des Organs, wurde per Real-Time-PCR ermittelt. Bei MWF-Männchen ließ sich gegenüber SHR-Männchen eine hochsignifikante Steigerung der Kollagen III Expression nachweisen (5,1±0,6 vs. 11,3±0,8,  $p < 0,0001$ ). Die Kollagen III Expression der konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Tiere war deutlich geringer ausgeprägt als die der MWF-Tiere (8,4±0,5 vs. 11,3±0,8,  $p < 0,05$ ). Es

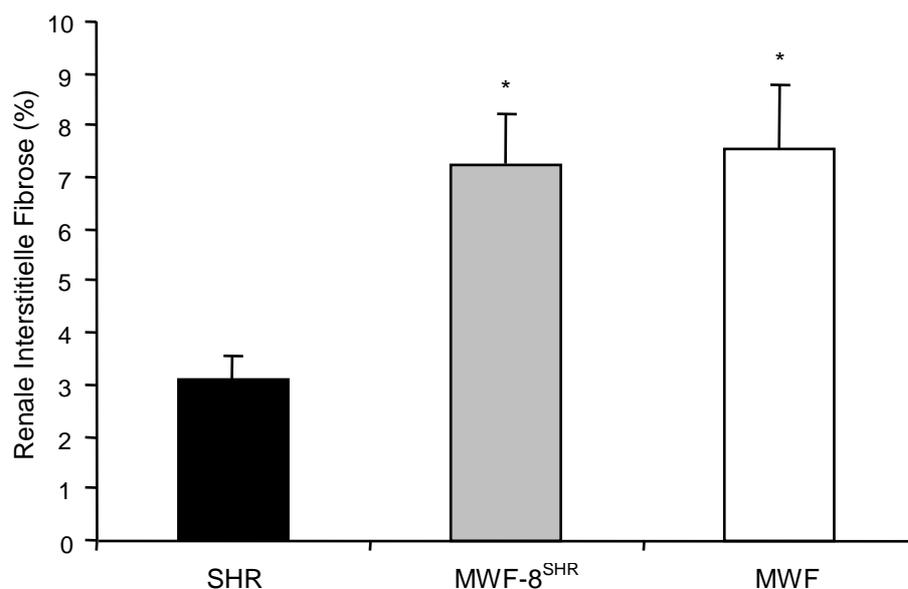
ließen sich bei den konsumierten Tieren Werte messen, die intermediär zwischen denen der Parentaltiere lagen, und von beiden signifikant abwichen (Abb. 11). Im Vergleich hierzu ist in Abbildung 12 die Ausprägung der renalen interstitiellen Fibrose als zweiten Parameter der Nierenfibrosierung dargestellt.



**Abb. 11:** Relative Kollagen III Expression bei männlichen SHR-, MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 24. Woche.

#  $p < 0,05$

\*  $p < 0,0001$



**Abb.12:** Renale interstitielle Fibrose bei männlichen SHR-, MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 24. Woche.

\*  $p < 0,0001$  vs. SHR

### 3.1.8. Entwicklung im Alter – 32. Woche

In weiterführenden Untersuchungen wurden anhand einer Subgruppe von 9 MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen die Entwicklungen bis zur 32. Woche betrachtet. Wie bereits in Kap. 3.1.2. dargestellt, manifestiert sich eine Albuminurie bei männlichen MWF-Tieren progredient mit steigendem Alter. Bei den konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen verlief diese Entwicklung deutlich moderater, so dass sich bei ihnen in der 32. Woche eine 15fach geringere  $U_{Aib}$  im Vergleich zu MWF-Tieren nachweisen ließ ( $23,24 \pm 17,35$  mg/24h vs.  $354,61 \pm 112,92$  mg/24h,  $p < 0,0001$ ) (Abb. 7).

Die Auswertung der zur Beurteilung der Nierenfunktion erhobenen Daten zeigte bei den MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen im Vergleich zu den MWF-Männchen eine signifikant geringere Harnstoff- sowie Kreatininkonzentration im Serum (Abb. 13). Für die auf 100 g Körpergewicht bezogene Kreatininclearance wurden für beide Stämme vergleichbare Werte erhoben (Abb. 14).

Wie bereits in der 24. Woche ließ sich für den konsomen Stamm auch in der 32. Woche eine signifikante Reduktion der Gesamtcholesterin-, und HDL-Konzentration im Serum gegenüber MWF-Tieren nachweisen. Die MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen wiesen zudem eine signifikant geringere Triglyzeridkonzentration im Serum auf (Abb. 15-16).

Das Körpergewicht sowie das absolute und relative Nierengewicht entwickelten sich bei MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Männchen bis zur 32. Woche gleich. MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen wiesen ein signifikant höheres absolutes und relatives Herzgewicht sowie ein höheres relatives linksventrikuläres Gewicht auf ( $p < 0,05$ ). Alle Werte sind in Tabelle 3 erfasst.

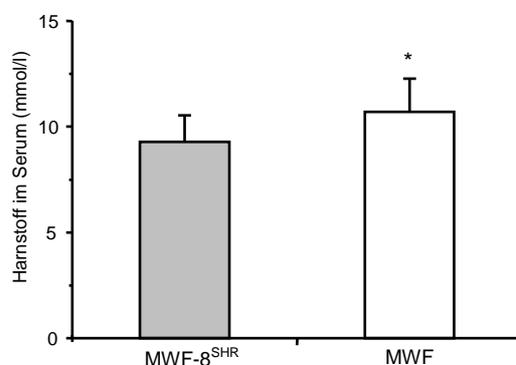


Abb. 13: Harnstoffkonzentration im Serum männlicher MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 32. Woche.  
\*  $p < 0,05$

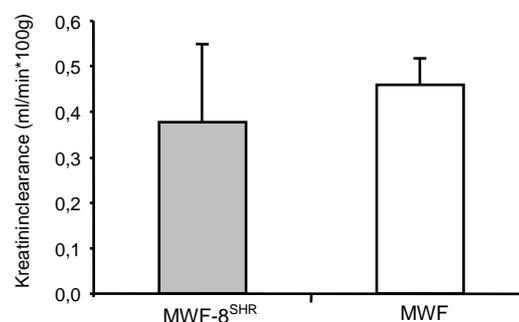


Abb. 14: Kreatininclearance pro 100g Körpergewicht männlicher MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 32. Woche.

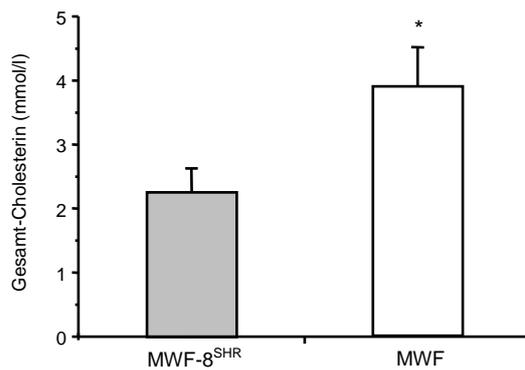


Abb. 15: Gesamt-Cholesterinkonzentration im Serum männlicher MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 32. Woche.  
\* p<0,0001

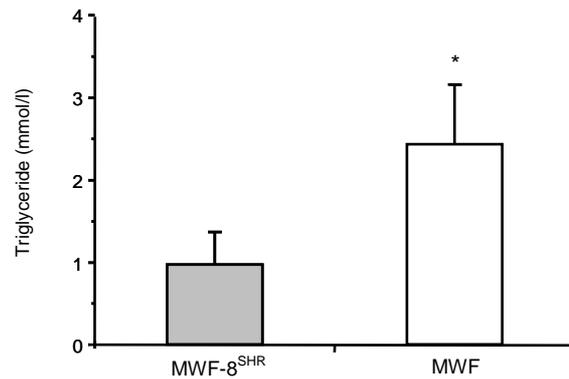


Abb. 16: Triglyceridkonzentration im Serum männlicher MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 32. Woche.  
\* p<0,05

Tab. 3: Phänotypische Charakterisierung von männlichen MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 32. Woche.

|  | MWF-8 <sup>SHR</sup><br>(n=9) | MWF<br>(n=9) | Statistik         |
|--|-------------------------------|--------------|-------------------|
| Körpergewicht (g)                      | 397,0±25,3                    | 390,0±28,1   | 0,56              |
| Nierengewicht (g)                      | 2,18±0,19                     | 2,15±0,17    | 0,78              |
| Nierengewicht / KG (mg/g)              | 5,48±0,42                     | 5,53±0,25    | 0,78              |
| Herzgewicht (g)                        | 0,96±0,07                     | 0,86±0,04    | <b>0,001</b>      |
| Herzgewicht / KG (mg/g)                | 2,43±0,18                     | 2,21±0,19    | <b>0,02</b>       |
| Rel. linksventrikuläres Gewicht (mg/g) | 2,00±0,13                     | 1,85±0,11    | <b>0,01</b>       |
| Harnstoff im Serum (mmol/l)            | 9,1±1,3                       | 10,7±1,6     | <b>0,03</b>       |
| Kreatinin im Serum (µmol/l)            | 38,8±2,2                      | 41,2±2,3     | <b>0,04</b>       |
| Kreatinin-Clearance (ml/min*100g)      | 0,38±0,17                     | 0,46±0,06    | 0,21              |
| Triglyceride (mmol/l)                  | 0,98±0,39                     | 2,44±0,72    | <b>&lt;0,0001</b> |
| Gesamtcholesterin (mmol/l)             | 2,27±0,36                     | 3,91±0,61    | <b>&lt;0,0001</b> |
| HDL (mmol/l)                           | 1,64±0,23                     | 2,31±0,33    | <b>0,0001</b>     |

### 3.2. Verlaufstudie B: Phänotypische Beurteilung weiblicher MWF-8<sup>SHR</sup>- und F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>)-Tiere

Um den Einfluss des SHR RNO8 im weiblichen Geschlecht zu untersuchen und geschlechtsspezifische Unterschiede in der phänotypischen Ausprägung herauszuarbeiten, wurde analog zu den Männchen auch bei den MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen eine Altersverlaufsstudie durchgeführt. Die hierbei erhobenen Werte wurden anschließend mit den Befunden der Männchen verglichen.

#### 3.2.1. Verlauf der Albuminausscheidung bis ins Alter

##### a) Altersverlauf bei MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen

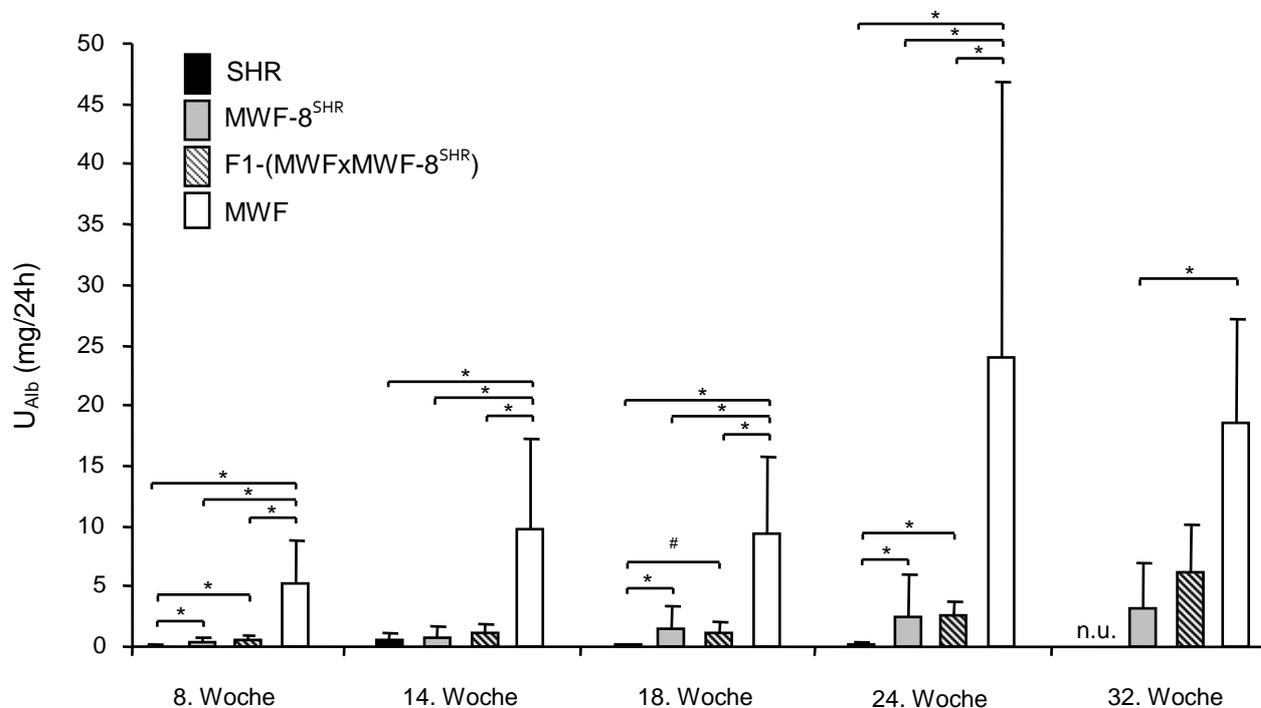
In der 4. Woche lag die Albuminausscheidung bei allen Stämmen unterhalb 1 mg/24h. Der Verlauf der Albuminexkretion von der 8.-24. Woche ist in Abbildung 14 dargestellt. SHR-Weibchen entwickeln ab der 8. bis zur 24. Woche keinen Anstieg der Albuminwerte über 1 mg/24h. MWF-Weibchen zeigen bis zur 24. Woche einen kontinuierlichen Anstieg der Albuminurie auf Werte von  $24,02 \pm 22,77$  mg/24h. Gegenüber MWF zeigten die konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen ab der 8. Woche zu allen betrachteten Zeitpunkten eine hochsignifikant verminderte Albuminausscheidung. Bei ihnen war eine deutliche moderatere Progression der Albuminurie mit Werten von  $2,38 \pm 3,67$  mg/24h in der 24. Woche zu beobachten, was einer 10fachen Reduktion entsprach.

Zwischen der 24. und 32. Woche konnte bei den MWF-Weibchen kein weiterer Anstieg der Albuminurie vermerkt werden. Die Albuminwerte der konsomen Tiere stiegen in diesem Zeitraum geringfügig weiter an, waren aber auch in der 32. Woche hochsignifikant reduziert gegenüber den Albuminwerten gleichaltriger MWF-Weibchen ( $18,6 \pm 8,61$  mg/24h vs.  $3,11 \pm 3,75$  mg/24h,  $p < 0,0001$ ) (Abb. 17).

##### b) Altersverlauf bei F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>)-Weibchen

Bei konsomen F1-Weibchen zeigte sich ab der 8. bis zur 24. Woche an jedem untersuchten Zeitpunkt eine hochgradige Verminderung der Albuminausscheidung gegenüber MWF-Weibchen ( $p < 0,0001$ ). Während dieses Zeitraums waren die Albuminwerte der konsomen F1-Weibchen vergleichbar mit denen der MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen. In der 32. Woche lagen die Albuminwerte der konsomen F1-Weibchen

intermediär zwischen den Werten von MWF- und MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen und wichen von beiden nicht signifikant ab (Abb. 17).



**Abb. 17:** Verlauf der Albuminexkretion bei weiblichen SHR-, MWF-8<sup>SHR</sup>-, F1-(MWFxMWF-8<sup>SHR</sup>)- und MWF-Ratten zwischen der 8. - 32. Woche.

\*  $p < 0.001$

#  $p < 0,05$

n.u., nicht untersucht

### 3.2.2. Systolischer Blutdruck

Die in der 14. und 24. Woche durchgeführte Messung des systolischen Blutdrucks ergab für beide Messzeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen MWF-, MWF-8<sup>SHR</sup>- und SHR-Weibchen. Innerhalb der Stämme ließen sich an beiden Messzeitpunkten ähnliche Werte erheben. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 4 dargestellt.

Der Blutdruck der SHR Weibchen war am höchsten und wich in der 14. und 24. Woche hochsignifikant von den Werten der anderen beiden Stämme ab. Für MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF- Weibchen ließen sich an beiden Messzeitpunkten vergleichbare Blutdruckwerte messen, die nicht signifikant unterschiedlich waren.

**Tab. 4: Systolischer Blutdruck (SBP) von weiblichen SHR-, MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 14. und 24. Woche.**

|                                   | SHR<br>(n=10) | MWF-8 <sup>SHR</sup><br>(n=9) | MWF<br>(n=9) | overall<br>ANOVA  | MWF vs.<br>SHR    | MWF vs.<br>MWF-8 <sup>SHR</sup> | MWF-8 <sup>SHR</sup><br>vs. SHR |
|-----------------------------------|---------------|-------------------------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>SBP in Woche 14<br/>(mmHg)</b> | 157,6±6,9     | 148,3±6,4                     | 142,5±7,5    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | 0,05                            | <b>0,004</b>                    |
| <b>SBP in Woche 24<br/>(mmHg)</b> | 157,1±9,1     | 140,3±4,7                     | 138,5±4,8    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | 1,00                            | <b>&lt;0,0001</b>               |

### 3.2.3. Biochemische Analysen

In der 24. Woche zeigten alle Tiere ähnliche Werte für Körpergewicht sowie absolutes und relatives Nierengewicht. Es ließen sich bei den SHR-Weibchen signifikant höhere Werte für absolutes und relatives Herzgewicht sowie für das relative linksventrikuläre Gewicht gegenüber MWF- und MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen ermitteln ( $p < 0,0001$ ).

Die Harnstoff- ( $p < 0,0001$ ) und Kreatininkonzentration ( $p < 0,05$ ) im Serum war bei MWF- und MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen im Vergleich zu SHR-Weibchen signifikant erhöht. Die höchste aufs Körpergewicht bezogene Kreatinin Clearance ließ sich bei den konsomen Weibchen messen, wobei der Unterschied nur gegenüber MWF-Weibchen signifikant war ( $p < 0,05$ ).

Während alle drei Stämme Serum-Triglyzerid-Konzentrationen aufwiesen, die nicht voneinander differierten, ließen sich für die Parameter des Cholesterinstoffwechsels signifikante Unterschiede zwischen den drei Stämmen nachweisen. Gesamtcholesterin- und HDL-Werte der MWF-Weibchen waren hochsignifikant gegenüber den Werten der SHR-Tiere erhöht ( $p < 0,0001$ ). Die Werte der konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen lagen intermediär zwischen den Werten der Parentaltiere und wichen in beide Richtungen signifikant ab ( $p < 0,05$ ) (Tabelle 5).

**Tab. 5: Phänotypische Charakterisierung von weiblichen SHR-, MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 24. Woche.**

|   | SHR<br>(n=10) | MWF-8 <sup>SHR</sup><br>(n=9) | MWF<br>(n=9) | overall<br>ANOVA  | MWF vs.<br>SHR    | MWF vs.<br>MWF-8 <sup>SHR</sup> | MWF-8 <sup>SHR</sup><br>vs. SHR |
|---|---------------|-------------------------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>Körpergewicht<br/>(g)</b>                            | 208,0±17,5    | 204,4±7,3                     | 207,2±3,6    | 0,78              |                   |                                 |                                 |
| <b>Nierengewicht<br/>(g)</b>                            | 1,28±0,15     | 1,17±0,05                     | 1,20±0,08    | 0,070             |                   |                                 |                                 |
| <b>Nierengewicht /<br/>KG (mg/g)</b>                    | 6,15±0,51     | 5,71±0,24                     | 5,78±0,39    | 0,051             |                   |                                 |                                 |
| <b>Herzgewicht (g)</b>                                  | 0,77±0,10     | 0,58±0,02                     | 0,62±0,02    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | 0,73                            | <b>&lt;0,0001</b>               |
| <b>Herzgewicht /<br/>KG (mg/g)</b>                      | 3,67±0,32     | 2,85±0,08                     | 2,98±0,07    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | 0,59                            | <b>&lt;0,0001</b>               |
| <b>Rel. linksventri-<br/>kuläres Gewicht<br/>(mg/g)</b> | 3,02±0,23     | 2,49±1,15                     | 2,42±0,12    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | 1,00                            | <b>&lt;0,0001</b>               |
| <b>Harnstoff im<br/>Serum (mmol/l)</b>                  | 6,8±0,8       | 9,4±0,7                       | 9,3±1,2      | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | 1,00                            | <b>&lt;0,0001</b>               |
| <b>Kreatinin im<br/>Serum (µmol/l)</b>                  | 35,6±5,0      | 42,9±2,7                      | 41,9±3,6     | <b>0,001</b>      | <b>0,005</b>      | 1,00                            | <b>0,002</b>                    |
| <b>Kreatinin im<br/>Urin (µmol/l)</b>                   | 9,8±1,8       | 5,9±3,                        | 7,6±1,9      | <b>0,01</b>       | 0,25              | 0,44                            | <b>0,01</b>                     |
| <b>Kreatinin-<br/>Clearance<br/>(ml/min*100g)</b>       | 0,47±0,15     | 0,52±0,10                     | 0,38±0,05    | <b>0,03</b>       | 0,25              | <b>0,03</b>                     | 0,9                             |
| <b>Triglyzeride<br/>(mmol/l)</b>                        | 0,98±0,24     | 0,77±0,14                     | 1,05±0,32    | 0,07              |                   |                                 |                                 |
| <b>Gesamt-<br/>cholesterin<br/>(mmol/l)</b>             | 1,67±0,16     | 2,09±0,14                     | 2,31±0,22    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | <b>0,04</b>                     | <b>0,0001</b>                   |
| <b>HDL (mmol/l)</b>                                     | 1,39±0,14     | 1,65±0,09                     | 1,90±0,16    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | <b>0,001</b>                    | <b>0,0009</b>                   |

Eine Subgruppe von 9 MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen wurde in der 32. Woche untersucht und die Ergebnisse mit Daten von MWF-Weibchen verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Zu diesem Zeitpunkt ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich des Körpergewichts, des absoluten und relativen Nierengewichts sowie des absoluten Herzgewichts. Das relative Herzgewicht sowie das relative linksventrikuläre Gewicht waren bei den MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen gegenüber MWF-Weibchen signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ).

Die Harnstoff- und Kreatininkonzentration im Serum differierte nicht zwischen den beiden Stämmen. Wie bereits in der 24. Woche ließ sich auch in der 32. Woche bei MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen eine gegenüber MWF-Weibchen signifikant höhere Kreatinin-Clearance nachweisen ( $p < 0,05$ ). Die Triglyzeridkonzentration im Serum konsomer Weibchen war signifikant geringer als die der MWF-Weibchen ( $p < 0,05$ ). Für die Parameter des Cholesterinstoffwechsels ergaben sich für beide Stämme vergleichbare Ergebnisse.

**Tab. 6: Phänotypische Charakterisierung von weiblichen MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 32. Woche.**

|   | MWF-8 <sup>SHR</sup><br>(n=8) | MWF<br>(n=9) | Statistik    |
|---|-------------------------------|--------------|--------------|
| <b>Körpergewicht (g)</b>                      | 222,8±13,3                    | 220,6±10,5   | 0,07         |
| <b>Nierengewicht (g)</b>                      | 1,26±0,62                     | 1,24±0,07    | 0,39         |
| <b>Nierengewicht / KG (mg/g)</b>              | 5,68±0,37                     | 5,60±0,24    | 0,58         |
| <b>Herzgewicht (g)</b>                        | 0,65±0,04                     | 0,61±0,03    | 0,05         |
| <b>Herzgewicht / KG (mg/g)</b>                | 2,93±0,13                     | 2,79±0,09    | <b>0,02</b>  |
| <b>Rel. linksventrikuläres Gewicht (mg/g)</b> | 2,45±0,1                      | 2,33±0,08    | <b>0,02</b>  |
| <b>Harnstoff im Serum (mmol/l)</b>            | 9,0±0,7                       | 9,3±1,0      | 0,61         |
| <b>Kreatinin im Serum (µmol/l)</b>            | 43,2±3,3                      | 45,1±5,1     | 0,40         |
| <b>Kreatinin-Clearance (ml/min*100g)</b>      | 0,45±0,08                     | 0,33±0,04    | <b>0,003</b> |
| <b>Triglyceride (mmol/l)</b>                  | 0,76±0,1                      | 1,03±0,28    | <b>0,03</b>  |
| <b>Gesamtcholesterin (mmol/l)</b>             | 2,34±0,13                     | 2,35±0,29    | 0,91         |
| <b>HDL (mmol/l)</b>                           | 1,74±0,11                     | 1,65±0,19    | 0,26         |

#### 3.2.4. Untersuchung der Nieren

Bei MWF-Weibchen findet sich im Vergleich zu SHR-Weibchen eine hoch signifikant vermehrte Anzahl subkapsulärer Glomeruli ( $p < 0,0001$ ). Bei den konsomen Weibchen ließen sich nicht so viele subkapsuläre Glomeruli nachweisen wie bei den MWF-Weibchen ( $p < 0,05$ ), verglichen mit SHR-Weibchen findet sich jedoch auch bei den konsomen Weibchen eine hochsignifikant erhöhte Anzahl subkapsulärer Glomeruli ( $p < 0,0001$ ).

Die Auswertung der zur Abschätzung des Nierenschadens erhobenen Parameter RIF, TSI sowie relative Kollagen III Expression, ergab für die MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen

Ergebnisse, die mit denen der SHR-Weibchen vergleichbar waren. Die Werte der MWF-Weibchen waren bei allen betrachteten Parametern gegenüber den Werten der SHR- und MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ).

Die Glomerulosklerose war bei den Weibchen aller drei Stämme wenig ausgeprägt. Signifikante Unterschiede ließen sich nicht zeigen (Tabelle 7).

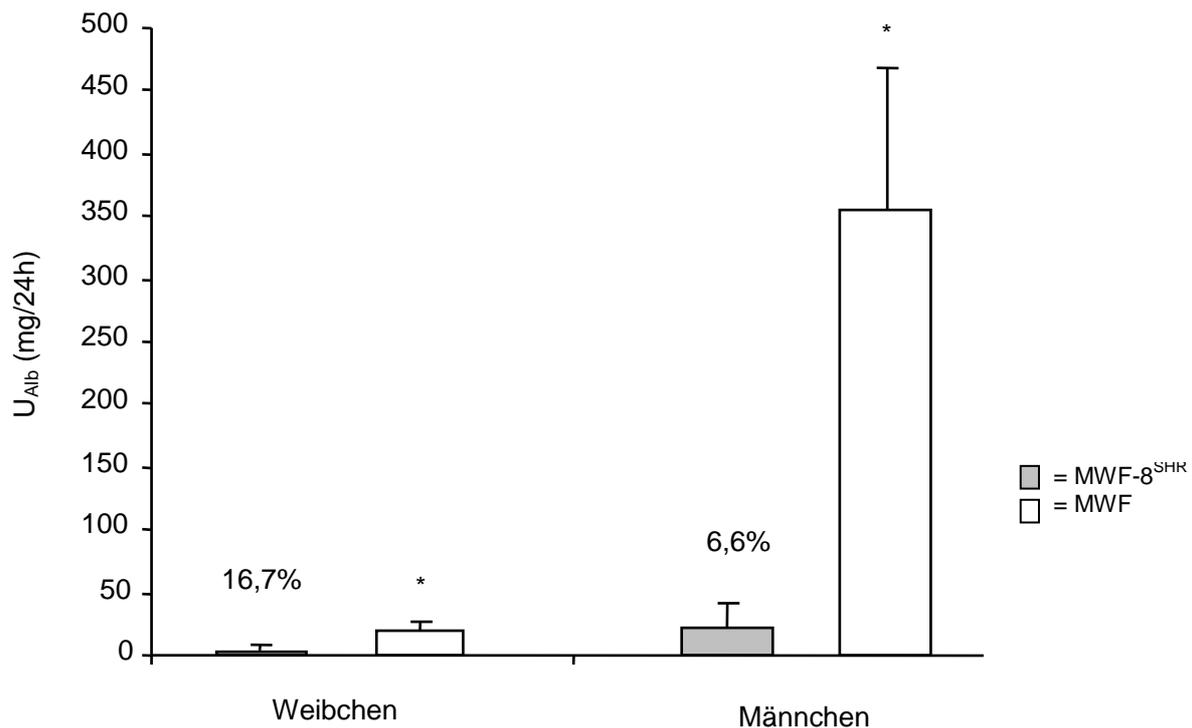
**Tab. 7: Auswertung der Nierenhistologie bei weiblichen SHR-, MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 24. Woche.**

|  | SHR<br>(n=10) | MWF-8 <sup>SHR</sup><br>(n=9) | MWF<br>(n=9) | overall<br>ANOVA  | MWF vs.<br>SHR    | MWF vs.<br>MWF-8 <sup>SHR</sup> | MWF-8 <sup>SHR</sup><br>vs. SHR |
|--|---------------|-------------------------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>Gesamt-Anzahl<br/>subkapsulärer<br/>Glomeruli (n)</b> | 1,0±1,0       | 17,0±2,7                      | 21,3±4,8     | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | <b>0,02</b>                     | <b>&lt;0,0001</b>               |
| <b>Glomerulosklerose-<br/>index (Grand 0-4)</b>          | 0,90±0,41     | 1,14±0,22                     | 0,93±0,08    | 0,15              |                   |                                 |                                 |
| <b>Tubulärer<br/>Schädigungsindex<br/>(Grad 0-3)</b>     | 0,07±0,07     | 0,03±0,04                     | 0,3±0,14     | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b>               | 1,00                            |
| <b>Renale interstitielle<br/>Fibrose (%)</b>             | 3,99±0,74     | 3,34±0,41                     | 4,87±0,94    | <b>0,0007</b>     | <b>0,05</b>       | <b>0,005</b>                    | 0,19                            |
| <b>Kollagen III/PBGD</b>                                 | 3,81±0,87     | 5,02±0,98                     | 7,77±2,11    | <b>&lt;0,0001</b> | <b>&lt;0,0001</b> | <b>0,001</b>                    | 0,23                            |

### 3.3. Untersuchung des sexuellen Dimorphismus beim konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Stamm

#### 3.3.1. Albuminexkretion

Wie beim MWF-Stamm zeigte sich auch bei den konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Tieren bei der Albuminausscheidung ein ausgeprägter Geschlechterunterschied. Die  $U_{Aib}$ -Werte der konsomen Weibchen waren von der 8. – 32. Woche rund 6-13x geringer als die der Männchen. Die Einführung von SHR RNO8 in den konsomen Stamm hatte bei männlichen und weiblichen Tieren eine vergleichbare Auswirkung auf die Albuminexkretion. Bei beiden konnte zu allen Messzeitpunkten eine ca. 83-93% geringere Albuminausscheidung gegenüber gleichgeschlechtlichen MWF-Tieren beobachtet werden. Beispielhaft ist in Abbildung 18 die 32. Woche dargestellt.



**Abb.:18: Albuminexkretion bei weiblichen und männlichen MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 32. Woche.**

Die Prozentangaben geben die Höhe der  $U_{\text{Alb}}$  konsumierter MWF-8<sup>SHR</sup>-Tiere in Relation zu der  $U_{\text{Alb}}$  gleichgeschlechtlicher MWF-Tieren an.

\*  $p < 0,0001$  vs. MWF-8<sup>SHR</sup>

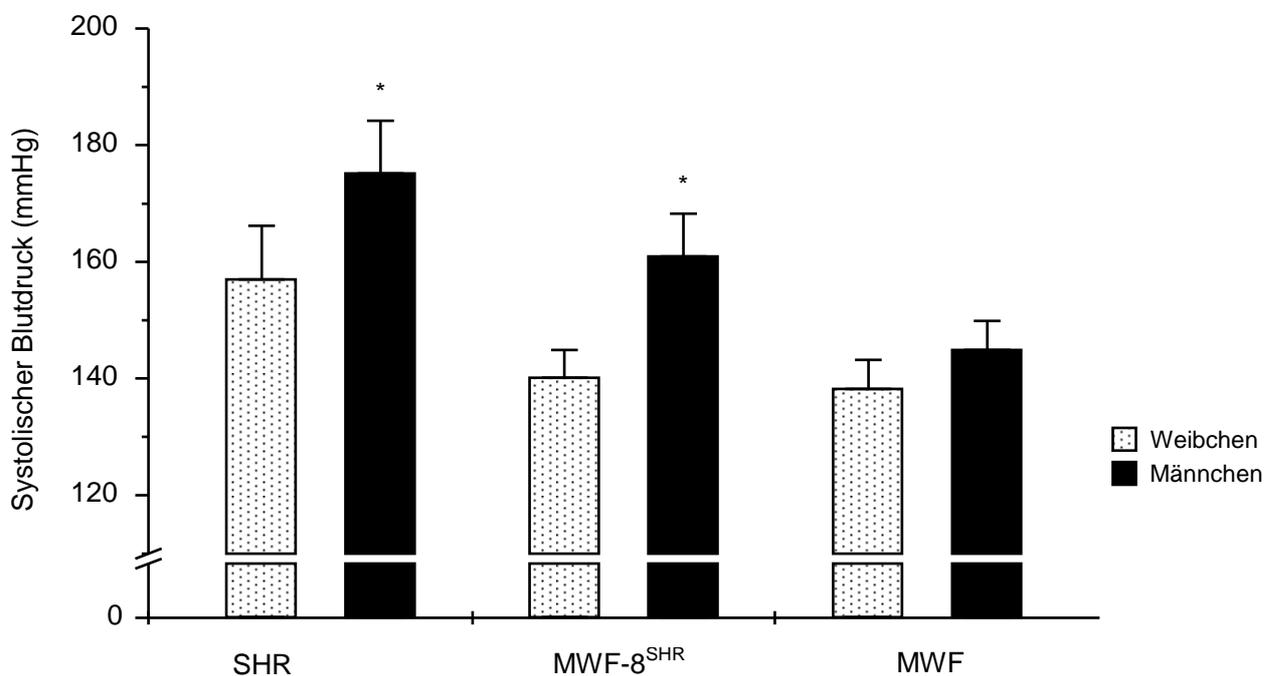
Bei den konsumierten F1-Tieren konnte dagegen bei Weibchen und Männchen ein unterschiedlicher Gendosiseffekt des heterozygoten SHR RNO8 beobachtet werden. Während die Albuminausscheidung der konsumierten F1-Männchen bereits ab der 14. Woche signifikant höher war als die der MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen, ließen sich bei den konsumierten F1-Weibchen Werte messen, die zu keinem Zeitpunkt signifikant von denen der MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen abwichen. In der 32. Woche stellte sich bei den konsumierten F1-Weibchen eine leicht erhöhte Albuminausscheidung gegenüber MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen ein, der Unterschied erreichte dabei nicht das Signifikanzniveau.

### 3.3.2. Systolischer Blutdruck

Für den systolischen Blutdruck besteht bei SHR-Tieren ein sexueller Dimorphismus. Die Werte der Männchen sind gegenüber den Weibchen in der 24. Woche um fast 20 mmHg erhöht ( $p < 0,0001$ ). Dieser Dimorphismus war bei den MWF-Tieren nicht so

stark ausgeprägt, zwischen beiden Geschlechtern besteht nur eine leichte, nicht signifikante Blutdruckdifferenz.

Die Überführung von SHR RNO8 führte bei den konsomen Männchen zu signifikant erhöhten Blutdruckwerten gegenüber MWF-Männchen. Bei den konsomen Weibchen ließen sich dagegen Werte messen, die nicht signifikant von denen der MWF-Weibchen abwichen. Der Blutdruckunterschied zwischen MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen und -Männchen betrug rund 20 mmHg ( $p < 0,0001$ ), damit war der sexuelle Dimorphismus hinsichtlich des systolischen Blutdrucks beim konsomen Stamm genauso prägnant wie beim SHR-Stamm (Abb. 19).



**Abb. 19:** Systolischer Blutdruck männlicher und weiblicher SHR-, MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 24. Woche.

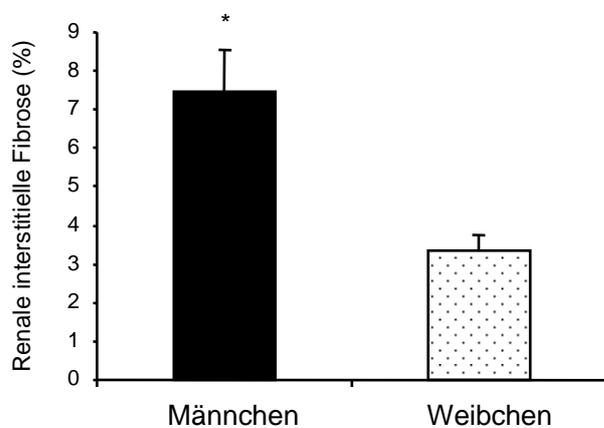
\*  $p < 0,0001$  vs. weibliche Tieren des gleichen Stammes

### 3.3.3. Strukturelle Veränderungen der Niere

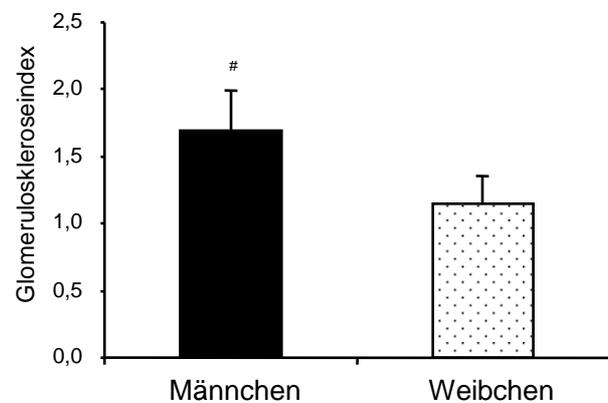
Die bei MWF-Männchen nachweisbaren strukturellen Veränderungen an der Niere sind beim weiblichen Geschlecht deutlich moderater ausgeprägt. Signifikante Unterschiede zu SHR-Weibchen lassen sich dennoch belegen. Der für den MWF-Stamm typische sexuelle Dimorphismus beim Grad der renalen Organschädigung ließ sich auch beim konsomen Stamm nachweisen und zeigte sich bei hier sogar noch deutlicher. Während bei den konsomen Weibchen Glomerulosklerose, tubulointerstitielle Schädigung, renale

interstitielle Fibrose sowie Kollagen III Expression auf ein Maß reduziert waren, dass sich nicht signifikant von den SHR-Weibchen unterschied, waren diese Parameter bei den konsomen Männchen gegenüber gleichgeschlechtlichen SHR-Tieren signifikant erhöht wie bei den MWF-Männchen (Abb. 20-22).

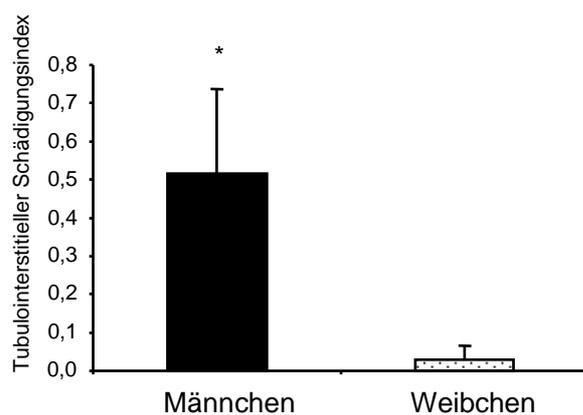
Die Auszählung der oberflächlichen Glomeruli an histologischen Nierenschnitten ergab dagegen keinen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen MWF-8<sup>SHR</sup>-Tieren (Abb. 23). Die Anzahl oberflächlicher Glomeruli war bei beiden Geschlechtern gleichwertig und gegenüber SHR-Tieren hoch signifikant erhöht (Tabellen 2 und 7).



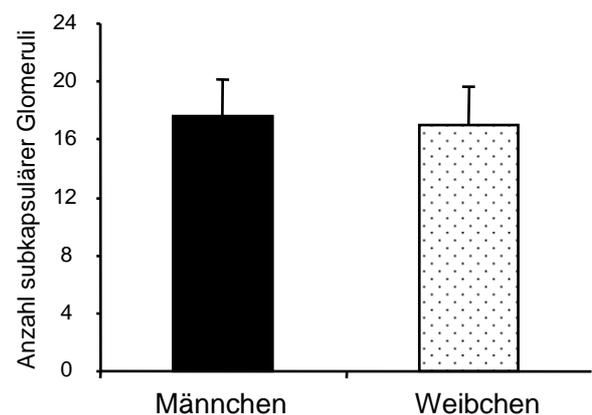
**Abb. 20:** Renale interstitielle Fibrose bei weiblichen und männlichen MWF-8<sup>SHR</sup>-Ratten in der 24. Woche.  
\*  $p < 0,0001$



**Abb. 21:** Glomeruloskleroseindex bei weiblichen und männlichen MWF-8<sup>SHR</sup>-Ratten in der 24. Woche.  
#  $p < 0,05$



**Abb. 22:** Tubulointerstitieller Schädigungsindex bei weiblichen und männlichen MWF-8<sup>SHR</sup>-Ratten in der 24. Woche.  
\*  $p < 0,0001$



**Abb. 23:** Anzahl subkapsulärer Glomeruli bei weiblichen und männlichen MWF-8<sup>SHR</sup>-Ratten in der 24. Woche.

### 3.4. Beurteilung der Albuminurie kongener Tiere in der achten Woche

Bislang gelang es in der Arbeitsgruppe vier kongene Linien zu etablieren, die verschieden lange Abschnitte von SHR RNO8, bei sonst isogenetischem MWF-Hintergrund in ihrem Genom tragen.

Die kongene Linie MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat163) besitzt mit 79,2 cM den längsten SHR RNO8-Abschnitt, der sich von Marker D8Rat71 bis D8Rat163 erstreckt. Beim der MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat46)-Linie ist der SHR RNO8-Abschnitt 68,4 cM lang und reicht von Marker D8Rat71 bis D8Rat46. Der nächst kleinere SHR RNO8-Abschnitt findet sich bei der MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat35)-Linie, dieser ist 47,2 cM lang und reicht von Marker D8Rat71 bis D8Rat35. Der mit 28,6 cM kürzeste SHR RNO8-Abschnitt reicht von Marker D8Rat71 bis D8Rat19 und kennzeichnet die MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat19)-Linie (Abb. 24)

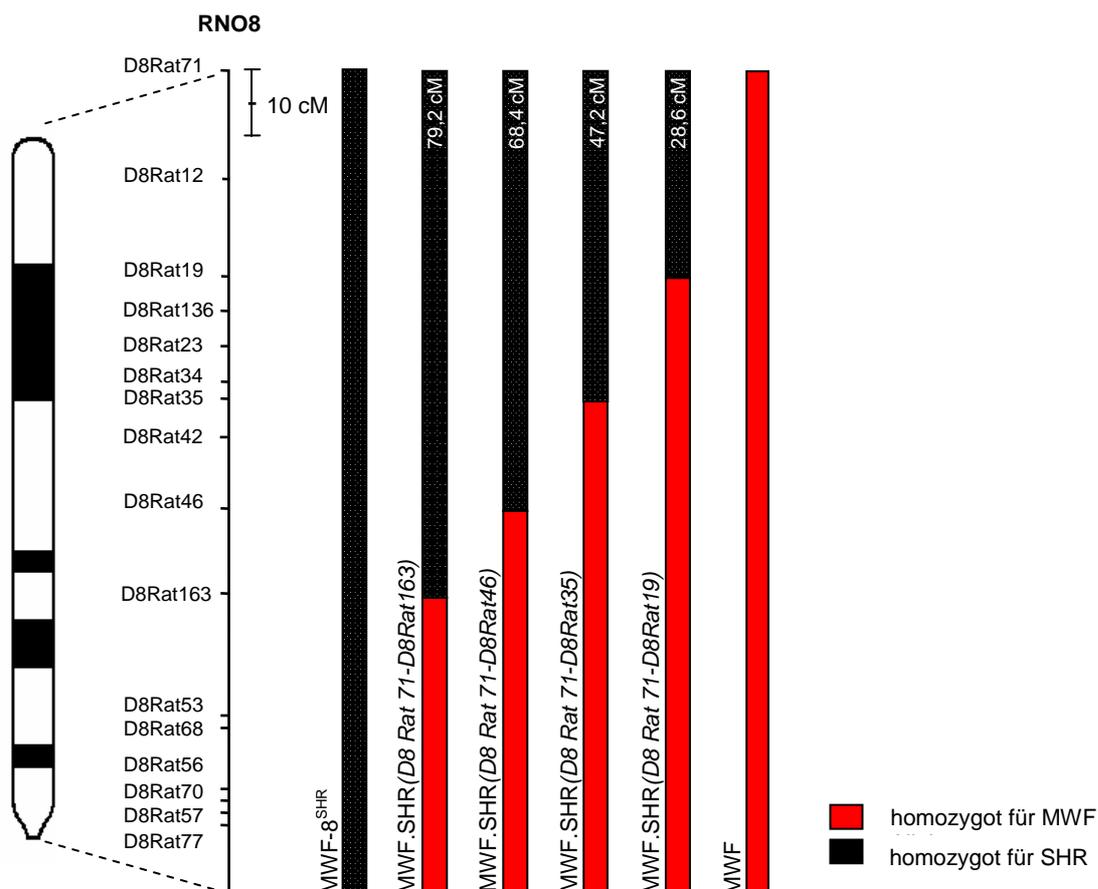
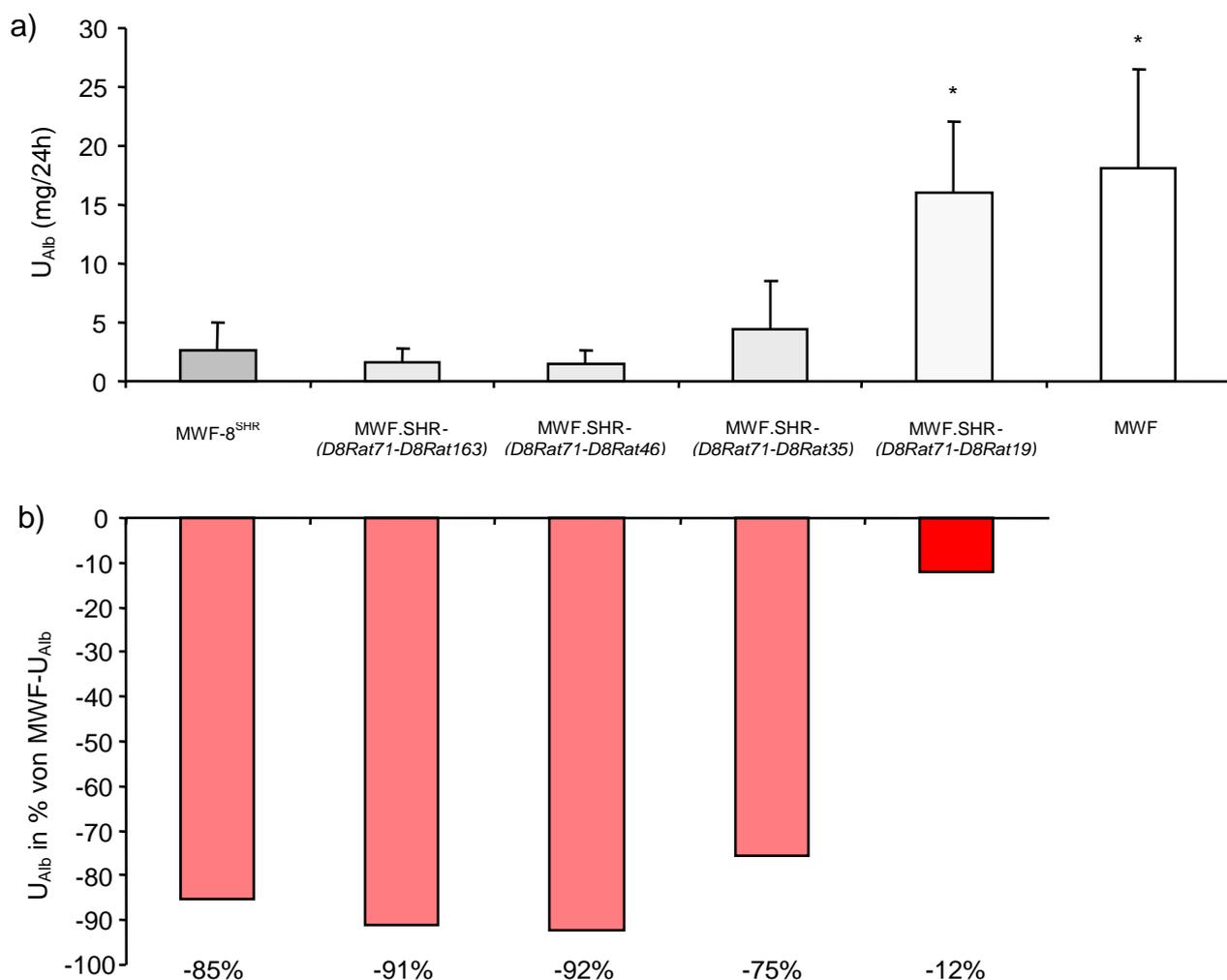


Abb. 24 Cytogenetische und genetische Karte von RNO8. Auf der rechten Seite ist die Allelverteilung auf RNO8 bei MWF- und MWF-8<sup>SHR</sup>-Tieren sowie den 4 kongenen Linien dargestellt.

Zur Detektierung von Unterschieden in der Höhe der Albuminexkretion zwischen den kongenen Linien wurden in der achten Woche 24h-Sammelurine abgenommen. Bei den beiden kongenen Linien mit dem längsten Abschnitt des SHR RNO8-Allels MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat163) und MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat46) wurden mit  $1,61 \pm 1,24$  mg/24h und  $1,43 \pm 1,17$  mg/24h die niedrigsten  $U_{\text{Alb}}$ -Werte der kongenen Stämme gemessen. Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant von  $U_{\text{Alb}}$ -Werten gleichaltriger konsomer MWF-8<sup>SHR</sup>-Tiere (Abb. 25).



**Abb. 25** a) Albuminausscheidung bei MWF-8<sup>SHR</sup>-, kongenen, und MWF-Tieren in der 8. Woche. Die Reihung der Stämme in der Abbildung erfolgte nach Größe des übertragenen SHR RNO8-Abschnitts.

\*  $p < 0,0001$  vs. MWF-8<sup>SHR</sup>, MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat163), MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat46) und MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat35)

b) Prozentuale Verminderung der  $U_{\text{Alb}}$  der kongener Linien und des konsomen Stammes MWF-8<sup>SHR</sup> in Relation zur  $U_{\text{Alb}}$  von MWF-Tieren in der 8. Woche.

Die kongene Linie MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat35) zeigte mit einer durchschnittlichen Albuminausscheidung von  $4,45 \pm 4,01$  mg/24h leicht höhere Werte als die beiden eben beschriebenen Linien, der Unterschied war hierbei jedoch nicht signifikant. Somit waren die  $U_{\text{Alb}}$ -Werte des konsomen Stammes MWF-8<sup>SHR</sup> und der drei kongenen Linien MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat163), MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat46) und MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat35) gleichartig und gegenüber den Werten von MWF-Tieren in der achten Woche hochsignifikant um 75 – 92% reduziert.

Bei der kongenen Linie MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat19), welche den kürzesten Abschnitt des SHR RNO8 trägt, ließen sich mit  $15,98 \pm 6,11$  mg/24h die höchsten  $U_{\text{Alb}}$ -Werte messen. Die Höhe der Albuminausscheidung bei dieser Linie war nicht signifikant unterschiedlich von der gleichaltriger MWF-Tiere. Gegenüber des konsomen Stammes und der drei kongenen Linien mit größeren Abschnitten des SHR RNO8 war die Albuminexkretion der MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat19)-Tiere hochsignifikant erhöht (Abb. 25).

Der Umschlag von niedrigen zu hohen  $U_{\text{Alb}}$ -Werten befindet sich zwischen den beiden Linien MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat35) und MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat19). Die Albuminausscheidung steigt von der MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat35)-Linie im Vergleich zur MWF.SHR-(D8Rat71-D8Rat19)-Linie sprunghaft um rund 11,5 mg/24h an. Das diskriminierende Intervall entspricht dem Bereich zwischen den Markern D8Rat35 und D8Rat19. Dieser Abschnitt ist 18,6 cM lang.

## 4. Diskussion

In der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen stellt die Mikroalbuminurie als Marker einer beginnenden Nierenschädigung neben der arteriellen Hypertonie einen Hauptrisikofaktor dar (Gerstein et al., 2001; Hillege et al., 2002). Die Ursachen chronisch albuminurischer Nephropathien, welche zu terminalem Nierenversagen führen können, sind vielfältig. Die Nierenschädigung kann als eine Folgeerkrankung auftreten, durch Störungen der fetalen Nierenentwicklung oder durch prädisponierende genetische Einflüsse bedingt sein (Tryggvason et al., 2006; Schreuder Nauta 2007; Wolf, Ziyadeh 2007). Eine erblich bedingte verminderte Nephronenzahl ist ein frühzeitiger Indikator für die spätere Entwicklung von arterieller Hypertonie, glomerulärer Hyperfiltration und nachfolgenden Nierenerkrankungen (Amann et al., 2006; Brenner et al., 1988; Gross et al., 2005; Zandi-Nejad et al., 2005). Unabhängig von der zugrunde liegenden Ursache scheinen die pathologischen Entwicklungen chronisch albuminurischer Nephropathien in einen typischen finalen Verlauf zu münden, bei dem eine erhöhte tubuläre Albuminreabsorption zu einer interstitiellen Entzündung mit nachfolgender renaler interstitieller Fibrose führt (Hirschberg, Wang 2005; Schulz et al., 2003).

Die Munich Wistar Frömter-Ratte stellt ein aus klinischer Sicht hochinteressantes Tiermodell dar, an dem sich dieser Verlauf beobachten lässt. Die Tiere entwickeln eine spontane Hypertonie und frühzeitig Albuminurie. Bei adulten Ratten lassen sich eine leichte Glomerulosklerose, tubulointerstitielle Schädigungen und eine renale interstitielle Fibrose nachweisen. Weitere interessante, phänotypische Auffälligkeiten sind das Vorkommen subkapsulärer Glomeruli sowie eine verminderte Anzahl der Gesamtnephronen pro Niere.

Die Albuminurie stellt ein quantitatives Merkmal dar, dessen Ausprägung neben Umwelteinflüssen durch viele verschiedene Gene beeinflusst wird. Hierbei sind die Auswirkungen der einzelnen Gene voneinander sowie vom Hintergrundgenom abhängig. Die Genomabschnitte auf denen sich Gene befinden, welche quantitative Merkmale beeinflussen, werden als Quantitative Trait Loci bezeichnet (Rapp 2000). Dass die Albuminurie auch bei der MWF-Ratte einem polygenetischen Einfluss unterliegt, konnte durch zwei Kosegregations- und Kopplungsanalysen belegt werden, bei denen mindestens 11 Albuminurie-QTL nachgewiesen wurden (Schulz et al., 2002, Schulz et al., 2003). Zwei QTL mit herausragender Kopplung zur Albuminurie wurden

durch Untersuchungen von MWFxSHR-Backcrosspopulationen auf MWF RNO6 und RNO8 detektiert (Schulz et al., 2003). Für den QTL auf Chromosom 6 konnte diese Kopplung bereits bei jungen Ratten im Alter von 8 Wochen nachgewiesen werden, die mit steigendem Alter der Tiere weiter zunahm. Der QTL auf RNO6 ko-lokalisierte zudem mit einem QTL für renale interstitielle Fibrose. Für den QTL auf RNO8 ließ sich eine Kopplung mit Albuminurie bei älteren Tieren, ab der 14. Woche feststellen. Eine Ko-Lokalisation mit einem QTL für RIF oder einem anderen Merkmal lag hier nicht vor (Schulz et al., 2003). Durch Züchtung konsomer und kongener Stämme können bestimmte QTL vor einem festgelegten genetischen Hintergrund untersucht werden. So konnte in einer vorangehenden Arbeit gezeigt werden, dass im konsomen MWF-6<sup>SHR</sup> Stamm die Entwicklung der Albuminurie fast vollständig unterdrückt werden konnte. Zudem wiesen diese Tiere nicht die für den MWF-Stamm charakteristische Reduktion der Gesamt-Nephronenanzahl auf und zeigten im Vergleich zu diesen auch deutlich moderatere strukturelle Veränderungen der Niere (Schulz et al., 2007).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden männliche und weibliche Tiere des neu etablierten konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Stammes in einer Altersverlaufsstudie phänotypisch untersucht, um den Einfluss des QTL auf RNO8 auf die Albuminurie junger und adulter Tiere gezielt zu ermitteln und weiterhin die Auswirkungen dieses QTL auf systolischen Blutdruck, strukturelle Nierenveränderungen und Nephronenanzahl herauszuarbeiten. Die so erhobenen Daten wurden mit Daten der Parentaltierstämme verglichen. Da bei der MWF-Ratte ein geschlechtsspezifischer Unterschied bei der Ausprägung von Blutdruck, Albuminurie und renalen Veränderungen besteht, der mit einer stärkeren Ausprägung der Phänotypen beim männlichen Geschlecht einhergeht, wurden die Kosegregations- und Kopplungsanalysen an männlichen Tieren durchgeführt. Welche Bedeutung den auf diese Weise nachgewiesenen QTL beim weiblichen Geschlecht zukommt, konnte in diesen Studien nicht beantwortet werden. Auch beim Menschen fällt bei der Betrachtung von Inzidenz und Progression kardiovaskulärer und chronisch renaler Erkrankungen auf, dass Männer häufiger betroffen sind als gleichaltrige prämenopausale Frauen (Neugarten 2002; Pechère-Bertschi, Bunier 2004; Reckelhoff 2001). Die genauen Ursachen und Mechanismen, die zu diesem Phänomen führen, sind noch weitgehend unbekannt. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit, die Auswirkungen des QTL auf RNO8 auf den Phänotyp beider Geschlechter getrennt betrachtet und die Daten verglichen und mögliche Unterschiede zu erfassen.

Die Ergebnisse der Alterverlaufsstudie zeigen, dass durch Überführung des SHR RNO8 in den isogenetischen MWF-Hintergrund die Manifestation der Albuminurie bei männlichen und weiblichen konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Tieren signifikant verzögert und ihre Progression hochgradig reduziert werden konnte.

Bei MWF-Tieren manifestiert sich eine erhöhte Albuminurie zwischen der 4.- und 8. Woche. In der Kosegregations- und Kopplungsanalyse zwischen MWF- und SHR-Männchen war eine Kopplung des QTL auf RNO8 mit Albuminurie jedoch erst ab der 14. Woche nachweisbar. Somit schien es sich hierbei um einen QTL zu handeln, welcher erst mit zunehmendem Alter der Tiere an Bedeutung gewinnt. Interessanterweise zeigte sich dagegen bereits bei jungen MWF-8<sup>SHR</sup>-Tieren in der 8. Woche ein entscheidender Einfluss des übertragenen SHR RNO8 auf die Ausprägung der Albuminurie. So waren die Albuminwerte konsomer MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen in der 8. Woche gegenüber MWF-Männchen um 85% reduziert ( $p < 0,0001$ ). Bei den jungen konsomen Weibchen konnte sogar eine 92%ige Verminderung der Albuminausscheidung gegenüber gleichaltrigen MWF-Weibchen verzeichnet werden ( $p < 0,0001$ ). Möglicherweise liegt der Albuminurieentwicklung junger MWF-Tiere eine Interaktion multipler Gene, mit jeweils kleinem Einfluss, zugrunde. Der frühzeitige Einfluss des QTL auf RNO8 auf die Albuminausscheidung könnte hierdurch in der Kosegregations- und Kopplungsanalyse nicht detektierbar gewesen sein.

Im weiteren Altersverlauf zeigten sowohl MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen als auch MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen eine deutlich moderatere Progression der Albuminausscheidung. Die Werte der konsomen Tiere waren zu jedem Zeitpunkt um 83 – 93% gegenüber den Werten gleichgeschlechtlicher MWF-Tiere vermindert ( $p < 0,0001$ ). Bei MWF-Männchen steigt die Albuminausscheidung mit dem Alter bis hin zu nephrotischen Werten. Diese Entwicklung konnte durch den genetischen Austausch des RNO8 vollständig unterdrückt werden.

Wie beim MWF-Stamm lag auch beim konsomen Stamm ein starker sexueller Dimorphismus hinsichtlich der Albuminausscheidung vor, mit weit niedrigeren Werten bei den Weibchen. Die Auswirkung des überführten SHR RNO8 auf die  $U_{\text{Alb}}$  war trotzdem bei den beiden Geschlechtern ähnlich. So konnte bei konsomen Männchen und Weibchen eine vergleichbar starke Reduktion der Albuminurie gegenüber gleichgeschlechtlichen MWF-Tieren festgestellt werden. Unter dem polygenetischen Aspekt der Albuminurie betrachtet ist es bemerkenswert, dass der genetische Austausch eines einzigen RNO einen derart großen Einfluss auf den Phänotypen hat.

Durch Betrachtung einer konsomen F1-Generation war es möglich den Gen-Dosiseffekt eines heterozygoten RNO8 auf die Albuminexkretion zu testen. Bemerkenswerterweise konnte hierbei bei männlichen und weiblichen Tieren eine unterschiedliche Auswirkung des einzeln vorliegenden MWF RNO8 auf den Phänotypen festgestellt werden. Bei konsomen F1-Männchen war die Albuminexkretion bis zur einschließlich 8. Woche vergleichbar mit der von MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen. Ab der 14. Woche kam bei den konsomen F1-Männchen jedoch ein Dosiseffekt des MWF RNO8 zum tragen. Die Albuminausscheidung der Tiere war ab diesem Alter signifikant höher als die der MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen ( $p < 0,05$ ). Eine maximale Reduktion der Albuminausscheidung gegenüber MWF-Männchen war beim männlichen Geschlecht also nur beim Vorliegen von zwei SHR RNO8 Allelen gegeben.

Beim weiblichen Geschlecht konnte demgegenüber bereits durch ein SHR RNO8 Allel die Albuminexkretion fast vollständig reduziert werden. Zwischen den  $U_{\text{Aib}}$ -Werten der konsomen F1-Weibchen und denen der MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen ließen sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede feststellen.

Die Gene des QTL auf MWF RNO8 scheinen beim weiblichen Geschlecht sowie bei jungen männlichen Tieren einen rezessiven Einfluss auf die Höhe der Albuminausscheidung zu haben. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit zahlreichen Studien, die vielen rezessiven Genen eine Beteiligung bei der Albuminurieentwicklung zusprechen (Garett et al., 2003; Murayama S et al., 1998; Shiozawa et al., 2000; Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Bei älteren männlichen Tieren kommt es dagegen bereits beim Vorliegen eines heterozygoten MWF RNO8 zu einer erhöhten Albuminausscheidung. Es ist denkbar, dass sich auf dem QTL auf RNO8 Gene befinden, die insbesondere die Progression der Albuminurie bei älteren männlichen Tieren begünstigen. Die Ergebnisse der Kopplungsanalyse, bei der eine Kopplung des QTL auf RNO8 mit Albuminurie erst ab der 14. Woche nachweisbar war, unterstützen diese Annahme. Ursächlich hierfür könnten Gen-Gen-Interaktionen sein, die bei älteren männlichen Tieren eine andere Auswirkung haben als bei weiblichen. Des Weiteren ist es möglich, dass geschlechtsspezifische Unterschiede des renalen Blutflusses und des Renin-Angiotensin-Systems sowie der direkten Einflüsse der Sexualhormone altersabhängig zusätzlich protektierende Risikofaktoren bei männlichen Tieren darstellen (Ijpelaar et al., 2007).

Um auszuschließen, dass die Verbesserung der Nierenfunktion bei den konsomen Tieren durch eine Senkung des systolischen Blutdrucks bedingt worden war, wurde der Blutdruck weiblicher und männlicher MWF-8<sup>SHR</sup>-Tiere in der 14. und 24. Woche bestimmt. Die beiden Parentaltierstämme MWF und SHR weisen einen arteriellen Hypertonus auf (Fassi et al., 1998; Kreutz et al., 2000; Pinto et al., 1998; Remuzzi et al., 1992; Schulz et al., 2003; Schulz et al., 2007). Hierbei ist der Blutdruck der SHR-Tiere signifikant höher als der der MWF-Tiere (Schulz et al., 2007; Schulz et al., 2008). Die Messung des systolischen Blutdrucks der konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Tiere ergab ebenfalls für beide Geschlechter zu beiden Messzeitpunkten erhöhte Befunde. Beim Vergleich von männlichen mit weiblichen konsomen Tieren ließen sich jedoch verschiedene Auswirkungen des überführten SHR RNO8 auf den Blutdruck der Tiere herausarbeiten. Bei den konsomen Weibchen wurden Werte gemessen, die sich nicht signifikant von denen der MWF-Weibchen unterschieden. Dagegen zeigten die MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen Blutdruckwerte, die intermediär zwischen denen von MWF und SHR lagen und von beiden signifikant abwichen ( $p < 0,0001$ ). Die Überführung des SHR RNO8 brachte also nur bei den männlichen Tieren eine signifikante Blutdruckerhöhung gegenüber MWF-Männchen mit sich.

Die SHR-Ratte ist ein seit über 30 Jahren intensiv studiertes Tiermodell, für welches auf verschiedenen Chromosomen blutdruckregulierende QTL beschrieben sind (Pravenec et al., 2008; Rapp 2000; Siegel et al., 2004). Eine 1997 von Kren et al. veröffentlichte Studie schreibt einer Region auf SHR RNO8 einen Einfluss auf Bluthochdruck und kardiale Hypertrophie zu, die mit einem 1995 von Schork et al. detektierten Blutdruck QTL übereinstimmt (Kren et al. 1997; Schork et al., 1995). Kürzlich konnte auf SHR RNO8 ein weiterer QTL gefunden werden, der bei den Tieren die Herzfrequenz anhebt und somit ebenfalls eine Hypertonie begünstigen könnte (Silva et al., 2008). Da diese Studien an männlichen Ratten vorgenommen wurden, bieten sie ein plausibles Erklärungsmodell für den bei MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen gegenüber MWF-Männchen beobachteten Blutdruckanstieg. Es ist gut möglich, dass blutdrucksteigernde Gene mit dem SHR RNO8 in das MWF-Genom eingeführt wurden. Dass bei konsomen weiblichen Tieren kein Blutdruckanstieg gegenüber MWF-Weibchen festgestellt werden konnte, könnte an dem Vorhandensein protektiver Faktoren oder dem Fehlen zusätzlicher Risikofaktoren beim weiblichen Geschlecht liegen.

Die Blutdruckuntersuchungen machen die Relevanz des QTL auf RNO8 deutlich. Bei männlichen und weiblichen MWF-8<sup>SHR</sup>-Tieren führten die SHR RNO8 Allele zu einer

drastischen Reduktion der Albuminausscheidung, obwohl zumindest bei den konsomen Männchen als zusätzlicher Risikofaktor ein gegenüber MWF-Männchen erhöhter Blutdruck vorlag. Hieraus wird deutlich, dass die Überführung von SHR RNO8 eine Verbesserung der Albuminausscheidung bewirkte, die unabhängig von der Höhe des arteriellen Blutdrucks zu sehen ist.

Zur makroskopischen Beurteilung der Organschädigung wurden alle Tiere am Ende der Verlaufsstudie präpariert, Herz und Nieren entnommen und die relativen, zum Körpergewicht ins Verhältnis gesetzten Organgewichte verglichen. Das Körpergewicht differierte nicht signifikant zwischen den Stämmen, wobei die Männchen gut 150 g schwerer waren, als die Weibchen. Als Zeichen einer kardialen Hypertrophie weisen SHR-Tiere in der 24. Woche gegenüber gleichgeschlechtlichen MWF-Tieren ein hochsignifikant erhöhtes relatives Herzgewicht und erhöhtes linksventrikuläres Gewicht auf ( $p < 0,0001$ ). Für männliche MWF-8<sup>SHR</sup>-Tiere ließen sich in der 24. Woche ein relatives Herzgewicht und linksventrikuläres Gewicht bestimmen, die gegenüber denen der SHR-Männchen hochsignifikant vermindert waren ( $p < 0,0001$ ). Verglichen mit MWF-Männchen wiesen MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen zwar ein ähnliches relatives Herzgewicht auf, das relative linksventrikuläre Gewicht war bei den konsomen Männchen jedoch signifikant höher ( $p < 0,05$ ). In der 32. Woche konnten für das relative Herzgewicht und linksventrikuläre Gewicht der konsomen Männchen signifikant höhere Werte verzeichnet werden als für gleichaltrige MWF-Männchen ( $p < 0,05$ ). Diese Erhöhung könnte mit dem gegenüber MWF-Tieren erhöhten systolischen Blutdruckwerten der konsomen Männchen assoziiert sein und eine Anpassungsreaktion auf die hypertoniebedingte Mehrarbeit des Organs darstellen.

Der systolische Blutdruck der konsomen Weibchen unterschied sich bis zur 24. Woche nicht von dem der MWF-Weibchen. In Einklang hiermit stehen die in der 24. Woche erhobenen Präparationsdaten. Für relatives Herzgewicht und linksventrikuläres Gewicht ließen sich für MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Weibchen vergleichbare Werte ermitteln. In der 32. Woche zeigte sich bei weiblichen MWF-8<sup>SHR</sup>- gegenüber MWF-Tieren eine signifikante Erhöhung des relativen Herzgewichts und linksventrikulären Gewichts ( $p < 0,05$ ). Ob diese Veränderungen mit einer Zunahme des systolischen Blutdrucks der konsomen Weibchen nach der 24. Woche einhergehen oder ob es sich um einen Zufallsbefund handelt, muss in nachfolgenden Studien untersucht werden.

Das relative Nierengewicht männlicher MWF-Ratten ist gegenüber SHR-Ratten signifikant vermindert. Mögliche Ursache hierfür könnte die fortschreitende Sklerosierung und Fibrosierung des Organs sein. Das in der 24. Woche gemessene relative Nierengewicht der konsomen Männchen lag intermediär zwischen den Werten der Parentaltierstämme mit nicht signifikanter Abweichung in beide Richtungen. Auch in der 32. Woche differierten die relativen Nierengewichte der MWF- und MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen nicht.

Bei den MWF- und MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen ließen sich weder in der 24., noch in der 32. Woche Unterschiede hinsichtlich des relativen Nierengewichtes feststellen.

Es lässt sich folgern, dass das relative Nierengewicht weiblicher und männlicher MWF-8<sup>SHR</sup>-Tiere nicht mit der gegenüber gleichgeschlechtlichen MWF-Tieren verminderten Albuminausscheidung korreliert. Trotz verbesserter Albuminwerte bei den konsomen Tieren unterschied sich deren relatives Nierengewicht zu keinem Zeitpunkt signifikant von dem der MWF-Tiere.

Ein weiterer wichtiger Parameter zur Einschätzung der Nierenfunktion ist die glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Diese Größe gibt an, wie viel Primärharn von beiden Nieren zusammen pro Zeiteinheit filtriert wird. Zur Abschätzung der GFR hat sich die Bestimmung der Kreatininclearance als praktikabel erwiesen (Levey et al., 2003), die Methode birgt jedoch einige Fehlerquellen. Kreatinin ist ein Stoffwechselprodukt des Muskelgewebes, das frei im Glomerulus filtriert wird und durch die Niere weder rückresorbiert noch metabolisiert wird. Bei Einschränkungen der Nierenfunktion wird Kreatinin jedoch zusätzlich vermehrt tubulär sezerniert, wodurch ein glomerulärer Schaden relativ lange kompensiert werden kann und sich durch alleinige Berechnung der Kreatininclearance nicht erfassen lässt. Erst bei einer starken Einschränkung der Nierenfunktion steigt das Serumkreatinin an. Neben der Nierenfunktion hängt die Kreatininkonzentration im Serum zusätzlich von der Muskelmasse und diese wiederum von Alter und Geschlecht ab. Aufgrund dieser Limitationen müssen die Ergebnisse der Kreatininclearanceberechnung sehr kritisch betrachtet werden. Durch die zusätzliche Berücksichtigung der Harnstoffkonzentration im Serum kann eine genauere Einschätzung der Nierenfunktion erfolgen (Stevens, Levey 2005).

In der 24. Woche ließ sich bei den Männchen aller drei Stämme eine vergleichbare Kreatininclearance errechnen. Die Serum-Harnstoff-Konzentration war jedoch bei MWF- und MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen gegenüber SHR-Männchen signifikant erhöht ( $p < 0,0001$ ),

was auf eine beginnende Einschränkung der glomerulären Filtrationsleistung bei diesen beiden Stämmen hinweist. Auch in der 32. Woche zeigten MWF- und MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen eine ähnlich hohe Kreatininclearance. Zu diesem Zeitpunkt waren die Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen im Serum männlicher MWF-Tiere signifikant gegenüber denen von MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen erhöht ( $p < 0,05$ ). Möglicherweise spiegelt dieser Befund die schnellere Progression der Nierenfunktionseinschränkung bei MWF-Männchen wieder.

Die MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen wiesen in der 24. Woche eine höhere Kreatininclearance auf als gleichaltrige SHR- und MWF-Weibchen, wobei der Unterschied nur gegenüber den MWF-Weibchen signifikant war ( $p < 0,05$ ). Zu diesem Zeitpunkt wurde bei MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Weibchen eine gleichwertige, gegenüber SHR-Weibchen signifikant erhöhte Serumharnstoff- und Serumkreatininkonzentration gemessen. Der in der 32. Woche durchgeführte Vergleich von MWF- und MWF-8<sup>SHR</sup>-Tieren führte zu ähnlichen Ergebnissen. Bei MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen konnte eine höhere Kreatininclearance festgestellt werden, als bei MWF-Weibchen. Die Serumharnstoff- und Serumkreatininkonzentrationen der beiden Stämme differierten jedoch nicht voneinander.

Unter Berücksichtigung der Limitationen der Methode lässt sich festhalten, dass sich die hinsichtlich der  $U_{Alb}$  verbesserte Nierenfunktion der konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Tiere nicht eindeutig in den Parametern Kreatininclearance, Serumharnstoff- und Serumkreatininkonzentration als Ausdruck der GFR widerspiegelt. Lediglich bei den Männchen in der 32. Woche zeichnete sich eine Tendenz ab.

Charakteristische Symptome einer hochgradigen Nierenfunktionsstörung, bis hin zum nephrotischen Syndrom sind neben einem massiven renalen Proteinverlust das Auftreten von peripheren Ödemen, Hypoalbuminämie sowie Dyslipidämie (Hull, Goldsmith 2008). Hierbei korreliert die Schwere der Nierenfunktionseinschränkung mit dem Grad Dyslipidämie, welche sich bereits in frühen Stadien der Nierenschädigung manifestieren kann und einen zusätzlichen kardiovaskulären Risikofaktor darstellt (Kronenberg 2005; Tsimihodimos et al., 2008). Typische Merkmale der Dyslipidämie bei Nierenfunktionsstörungen sind erhöhte Triglyzerid- und Cholesterinwerte bei unveränderten oder verminderten HDL-Werten (Tsimihodimos et al., 2008).

Um einen Eindruck über den Fettstoffwechsel der Parentaltierstämme und des konsomen Stammes zu bekommen wurden die Parameter Triglyzeride, Gesamt-Cholesterin und HDL im Serum der Tiere bestimmt. Bei MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen ließen

sich in der 24. Woche Triglyzeridwerte messen, die sich nicht von denen der SHR-Männchen unterschieden und gegenüber MWF-Männchen signifikant erniedrigt waren ( $p < 0,05$ ). Die Gesamt-Cholesterin und HDL Bestimmung ergab für die konsomen Männchen Werte, die intermediär zwischen denen der Parentaltierstämme lagen und von beiden signifikant abwichen ( $p < 0,05$ ). Die Triglyzeridwerte der MWF-Männchen stiegen bis zur 32. Woche stark an, während bei den MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen in diesem Zeitraum nur ein moderater Anstieg der Werte zu beobachten war. Für die Cholesterinparameter war bei MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Männchen bis zur 32. Woche kaum ein Anstieg zu verzeichnen, die Werte der konsomen Männchen waren signifikant niedriger als die der MWF-Männchen.

Die Triglyzeridwerte der SHR-, MWF- und MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen unterschieden sich in der 24. Woche nicht signifikant voneinander. Wie bei den Männchen lagen auch die Gesamt-Cholesterin- und HDL-Werte der MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen in der 24. Woche intermediär zwischen den Werten der beiden Parentaltierstämme. Bis zur 32. Woche stiegen die Triglyzeridwerte der MWF-8<sup>SHR</sup>- und MWF-Weibchen nicht weiter an. Gesamt-Cholesterin- und HDL-Werte der Weibchen beider Stämme differierten zu diesem Zeitpunkt nicht voneinander.

Bei den MWF-Tieren ließ sich ein sexueller Dimorphismus bei den Parametern des Fettstoffwechsels feststellen, mit höheren Werten bei den Männchen. Männliche und weibliche MWF-8<sup>SHR</sup>-Tiere hatten dagegen vergleichbare Werte und somit keinen sexuellen Dimorphismus. Während der genetische Austausch von RNO8 bei männlichen MWF-8<sup>SHR</sup>-Tieren zu einer signifikanten Verbesserung der Fettstoffwechselfparameter gegenüber MWF-Männchen führte, war bei den MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen keine eindeutige Verbesserung der Parameter gegenüber den MWF-Weibchen nachzuweisen.

Um zu überprüfen ob die verminderte Albuminausscheidung der konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Tiere mit einer Normalisierung der strukturellen Nierenveränderungen einhergeht, wurden die Nieren der Tiere in der 24. Woche histologisch untersucht und die Parameter Glomerulosklerose, renale interstitielle Fibrose und tubuläre Schädigung bestimmt. Die Überführung von SHR RNO8 zeigte bei MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen keinen verbessernden Einfluss auf die strukturellen Nierenveränderungen. GSI, TSI und RIF waren bei den konsomen Männchen ebenso stark ausgeprägt wie bei den MWF-Männchen und gegenüber SHR-Tieren hoch signifikant erhöht ( $p < 0,0001$ ). Lediglich die

Bestimmung der Kollagen III Expression, als zusätzlichen Parameter der Nierenfibrosierung, ergab für MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen signifikant niedrigere Werte als für MWF-Männchen ( $p < 0,05$ ). Verglichen mit SHR-Männchen waren die Werte der konsomen Männchen jedoch immer noch signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Die Befunde unterstützen die Ergebnisse der Kosegregations- und Kopplungsanalyse, bei der das QTL auf RNO8 nicht mit einem QTL für RIF oder GSI ko-lokalisierte. Eine wichtige Erkenntnis hierbei ist, dass die Albuminausscheidung bei den konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen unabhängig von den strukturellen Nierenveränderungen reduziert wurde. Bei den Weibchen aller drei Stämme ließ sich keine Glomerulosklerose nachweisen. Die übrigen Parameter RIF, TSI sowie relative Kollagen III Expression waren bei den MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen auf das Maß der SHR-Weibchen reduziert und gegenüber den Werten der MWF-Weibchen signifikant vermindert ( $p < 0,05$ ). Anders als bei den Männchen führte die Überführung von SHR RNO8 in das MWF-Genom bei den Weibchen also zu einer Normalisierung der strukturellen Nierenveränderungen.

Eine postnatale Entwicklungsstörung führt bei MWF-Tieren zum Auftreten von subkapsulären Glomeruli. Auch bei männlichen MWF-8<sup>SHR</sup>-Tieren ließ sich eine entsprechend hohe Gesamtanzahl subkapsulärer Glomeruli ermitteln wie bei MWF-Männchen. Gruppieren nach subkapsulären Glomeruli mit Kapselkontakt und solchen ohne Kapselkontakt, zeigte sich bei den MWF-8<sup>SHR</sup>- gegenüber MWF-Männchen eine signifikante Verminderung der Glomeruli ohne Kapselkontakt ( $p < 0,05$ ), während die Anzahl der Glomeruli mit Kapselkontakt bei beiden Stämmen vergleichbar war. Gegenüber männlichen SHR-Ratten wiesen MWF- und MWF-8<sup>SHR</sup>-Männchen eine hochsignifikant erhöhte Anzahl subkapsulärer Glomeruli auf ( $p < 0,0001$ ).

Bei den MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen ließ sich eine Abnahme der subkapsulären Glomeruli gegenüber MWF-Weibchen nachweisen ( $p < 0,05$ ). Im Verhältnis zu SHR-Weibchen war jedoch auch bei den konsomen Weibchen die Anzahl subkapsulärer Glomeruli hochsignifikant erhöht ( $p < 0,0001$ ).

Der genetische Austausch des RNO8 führte bei konsomen Männchen und Weibchen zu einer leichten Reduktion, aber keiner Normalisierung der Anzahl subkapsulärer Glomeruli ohne Kapselkontakt. Da die Methode, mit der die subkapsulären Glomeruli bestimmt wurden, zu einem gewissen Grad untersucherabhängig ist, muss das Ergebnis kritisch betrachtet werden. Ob der Befund reproduzierbar ist und beim konsomen Stamm tatsächlich eine Reduktion der subkapsulären Glomeruli ohne

Kapselkontakt bzw. der Gesamtanzahl subkapsulärer Glomeruli gegenüber dem MWF-Stamm vorliegt, ist zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig feststellbar. Es ist jedoch möglich, dass sich auf RNO8 ein QTL mit geringem Einfluss auf Expression subkapsulärer Glomeruli befindet, welcher bei der ursprünglichen Kopplungsanalyse nicht identifiziert wurde.

Hackbarth et al. konnten bei MWF-Ratten eine Korrelation der Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit der Höhe der Albuminausscheidung und des systolischen Blutdrucks zeigen (Hackbarth et al., 1991). Dagegen dass es sich hierbei um einen rein funktionellen Zusammenhang handelt spricht, dass bei weiblichen MWF-Ratten trotz der wesentlich geringeren Albuminexkretion als bei MWF-Männchen, eine gleich hohe oder erhöhte Anzahl subkapsulärer Glomeruli vorliegt (Remuzzi et al., 1988; Schulz et al., 2007). Auch die Beobachtung, dass beim konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Stamm im Vergleich zum MWF-Stamm trotz nur geringfügig reduzierter Anzahl subkapsulärer Glomeruli eine hochgradige Verminderung der Albuminausscheidung vorliegt, deutet darauf hin, dass die subkapsulären Glomeruli nur bedingt Einfluss auf die Nierenfunktion ausüben. Die Albuminurie der MWF-Tiere kann demzufolge eine Eigenschaft darstellen, die bei der initialen Etablierung dieses Stammes für den Phänotypen subkapsuläre Glomeruli unbeabsichtigt mitselektiert wurde, aber nicht ursächlich von diesen abhängig ist.

Eine angeborene reduzierte Nephronenanzahl prädisponiert für die spätere Entwicklung von Bluthochdruck und begünstigt durch glomeruläre Hyperfiltration die Entstehung von hieraus resultierenden Nierenschädigungen wie Proteinurie und Glomerulosklerose (Brenner et al., 1988; Gross et al., 2005; Hoy et al., 2006; Keller et al., 2003; Schreuder Nauta 2007; Zandi-Nejad et al., 2005). Folglich ist die Vermutung, dass bei der MWF-Ratte eine pathophysiologische Verbindung zwischen der genetisch bedingten reduzierten Nephronenanzahl und anderen phänotypischen Auffälligkeiten wie Bluthochdruck, Albuminurie und strukturellen Nierenveränderungen besteht, nahe liegend. Die vorhergehenden Untersuchungen am konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm sprachen für diese Theorie. Neben einer verminderten Albuminurie und normalisierter Nierenstruktur wies dieser Stamm eine wesentlich höhere Nephronenanzahl auf als der MWF-Stamm (Schulz et al., 2007).

Überraschenderweise ergab dagegen die Analyse der Gesamt-Nephronenzahl pro Niere männlicher MWF-8<sup>SHR</sup>-Tiere in der 4. Woche gegenüber SHR-Männchen eine um

36% verminderte Anzahl der Gesamt-Nephronen ( $p < 0,0001$ ). Verglichen mit MWF-Männchen konnte bei den konsomen Tieren kein signifikanter Unterschied der Gesamt-Nephronenzahl festgestellt werden. Während die albuminuriesenkende Wirkung des SHR RNO6 beim konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm auf die Normalisierung der Gesamt-Nephronenzahl zurückgeführt werden könnte, scheint der QTL auf RNO8 einen unmittelbaren Einfluss auf die Albuminausscheidung auszuüben, der völlig unabhängig vom Nephronenmangel ist.

Die bislang nachgewiesenen pathologischen Veränderungen bei MWF-Tieren, welche bei der Manifestation und Progression der Albuminurie maßgeblich beteiligt sein könnten, betreffen vor allem glomeruläre Strukturen. So beobachteten Macconi et al., dass Albuminurie und Glomerulosklerose bei MWF-Männchen mit einem Untergang von Podozyten sowie einer reduzierten Nephrinexpression assoziiert sind (Macconi et al., 2006). Ijpelaar et al. konnten zeigen, dass eine glomeruläre Hypertrophie der Albuminurie und Glomerulosklerose voran geht. Weiterhin wurde bei albuminurischen MWF-Männchen eine verminderte Podoplanin- sowie gesteigerte Desminexpression der Podozyten festgestellt (Ijpelaar et al., 2008). In dieser Arbeit wurden zur Einschätzung der glomerulären Beeinträchtigung die Faktoren Kreatininclearance, Serumharnstoff- und Serumkreatininkonzentration, Anzahl subkapsulärer Glomeruli, Anzahl der Gesamt-Nephronen sowie der Glomeruloskleroseindex betrachtet. Obwohl die Ergebnisse keine Verbesserung der glomerulären Schädigungen bei den MWF-8<sup>SHR</sup>-Tieren gegenüber den MWF-Tieren erkennen ließen, wiesen die konsomen Tiere eine hochgradig reduzierte Albuminausscheidung auf. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Albuminurie auch bei der MWF-Ratte pathophysiologisch nicht ausschließlich von der Anzahl der Gesamt-Nephronen und strukturellen Veränderungen wie Glomerulosklerose und Nierenfibrose abhängig ist. Neben einem ursächlichen glomerulären Problem können bei MWF-Tieren zusätzlich weitere albuminuriefördernde Pathomechanismen, wie zum Beispiel eine tubuläre Fehlfunktion, vorliegen.

Inwieweit das QTL auf RNO8 mit weiteren QTL, insbesondere dem QTL auf RNO6, interagiert, muss in nachfolgenden Studien untersucht werden. Hierbei könnte die Etablierung und Untersuchung eines doppelkonsomen Stammes, bei dem sowohl RNO6 als auch RNO8 von SHR in den isogenetischen MWF-Hintergrund übertragen werden wichtige Antworten liefern. Auch die Züchtung eines konsomen SHR-8<sup>MWF</sup>-Stammes, bei dem das kranke RNO8 von MWF in den SHR-Stamm transferiert wird,

kann dazu beitragen, Erkenntnisse über die Abhängigkeit der Allele auf RNO8 vom Hintergrundgenom zu erlangen.

Das in der Kopplungsanalyse identifizierte QTL auf RNO8 erstreckt sich über einen relativ großen Bereich von 30 cM und kann somit bis zu 1200 Gene enthalten (Rapp 2000). Die homologe Chromosomenregion dieses QTL kartiert im menschlichen Genom in den Bereich 15q22-15q25 (Schulz et al., 2003). Wie eingangs beschrieben, wurden in den letzten Jahren mit Hilfe von Kopplungsanalysen beim Menschen bereits mehrere Albuminurie-QTL auf verschiedenen Chromosomen detektiert, wobei nur in einer einzigen Studie auf Chromosom 15 eine Kopplung zur Albuminurie bei Typ 2 Diabetikern nachgewiesen werden konnte (Iyengar et al., 2007). Die dort beschriebene Region 15q26.3 befindet sich jedoch außerhalb des zum QTL auf RNO8 homologen Bereichs. Da ingezüchtete Rattenstämme jeweils einen bestimmten Subtyp einer polygenetischen Erkrankung wie Albuminurie darstellen, ist es dennoch gut möglich, dass sich in der 15q22-15q25 Region Gene befinden, die für die Albuminurie beim Menschen von klinischer Bedeutung sind, auch wenn für diesen Bereich in humanen Studien bislang kein Zusammenhang mit Albuminurie belegt werden konnte. Ein potentieller Einfluss der 15q22-15q25 Region könnte bei bisherigen Kopplungsanalysen aufgrund der Komplexität der Krankheit, ihrer Abhängigkeit von Gen-Gen-Interaktionen und Umwelteinflüssen sowie der großen Heterogenität menschlicher Studienpopulationen maskiert worden sein.

Da die vergleichende Analyse des Rattengenoms mit humanem Genom aufgrund der Größe des QTL auf RNO8 zu diesem Zeitpunkt noch wenig spezifisch ist, galt es, die hierfür verantwortliche Genomregion weiter einzugrenzen, um eine effektive und gezielte Gen-Suche zu ermöglichen. Zur Verkleinerung der Zielregion auf RNO8 wurden vier kongene Linien aus den Parentaltierstämmen etabliert und in der 8. Woche untersucht. Bei der Albuminausscheidung der kongenen Tiere ließen sich eindeutige Unterschiede erkennen. Zusammenfassend können die kongenen Linien aufgrund ihrer  $U_{\text{Alb}}$ -Werte zwei Gruppen zugeordnet werden. Die erste Gruppe, der die drei kongenen Linien mit den längsten SHR RNO8-Abschnitten angehören, zeichnete sich durch eine geringe Albuminausscheidung aus, die mit der des MWF-8<sup>SHR</sup>-Stammes vergleichbar war. Der zweiten Gruppe gehörte lediglich die Linie mit dem kürzesten SHR RNO8-Abschnitt an. Die  $U_{\text{Alb}}$ -Werte dieser Tiere waren vergleichbar stark erhöht, wie die des

MWF-Stammes. Der Umschlagpunkt von niedrigen zu hohen  $U_{\text{Alb}}$ -Werten befindet sich zwischen den Markern D8Rat35 und D8Rat19.

Es gelang, das QTL auf einen Bereich von 18,6 cM Länge zu verkleinern. Ausgehend von diesen Erkenntnissen kann die Etablierung weiterer kongener Linien mit noch kleineren Abschnitten des SHR RNO8 erfolgen. Ziel ist es, die Region, auf der sich der Krankheitsloкус befindet, auf eine Länge von 0,3-0,5 cM ( $1 \times 10^6$  Basenpaare) zu verkleinern. Das oder die krankheitsbeeinflussenden Gene sollen in nachfolgenden Schritten identifiziert und analysiert werden. Homologe Regionen beim Menschen können mittels Single-Nucleotid-Polymorphismen- und Haplotypenanalysen untersucht werden. Die Methode der Kopplungsanalysen und Züchtung kongener Rattenstämme konnte zur Identifizierung albuminurierelevanter Gene bei der Ratte bereits erfolgreich angewendet werden. Innerhalb eines QTL der FHH-Ratte (*RF-2*-Lokus) auf RNO1, der für 30-40% der Albuminausscheidung dieser Tiere ursächlich war, fand sich das mutierte Gen *Rab38*. Die Mutation führte bei den FHH-Tieren zu einem knockout dieses Gens. Die homologe Region des *RF-2*-Lokus beim Menschen befindet sich auf Chromosom 11 (Rangel-Filho et al., 2005). Interessanterweise konnte auch in humanen Studien bereits eine Assoziation dieser Region mit Nierenschäden und Fokal-Segmentaler-Glomerulosklerose nachgewiesen werden (Winn et al., 1999).

Die Relevanz der MWF-Ratte als aussagekräftiges Tiermodell für die Erforschung der genetischen und pathophysiologischen Grundlagen von Hypertonie und albuminurischen Nierenerkrankungen wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauert. Es konnte gezeigt werden, dass der QTL auf RNO8 einen großen Einfluss auf die Manifestation und Progression der Albuminurie bei männlichen und weiblichen MWF-Ratten ausübt. Erkennbar wurde außerdem, dass die Pathogenese und Progression der Albuminurie bei MWF-Tieren nicht ausschließlich auf die angeborene verminderte Gesamt-Nephronenzahl zurückzuführen ist.

Ein besseres Verständnis des Krankheitsbildes albuminurischer Nierenschädigungen sowie dessen Interaktion mit dem Herz-Kreislaufsystem ist aufgrund der hohen Prävalenz dieser Erkrankungen von großer klinischer Relevanz. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten durch nachfolgende Studien dazu beitragen eine frühzeitige Erkennung von Risikopatienten zu gewährleisten. Durch die Entwicklung von effektiveren und individuellen Therapiestrategien könnten die Heilungschancen Betroffener deutlich verbessert werden.

## 5. Zusammenfassung

Eine erhöhte Albuminausscheidung über den Urin ( $U_{Aib}$ ) stellt einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung von chronischen Nieren- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar. Es handelt sich hierbei um eine komplexe, polygenetisch und multifaktoriell beeinflusste Erkrankung, deren pathogenetische Ursachen bislang weitgehend unbekannt sind. Ein frühzeitiger Indikator für die spätere Entwicklung von arterieller Hypertonie, glomerulärer Hyperfiltration und nachfolgenden Nierenerkrankungen ist eine angeborene verminderte Nephronenanzahl.

Die Munich Wistar Frömter-Ratte (MWF) stellt ein ingezüchtetes Tiermodell dar, welches eine reduzierte Nephronenanzahl sowie eine spontane Hypertonie und frühzeitig einsetzende Albuminurie ( $U_{Aib}$ ) als ein erblich bedingtes Merkmal aufweist. In einer in der Arbeitsgruppe durchgeführten Kosegregations- und Kopplungsanalyse zwischen der MWF- und der Spontan Hypertensiven-Ratte (SHR) konnte ein signifikanter Quantitative Trait Locus (QTL) mit Kopplung zur Albuminurie auf Rattenchromosom (RNO) 8 nachgewiesen werden. Um den Einfluss dieses QTL auf Albuminurie, Nierenstruktur und Nephronenanzahl zu testen wurde der konsome Stamm MWF-8<sup>SHR</sup> etabliert. Hierfür wurde ausgehend von den Parentaltierstämmen MWF und SHR das SHR RNO8 in den isogenetischen MWF Hintergrund übertragen.

Männliche MWF-Tiere weisen bereits in der 8. Woche eine gegenüber SHR-Männchen 55fach erhöhte  $U_{Aib}$  auf. Im Gegensatz hierzu ergab die phänotypische Untersuchung des konsomen Stammes MWF-8<sup>SHR</sup> eine fast vollständige Eliminierung der frühzeitigen  $U_{Aib}$ . Im weiteren Verlauf bis zur 32. Woche zeigte sich ein ähnlicher Befund. MWF-Männchen entwickeln in diesem Zeitraum eine steigende  $U_{Aib}$  bis in den für Ratten nephrotischen Bereich ( $> 150 \text{ mg}/24\text{h}$ ). Die  $U_{Aib}$  der konsomen Männchen war dagegen verglichen mit MWF-Männchen zu jedem Zeitpunkt signifikant supprimiert. Die Untersuchung der Gesamt-Nephronenanzahl in der 4. Woche ergab beim konsomen Stamm eine gleichwertig verminderte Nephronenanzahl wie beim MWF-Stamm. Gegenüber SHR-Tieren war die Nephronenanzahl der konsomen Tiere um 36% reduziert ( $p < 0,0001$ ). Die zur Einschätzung der strukturellen Nierenveränderungen betrachteten Parameter Glomerulosklerose, tubulointerstitielle Schädigungen, renale interstitielle Fibrose sowie renale Kollagen III mRNA Expression waren in der 24. Woche sowohl bei MWF- wie auch bei konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Tieren signifikant höher

als bei SHR-Tieren. Bei Blutdruckmessungen in der 14. und 24. Woche lag der Blutdruck der konsumierten Tiere intermediär zwischen den Werten der Parentaltiere. Um zu prüfen ob der Einfluss des QTL auf die  $U_{Aib}$  geschlechtsabhängig ist, wurden konsumierte MWF-8<sup>SHR</sup>-Weibchen untersucht. Im Vergleich zu MWF-Weibchen wurden bei diesen zu allen untersuchten Zeitpunkten hochsignifikant geringere  $U_{Aib}$ -Werte nachgewiesen. Die Betrachtung von heterozygoten konsumierten F1-Tieren erlaubt Rückschlüsse auf einen Gen-Dosis Effekt des MWF RNO8. Es zeigte sich ein nicht vollständig rezessiver Einfluss auf die Albuminurie.

Um eine effektive Suche nach Albuminurie-Genen auf RNO8 durch Verkleinerung des QTL zu gewährleisten, wurde in der Arbeitsgruppe die Zucht kongener Linien aus den Parentaltierstämmen eingeleitet. Bei der Untersuchung vier bereits etablierter kongener Linien zeigte sich ein sprunghafter Anstieg um 11,5 mg/24h von niedrigen zu hohen  $U_{Aib}$ -Werten zwischen den beiden Stämmen MWF.SHR(*D8Rat71-D8Rat35*) und MWF.SHR(*D8Rat71-D8Rat19*). Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich die Zielregion, die ursprünglich 30 cM umfasste, auf einen 18,6 cM großen Bereich zwischen den Markern D8Rat35 und D8Rat19 eingrenzen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass auf RNO8 mindestens ein Gen liegen muss, welches die frühzeitige Manifestation und Progression der  $U_{Aib}$  bei MWF entscheidend beeinflusst. Anders als bei bisher untersuchten QTL konnte hier nachgewiesen werden, dass der Einfluss den das QTL auf RNO 8 auf die  $U_{Aib}$  hat, völlig unabhängig vom Nephronen-Defizit ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass kein kausaler Zusammenhang von strukturelle Nierenveränderungen oder Bluthochdruck mit der  $U_{Aib}$  besteht. Trotz eines sexuellen Dimorphismus bei MWF-Ratten, konnte die hohe Relevanz des QTL auf RNO 8 für die  $U_{Aib}$  für beide Geschlechter belegt werden. Die vorliegenden Untersuchungen des konsumierten Rattenstammes MWF-8<sup>SHR</sup> sowie kongener Linien ermöglichen die weitere Identifizierung genetischer Faktoren und molekularer Mechanismen die in der Pathogenese chronischer Nierenerkrankungen von entscheidender Bedeutung sind.

## 6. Verzeichnisse

### 6.1. Abbildungen

|                |   |          |
|----------------|---|----------|
| <b>Abb. 1</b>  | Mikroalbuminurie und Bluthochdruck stellen zwei individuelle Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen dar, deren Pathophysiologie eng verknüpft ist. | Seite 4  |
| <b>Abb. 2</b>  | Identifizierung krankheitsrelevanter Gene bei polygenetischen Erkrankungen.   | Seite 10 |
| <b>Abb. 3</b>  | Züchtung des konsomen Stammes MWF-8 <sup>SHR</sup> durch serielles Rückkreuzen über 6 Generationen.   | Seite 19 |
| <b>Abb. 4</b>  | Zuchtschema der F1-(MWFxMWF-8 <sup>SHR</sup> )-Generation.  | Seite 19 |
| <b>Abb. 5</b>  | Prinzip der QTL-Eingrenzung mittels kongener Stämme   | Seite 20 |
| <b>Abb. 6</b>  | Albuminexkretion im Urin männlicher SHR-, MWF-8 <sup>SHR</sup> -, MWF- und F1-(MWFxMWF-8 <sup>SHR</sup> )-Ratten in der 8. Woche.                           | Seite 31 |
| <b>Abb. 7</b>  | Verlauf der Albuminexkretion im Urin männlicher SHR-, MWF-8 <sup>SHR</sup> -, F1-(MWFxMWF-8 <sup>SHR</sup> )- und MWF-Ratten von der 14.-32. Woche.         | Seite 32 |
| <b>Abb. 8</b>  | Systolischer Blutdruck männlicher SHR-, MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 24. Woche.   | Seite 33 |
| <b>Abb. 9</b>  | Gesamt-Nephronenanzahl pro Niere bei männlichen SHR-, MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 4. Woche.  | Seite 36 |
| <b>Abb. 10</b> | Gesamtanzahl subkapsulärer Glomeruli pro Nierenschnitt bei männlichen SHR-, MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 24. Woche.                         | Seite 37 |
| <b>Abb. 11</b> | Relative Kollagen III Expression bei männlichen SHR-, MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 24. Woche.   | Seite 39 |
| <b>Abb. 12</b> | Renale interstitielle Fibrose bei männlichen SHR-, MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 24. Woche.  | Seite 39 |
| <b>Abb. 13</b> | Harnstoffkonzentration im Serum männlicher MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 32. Woche.  | Seite 40 |
| <b>Abb. 14</b> | Kreatininclearance pro 100g Körpergewicht männlicher MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 32. Woche.  | Seite 40 |

---

|                |   |          |
|----------------|---|----------|
| <b>Abb. 15</b> | Gesamt-Cholesterinkonzentration im Serum männlicher MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 32. Woche.   | Seite 41 |
| <b>Abb. 16</b> | Kreatininclearance pro 100g Körpergewicht männlicher MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 32. Woche.  | Seite 41 |
| <b>Abb. 17</b> | Verlauf der Albuminexkretion bei weiblichen SHR-, MWF-8 <sup>SHR</sup> -, F1-(MWFxMWF-8 <sup>SHR</sup> )- und MWF-Ratten von der 8. - 32. Woche.  | Seite 43 |
| <b>Abb. 18</b> | Albuminexkretion bei weiblichen und männlichen MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 32. Woche.  | Seite 48 |
| <b>Abb. 19</b> | Systolischer Blutdruck männlicher und weiblicher SHR-, MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 24. Woche.  | Seite 49 |
| <b>Abb. 20</b> | Renale interstitielle Fibrose bei weiblichen und männlichen MWF-8 <sup>SHR</sup> -Ratten in der 24. Woche.  | Seite 50 |
| <b>Abb. 21</b> | Glomeruloskleroseindex bei weiblichen und männlichen MWF-8 <sup>SHR</sup> -Ratten in der 24. Woche.   | Seite 50 |
| <b>Abb. 22</b> | Tubulointerstitieller Schädigungsindex bei weiblichen und männlichen MWF-8 <sup>SHR</sup> -Ratten in der 24. Woche.   | Seite 50 |
| <b>Abb. 23</b> | Anzahl subkapsulärer Glomeruli bei weiblichen und männlichen MWF-8 <sup>SHR</sup> -Ratten in der 24. Woche.   | Seite 50 |
| <b>Abb. 24</b> | Cytogenetische und genetische Karte von RNO8. Auf der rechten Seite ist die Allelverteilung auf RNO8 bei MWF- und MWF-8 <sup>SHR</sup> -Tieren sowie den 4 kongenen Linien dargestellt.   | Seite 51 |
| <b>Abb. 25</b> | a) Albuminausscheidung bei MWF-8 <sup>SHR</sup> -, kongenen, und MWF-Tieren in der 8. Woche. Die Reihung der Stämme in der Abbildung erfolgte nach Größe des übertragenen SHR RNO8-Abschnitts.<br><br>b) Prozentuale Verminderung der $U_{Alb}$ der kongener Linien und des konsomen Stammes MWF-8 <sup>SHR</sup> in Relation zur $U_{Alb}$ von MWF-Tieren in der 8. Woche. | Seite 52 |

## 6.2. Tabellen

|               |  |          |
|---------------|--|----------|
| <b>Tab. 1</b> | Phänotypische Charakterisierung von männlichen SHR-, MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 24. Woche.     | Seite 35 |
| <b>Tab. 2</b> | Auswertung der Nierenhistologie bei männlichen SHR-, MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 24. Woche.     | Seite 38 |
| <b>Tab. 3</b> | Phänotypische Charakterisierung von männlichen MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 32. Woche.           | Seite 41 |
| <b>Tab. 4</b> | Systolischer Blutdruck (SBP) von weiblichen SHR, MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 14. und 24. Woche. | Seite 44 |
| <b>Tab. 5</b> | Phänotypische Charakterisierung von weiblichen SHR-, MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 24. Woche.     | Seite 45 |
| <b>Tab. 6</b> | Phänotypische Charakterisierung von weiblichen MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 32. Woche.           | Seite 46 |
| <b>Tab. 7</b> | Auswertung der Nierenhistologie bei weiblichen SHR-, MWF-8 <sup>SHR</sup> - und MWF-Ratten in der 24. Woche.     | Seite 47 |

## 6.3. Abkürzungen

|               |                          |
|---------------|--------------------------|
| °             | Grad                     |
| %             | Prozent                  |
| A             | Ampere                   |
| Abb.          | Abbildung                |
| ANOVA         | Analysis of variance     |
| Aqua bidest.  | Aqua bidestillata        |
| BC-Generation | Backcrossgeneration      |
| C             | Celsius                  |
| ca.           | circa                    |
| CBF           | Campus Benjamin Franklin |
| cDNA          | komplementäre DNA        |
| cM            | centi Morgan             |
| Chr.          | Chromosom                |
| DEPC          | Diethylpyrocarbonat      |
| DNA           | Desoxyribonukleinsäure   |

---

|                |  |
|----------------|--|
| dNTPs          | Desoxyribonukleosidtriphosphate                  |
| E              | Expression                                       |
| EDTA           | Ethylendiamintetraessigsäure                     |
| ELISA          | Enzyme linked immunosorbent assay                |
| et al.         | et alia  |
| F              | forward  |
| F1-Generation  | 1. Filialgeneration                              |
| F2 Generation  | 2. Filialgeneration                              |
| FEM            | Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin |
| FET            | field-effect transistor                          |
| g              | Gramm  |
| GFR            | glomeruläre Filtrationsrate                      |
| GSI            | Glomeruloskleroseindex                           |
| h              | Stunde   |
| HE             | Hämatoxylin-Eosin                                |
| HDL            | High density lipoprotein                         |
| LOD            | logarithmic odds ratio                           |
| kg             | Kilogramm  |
| KG             | Körpergewicht                                    |
| l              | Liter  |
| M              | Molar  |
| m              | Meter  |
| m              | milli  |
| m <sup>2</sup> | Quadratmeter                                     |
| min            | Minute   |
| mmHg           | Millimeter Quecksilbersäule                      |
| mol            | Mol  |
| mRNA           | messenger RNA                                    |
| MWF            | Munich Wistar Frömter                            |
| μ              | mikro  |
| n              | Anzahl   |
| n.u.           | nicht untersucht                                 |
| p              | p-Wert   |
| PAS            | Periodic acid-Schiff                             |

---

|                  |   |
|------------------|---|
| PBGD             | Porphobilinogen-Desaminase-Gen                              |
| PBS              | phosphate buffered saline                                   |
| PCR              | Polymerase-Kettenreaktion                                   |
| pH               | pH-Wert   |
| QTL              | Quantitative Trait Locus/Loci                               |
| R                | reverse   |
| RIF              | renale interstitielle Fibrose                               |
| RNA              | Ribonukleinsäure  |
| RNO              | Chromosom der Ratte   |
| RSA              | Ratten-Serum-Albumin  |
| RT               | Raumtemperatur  |
| sec              | Sekunde   |
| SHR              | Spontan Hypertensive-Ratte                                  |
| Tab.             | Tabelle   |
| TAE              | Tris-Acetat-EDTA  |
| TMB              | Tetramethylbenzidin   |
| TSI              | Tubulointerstitielle Schädigung                             |
| U                | Unit(s)   |
| U <sub>Alb</sub> | Albuminausscheidung über den Urin                           |
| Upm              | Umdrehungen pro Minute                                      |
| USA              | Vereinigte Staaten von Amerika                              |
| V                | Volt  |
| vs.              | versus  |
| z.B.             | zum Beispiel  |
| Ztm              | Zentrales Tierlaboratorium Medizinische Hochschule Hannover |

## 7. Literatur

- Amann K, Wanner C, Ritz E. Cross-talk between the kidney and the cardiovascular system. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2112-9.
- Arar N, Nath S, Thameem F, et al. Genome-wide scans for microalbuminuria in Mexican Americans: the San Antonio Family Heart Study. *Genet Med* 2007;9:80-7.
- Arnlöv J, Evans JC, Meigs JB, et al. Low-grade albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2005;112:969-75.
- Atkins RC. The epidemiology of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2005;94:14-8.
- Bigazzi R, Bianchi S, Baldari D, Campese VM. Microalbuminuria predicts cardiovascular events and renal insufficiency in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 1998;16:1325–1333.
- Bramlage P, Pittrow D, Lehnert H, et al. Frequency of albuminuria in primary care: a cross-sectional study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;14:107-13.
- Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1988;1:335-47.
- Brown DM, Provoost AP, Daly MJ, Lander ES, Jacob HJ. Renal disease susceptibility and hypertension are under independent genetic control in the fawn-hooded rat. *Nature Genet* 1996;12:44–51.
- Cardiovascular diseases, Fact sheet N°317: Switzerland: World health organization (WHO), 2007. (Accessed May 28, 2008, at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>.)
- Comper WD, Hilliard LM, Nikolic-Paterson DJ, Russo LM. Disease-Dependent Mechanisms of Albuminuria. An Invited Review. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F1589-600.
- Cowley AW Jr, Roman RJ, Jacob HJ. Application of chromosomal substitution techniques in gene-function discovery. *J Physiol* 2004;554:46-55.
- Cowley AW Jr. The genetic dissection of essential hypertension. *Nat Rev Genet* 2006;7:829-40.
- De Zeeuw D, Parving HH, Henning RH. Microalbuminuria as an early marker for cardiovascular disease. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2100-5.
- Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A. Albuminuria reflects widespread vascular damage: the Steno hypothesis. *Diabetologia* 1989;32:219–226.

- Dinneen SF, Gerstein HC. The association of microalbuminuria and mortality in non-insulin-dependent diabetes mellitus: a systematic overview of the literature. *Arch Intern Med* 1997;157:1413–1418.
- Fassi A, Sangalli F, Maffi R, et al. Progressive glomerular injury in the MWF rat is predicted by inborn nephron deficit. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1399-1406.
- Fox CS, Yang Q, Guo CY, et al. Genome-wide linkage analysis to urinary microalbuminuria in a community-based sample: the Framingham Heart Study. *Kidney Int* 2005;67:70-4.
- Freedman BI, Beck SR, Rich SS, et al. A genome-wide scan for urinary albumin excretion in hypertensive families. *Hypertension* 2003;42:291-6.
- Freedman BI, Bowden DW, Rich SS, et al. Genome-wide linkage scans for renal function and albuminuria in Type 2 diabetes mellitus: the Diabetes Heart Study. *Diabet Med* 2008;25:268-76.
- Garrett MR, Dene H, Rapp JP. Time-course genetic analysis of albuminuria in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1175–1187.
- Garrett MR, Joe B, Yerga-Woolwine S. Genetic linkage of urinary albumin excretion in Dahl salt-sensitive rats: influence of dietary salt and confirmation using congenic strains. *Physiol Genomics* 2006;25:39-49.
- Geller DS, Zhang J, Wisgerhof MV, Shackleton C, Kashgarian M, Lifton RP. A novel form of human mendelian hypertension featuring nonglucocorticoid-remediable aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3117-23.
- Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, et al. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA* 2001;286:421–426.
- Gross ML, Amann K, Ritz E. Nephron number and renal risk in hypertension and diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2005;16 Suppl 1:27-9.
- Guidi E, Menghetti D, Milani S, Montagnino G, Palazzi P, Bianchi G. Hypertension may be transplanted with the kidney in humans: a long-term historical prospective follow-up of recipients grafted with kidneys coming from donors with or without hypertension in their families. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:1131-8.
- Hackbarth H, Gärtner K, Alt JM, Stolte H. A subline of the Munich Wistar (MW) strain: response to selection for surface glomeruli. *Rat News Let* 1980;7:23.
- Hackbarth H, Büttner D, Jarck D, Pothmann M, Messow C, Gärtner K. Distribution of glomeruli in the renal cortex of Munich Wistar Frömter (MWF) Rats. *Renal Physiol* 1983;6:63-71.

- Hackbarth H, Gwinner W, Alt JM, Hagemann I, Thiemann A, Finke B. The Munich Wistar Frömter Rat: Proteinuria and blood pressure in correlation to the number of superficial glomeruli. *Renal Physiol Biochem* 1991;14:246-252.
- Hall JE, Brands MW, Shek EW. Central role of the kidney and abnormal fluid volume control in hypertension. *J Hum Hypertens* 1996;10:633-9.
- Hillege HL, Fidler V, Diercks GF, et al. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation* 2002;106:1777-82.
- Hoy WE, Hughson MD, Singh GR, Douglas-Denton R, Bertram JF. Reduced nephron number and glomerulomegaly in Australian Aborigines: a group at high risk for renal disease and hypertension. *Kidney Int* 2006;70:104-10.
- Hull RP, Goldsmith DJ. Nephrotic syndrome in adults. *BMJ* 2008;336:1185-9.
- Ijpelaar DH, Schulz A, Koop K, et al. 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.
- Iyengar SK, Abboud HE, Goddard KA, et al. Genome-wide scans for diabetic nephropathy and albuminuria in multiethnic populations: the family investigation of nephropathy and diabetes (FIND). *Diabetes* 2007;56:1577-85.
- Jager A, Kostense PJ, Ruhe HG, et al. Microalbuminuria and peripheral arterial disease are independent predictors of cardiovascular and all-cause mortality, especially among hypertensive subjects: five-year follow-up of the Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:617-624.
- Jensen JS, Borch-Johnsen K, Jensen G, Feldt-Rasmussen B. Microalbuminuria reflects a generalized transvascular albumin leakiness in clinically healthy subjects. *Clin Sci* 1995;88:629-633.
- Kren V, Pravenec M, Lu S, et al. Genetic isolation of a region of chromosome 8 that exerts major effects on blood pressure and cardiac mass in the spontaneously hypertensive rat. *J Clin Invest* 1997;99:577-81.
- Kreutz R, Hübner N. Congenic rat strains are important tools for the genetic dissection of essential hypertension. *Semin Nephrol* 2002;22:135-47.
- Kreutz R, Bolbrinker J, Ganten D. Hypertonie. In: Gerok W, Huber Ch, Meinertz T, Zeidler H, eds. *Die Innere Medizin*. 11. Aufl., Stuttgart, New York: Schattauer, 2007:280-307
- Kreutz R, Kovacevic L, Schulz A, Rothermund L, Ketteler M, Paul M. Effect of high NaCl diet on spontaneous hypertension in a genetic rat model with reduced nephron number. *J Hypertens* 2000;18:777-782.

- Krolewski AS, Poznik GD, Placha G, et al. A genome-wide linkage scan for genes controlling variation in urinary albumin excretion in type II diabetes. *Kidney Int.* 2006;69:129-36.
- Kronenberg F. Dyslipidemia and nephrotic syndrome: recent advances. *J Ren Nutr.* 2005;15:195-203.
- Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet.* 1995;11:241-247.
- Leitlinien zur Behandlung und Diagnostik der Hypertonie, Germany: Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL<sup>®</sup> – Deutsche Hypertonie Gesellschaft, (Accessed September 9, 2008, at <http://www.paritaet.org/RR-Liga/Hypertonie-Leitlinien05.pdf>)
- Levey AS, Coresh J, Balk E, et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med.* 2003;139:137-47.
- Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell.* 2001;104:545-56.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995;4:357-62.
- Macconi D, Bonomelli M, Benigni A, et al. Pathophysiologic implications of reduced podocyte number in a rat model of progressive glomerular injury. *Am J Pathol.* 2006;168:42-54.
- Mann JF, Gerstein HC, Yi QL, et al. Development of renal disease in people at high cardiovascular risk: results of the HOPE randomized study. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:641-7.
- Murayama S, Yagyu S, Higo K, et al. A genetic locus susceptible to the overt proteinuria in BUF/Mna rat. *Mamm Genome.* 1998;9:886–888.
- Nadim MK, Dua R, Campese VM. Antihypertensive drugs and the kidney. *Curr Cardiol Rep.* 2004;6:403-8.
- Neugarten J. Gender and the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:2807-9.
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 1963;27:282-93.
- Parving HH, Lewis JB, Ravid M, Remuzzi G, Hunsicker LG; DEMAND investigators. Prevalence and risk factors for microalbuminuria in a referred cohort of type II diabetic patients: a global perspective. *Kidney Int.* 2006;69:2057-63.

- Pechère-Bertschi A, Burnier M. Female sex hormones, salt, and blood pressure regulation. *Am J Hypertens*. 2004;17:994-1001.
- Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res*. 1998;39:77-88.
- Poyan Mehr A, Siegel AK, Kossmehl P, et al. Early onset albuminuria in Dahl rats is a polygenetic trait that is independent from salt loading. *Physiol Genomics*. 2003;14:209-16.
- Pravenec M, Churchill PC, Churchill MC, et al. Identification of renal Cd36 as a determinant of blood pressure and risk for hypertension. *Nat Genet*. 2008;40:952-4.
- Prugger C., Heuschmann P. Keil U. Epidemiologie der Hypertonie in Deutschland und weltweit. *Herz* 2006;31:287-293.
- Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int*. 1984;26:137-143.
- Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*. 2001;37:1199-208.
- Reddy KS, Yusuf S. Emerging epidemic of cardiovascular disease in developing countries. *Circulation*. 1998;97:596-601.
- Rapp JP. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev*. 2000;80:135-175.
- Remuzzi A, Puntorieri S, Mazzoleni A, Remuzzi G. Sex related differences in glomerular ultrafiltration and proteinuria in Munich-Wistar rats. *Kidney Int*. 1988;34:481-486.
- Remuzzi A, Puntorieri S, Alfano M, et al. Pathophysiologic implications of proteinuria in a rat model of progressive glomerular injury. *Lab Invest*. 1992;67:572-579.
- Remuzzi G. A unifying hypothesis for renal scarring linking protein trafficking to the different mediators of injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15 Suppl 6:58-60.
- Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med*. 1998;12:1448-1456.
- Rettig R., Grisk O. The kidney as a determinant of genetic hypertension: evidence from renal transplantation studies. *Hypertension*. 2005;46:463-8.
- Skov K, Nyengaard JR, Korsgaard N, Mulvany MJ. Number and size of renal glomeruli in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1994;12:1373-6.
- Schork NJ, Krieger JE, Trolliet MR, et al. A biometrical genome search in rats reveals the multigenic basis of blood pressure variation. *Genome Res*. 1995;5:164-172.

- Schulz A. Genetische Charakterisierung der MWF-Ratte: Ein Rattenmodell zur Identifizierung genetischer Faktoren, die zu arterieller Hypertonie und Proteinurie führen. Dissertation, FU Berlin 2002.
- Schulz A, Litfin A, Kossmehl P, Kreuz R. Genetic dissection of increased urinary albumin excretion in the Munich Wistar Frömter rat. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:2706-2714.
- Schulz A, Standke D, Kovacevic L, et al. A major gene locus links early onset albuminuria with renal interstitial fibrosis in the MWF rat with polygenetic albuminuria. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:3081-3089.
- Schulz A, Weiss J, Schlesener M, et al. 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, et al. 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.* 2008;114:305-11.
- Schreuder MF, Nauta J. Prenatal programming of nephron number and blood pressure. *Kidney Int.* 2007;72:265-8.
- Siegel AK. Experimentelle Genetik der salzsensitiven Hypertrophie und hypertensiven Endorganschäden. Dissertation, FU Berlin 2004.
- Siegel AK, Kossmehl P, Planert M, et al. Genetic linkage of albuminuria and renal injury in Dahl salt-sensitive rats on a high-salt diet: comparison with spontaneously hypertensive rats. *Physiol Genomics.* 2004;18:218-25.
- Shiozawa M, Provoost AP, van Dokkum RPE, Majewski RR, Jacob HJ. Evidence of gene-gene interactions in the genetic susceptibility to renal impairment after unilateral nephrectomy. *J Am Soc Nephrol.* 2000;1:2068–2078.
- Silva GJ, Pereira AC, Krieger EM, Krieger JE. Genetic mapping of a new heart rate QTL on chromosome 8 of spontaneously hypertensive rats. *BMC Med Genet.* 2007;8:17.
- Stevens LA, Levey AS. Measurement of kidney function. *Med Clin North Am.* 2005;89:457-73.
- Stoll M, Kwitek-Black AE, Cowley AWJ, et al. New target regions for human hypertension via comparative genomics. *Genome Res.* 2000;10:473-482.
- Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med.* 2006;354:1387-401.
- Tsimihodimos V, Dounousi E, Siamopoulos KC. Dyslipidemia in Chronic Kidney Disease: An Approach to Pathogenesis and Treatment. *Am J Nephrol.* 2008;28:958-973.

- Vehaskari VM. Heritable forms of hypertension. *Pediatr Nephrol*. 2009;24:1929-37
- Verhave JC, Hillege HL, Burgerhof JG, Navis G, de Zeeuw D, de Jong PE. Cardiovascular risk factors are differently associated with urinary albumin excretion in men and women. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:1330-5.
- Wakeland E, Morel L, Achey K, Yui M, Longmate J. Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). *Immunol Today*. 1997;18:472-7.
- Weir MR. Dietary salt, blood pressure, and microalbuminuria. *J Clin Hypertens*. 2004;6 Suppl 3:23-6.
- Williams SS. Advances in genetic hypertension. *Curr Opin Pediatr*. 2007;19:192-8.
- Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, et al. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA*. 2003;289:2363-9.
- Wolf G, Ziyadeh FN. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol*. 2007;106:26-31.
- Yagil C, Sapojnikov M, Wechsler A, Korol A, Yagil Y. Genetic dissection of proteinuria in the Sabra rat. *Physiol Genomics*. 2006;25:121-33.
- Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension*. 2006;47:502-8.
- Zhai XY, Nielsen R, Birn H, et al. Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney. *Kidney Int*. 2000;58:1523-33.
- Zoja C, Benigni A, Remuzzi G. Protein overload activates proximal tubular cells to release vasoactive and inflammatory mediators. *Exp Nephrol*. 1999;7:420-8.

---

## Veröffentlichungen

### Publikationen

Schulz A, Weiss J, Schlesener M, Hänsch J, Wehland M, Wendt N, Kossmehl P, Sietmann A, Grimm D, Stoll M, Nyengaard JR, Kreutz R. Development of overt proteinuria in the Munich Wistar 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.* 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.

### Poster

Hänsch J., Schlesener M., Weiss J., Wendt N., Sietmann A., Stoll M., Kreutz R., Schulz A. Progression of overt proteinuria in adult MWF rats can be prevented by genetic substitution of chromosome 8 in a consomic strain  
30. *Wissenschaftlicher Kongress Hypertonie 2006 der Deutschen Hochdruckliga e.V.DHL / Deutsche Hypertonie Gesellschaft; München, 22.-24.11.2006.*

### Auszeichnungen

Young Investigator Award 2006 im Rahmen des 30. Wissenschaftlichen Kongresses Hypertonie 2006 der Deutschen Hochdruckliga e.V.DHL / Deutsche Hypertonie Gesellschaft in München vom 22.-24.11.2006.

## **Lebenslauf**

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

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die exzellente Betreuung während der Durchführung der Arbeit. Insbesondere möchte ich mich für die Unterstützung meines Forschungsaufenthaltes in den USA bedanken, der in jederlei Hinsicht eine unendlich wertvolle Erfahrung für mich war.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau Dr. Angela Schulz, die mir stets bei allen Fragen und Problemen als engagierte und konstruktive Ansprechpartnerin zur Seite stand. Das hervorragende Arbeitsklima mit vielen motivierenden und anregenden Gesprächen ist Grundstein dieser Arbeit.

Bei Frau Sabine Wunderlich, Frau Claudia Plum und Frau Heike Vogelsang bedanke ich mich für die freundliche und geduldige Einarbeitung in die Methodik sowie die stetige Unterstützung während der Datenerhebung. Herrn Peter Koßmehl und Herrn Norbert Hinz sei sehr herzlich für ihre Mitarbeit bei den histologischen Untersuchungen gedankt. Für die Zucht und Pflege der Tiere sowie die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich besonders bei Frau Bettina Bublath.

Mein ganz großer Dank gilt meinen Eltern für ihre fortwährende Motivation und Unterstützung bei allem was ich bislang erreicht habe. Durch alle ups and downs haben sie mich mit unendlicher Teilnahme und Zuspruch begleitet, ohne die diese Arbeit wohl nie entstanden wäre.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich, Jonna Hänsch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Untersuchung des konsomen Rattenstammes MWF-8<sup>SHR</sup> zur Analyse eines Albuminurie-QTL bei der 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.“

Berlin, 05.01.2010

Unterschrift