

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

DISSERTATION

Analyse und Feinkartierung eines wichtigen Albuminurie-QTLs  
auf Rattenchromosom 6 bei der MWF-Ratte

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maria Schlesener

aus Berlin

Gutachter/in:      1. Prof. Dr. med. R. Kreutz  
                             2. Prof. Dr. med. H. Peters  
                             3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. J. Erdmann

Datum der Promotion: 14.02.2014

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>- 3 -</b>
1.1	Arterielle Hypertonie und terminale Niereninsuffizienz – Zwei gesundheitspolitisch bedeutsame Erkrankungen	- 3 -
1.2	Mikroalbuminurie – Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen	- 5 -
1.3	Chronische Nephropathie – eine polygenetisch determinierte Erkrankung	- 7 -
1.4	Inzuchtrattenmodelle sind ein wichtiges Hilfsmittel für die Untersuchung polygenetischer und multifaktorieller Erkrankungen	- 9 -
1.5	Strategien für die Identifizierung von Genen multifaktorieller, polygenetisch determinierter Erkrankungen	- 10 -
1.6	Die MWF-Ratte – ein Tiermodell zur Evaluation genetischer Grundlagen der arteriellen Hypertonie und Proteinurie	- 14 -
1.7	Ziel der Arbeit	- 16 -
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>- 18 -</b>
2.1	Material	- 18 -
2.1.1	Substanzen und Radionukleotide	- 18 -
2.1.2	Enzyme	- 19 -
2.1.3	Lösungen	- 19 -
2.1.4	Tierhaltung, Futtermittel	- 20 -
2.1.5	Sonstige Materialien	- 20 -
2.1.6	Geräte	- 21 -
2.2	Methoden	- 22 -
2.2.1	Tierhaltung und Zucht	- 22 -
2.2.1.1	Tierhaltung	- 22 -
2.2.1.2	Parentaltierstämme MWF und SHR	- 22 -
2.2.1.3	Die konsomen Stämme MWF-6 <sup>SHR</sup> und SHR-6 <sup>MWF</sup>	- 22 -
2.2.1.4	Prinzip der markergestützten Zucht konsomer Rattenstämme am Beispiel der Zucht des konsomen SHR-6 <sup>MWF</sup> -Stamms	- 23 -
2.2.1.5	Kosegregations- und Kopplungsanalyse zwischen dem Parentaltierstamm MWF und dem konsomen Stamm MWF-6 <sup>SHR</sup>	- 25 -
2.2.1.6	Prinzip der Eingrenzung einer QTL-Region über die geno- und phänotypische Charakterisierung teilkongener Stämme	- 26 -
2.2.2	Versuchsprotokolle	- 28 -
2.2.2.1	Phänotypische Charakterisierung des konsomen Stamms SHR-6 <sup>MWF</sup>	- 28 -
2.2.2.2	Phänotypische Charakterisierung der (MWF x MWF-6 <sup>SHR</sup> )-F2-Population	- 28 -
2.2.2.3	Phänotypische Untersuchung der teilkongenen Stämme	- 28 -
2.2.3	Phänotypische Untersuchungen	- 29 -
2.2.3.1	Blutdruckmessung	- 29 -
2.2.3.2	Urinuntersuchungen	- 29 -
2.2.3.2.1	Uringewinnung	- 29 -
2.2.3.2.2	Bestimmung der Albuminurie	- 29 -
2.2.4	Genotypisierung	- 30 -
2.2.4.1	Prinzip der Genomanalyse mittels Mikrosatellitenmarker	- 30 -
2.2.4.2	Herkunft der Mikrosatellitenmarker	- 31 -
2.2.4.3	DNA-Isolierung aus Schwanzspitzenbiopsien	- 31 -
2.2.4.4	DNA-Stockplatten	- 32 -
2.2.4.5	Primerkinasierung: Radioaktive Markierung der Primer am 5'-Ende	- 32 -
2.2.4.6	Polymerasekettenreaktion	- 33 -
2.2.4.7	Auftrennung der PCR-Produkte mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese	- 33 -
2.2.5	Statistische Analysen	- 34 -
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>- 36 -</b>
3.1	SHR-6 <sup>MWF</sup> -Studie	- 36 -

3.1.1	Genotypische Charakterisierung des konsomen Stamms SHR-6 <sup>MWF</sup> .....	- 36 -
3.1.2	Vergleichende phänotypische Charakterisierung konsomer SHR-6 <sup>MWF</sup> -Männchen und -Weibchen .....	- 37 -
3.1.2.1	Albuminurie der konsomen SHR-6 <sup>MWF</sup> -Männchen.....	- 37 -
3.1.2.2	Systolischer Blutdruck konsomer SHR-6 <sup>MWF</sup> -Männchen.....	- 39 -
3.1.2.3	Albuminurie der konsomen SHR-6 <sup>MWF</sup> -Weibchen .....	- 40 -
3.1.2.4	Systolischer Blutdruck konsomer SHR-6 <sup>MWF</sup> -Weibchen.....	- 42 -
3.1.2.5	Phänotypischer Vergleich zwischen weiblichen und männlichen SHR-6 <sup>MWF</sup> - Tieren .....	- 44 -
3.2	Kosegregations- und Kopplungsanalyse mit den Parentaltierstämmen MWF und SHR.....	- 45 -
3.2.1	(MWF x MWF-6 <sup>SHR</sup> )-F2-Population.....	- 45 -
3.2.1.1	Phänotypische Charakterisierung der (MWF x MWF-6 <sup>SHR</sup> )-F2-Population.....	- 46 -
3.2.1.2	Genotypische Charakterisierung der (MWF x MWF-6 <sup>SHR</sup> )-F2-Population.....	- 46 -
3.2.1.3	QTL-Kartierung auf Rattenchromosom 6 und Kopplungsanalyse der (MWF x MWF-6 <sup>SHR</sup> )-F2-Population .....	- 47 -
3.2.2	Vergleich zwischen den Kopplungsanalysen der (MWF x SHR)-Backcross- und der (MWF x MWF-6 <sup>SHR</sup> )-F2-Population.....	- 47 -
3.2.3	Albuminurie der (MWF x MWF-6 <sup>SHR</sup> )-F2 in Abhängigkeit vom Genotyp am Peakmarker .....	- 50 -
3.3	Einengung der QTL-Region auf Rattenchromosom 6 mittels teilkongener Stämme .....	- 52 -
3.3.1	Genotypische Charakterisierung teilkongener Stämme .....	- 52 -
3.3.2	Phänotypische Charakterisierung der teilkongenen Stämme .....	- 53 -
4	Diskussion.....	- 56 -
5	Zusammenfassung .....	- 80 -
6	Literaturverzeichnis.....	- 82 -
7	Danksagung.....	- 89 -
8	Anhang.....	- 90 -
8.1	Tabellarischer Lebenslauf.....	- 91 -
8.2	Publikationen.....	- 90 -
8.3	Eidesstattliche Erklärung .....	- 95 -

# 1 Einleitung

## 1.1 Arterielle Hypertonie und terminale Niereninsuffizienz – Zwei gesundheitspolitisch bedeutsame Erkrankungen

Die arterielle Hypertonie stellt einen der wichtigsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen dar, die laut der Weltgesundheitsorganisation mit 16% die häufigste Todesursache in Industrienationen darstellen (Kraja et al., 2011). Zwischen 1999 und 2008 stieg die Prävalenz der arteriellen Hypertonie in den USA auf 29% an und ist aufgrund verschiedener Risikofaktoren wie Übergewicht, Alter, Salzzufuhr, Stress, Rauchen und Alkohol weiter zunehmend (Egan et al., 2010; Kraja et al., 2011). Nach den WHO-Richtlinien ist ein arterieller Bluthochdruck durch mehrmalige Messungen systolischer Werte  $\geq 140$  mmHg und diastolischer Werte  $\geq 90$  mmHg definiert (Cheriyian et al., 2010). Lediglich 5% aller Hypertonien, die auf eine bekannte Ursache wie beispielsweise eine Nierenarterienstenose, neurogene oder endokrine Störungen zurückzuführen sind, werden als sekundäre Hypertonie klassifiziert. Für die restlichen 95% der Blutdrucksteigerungen, der sogenannten primären oder essentiellen Hypertonie, sind die Ursachen der Erkrankung bislang unbekannt. Die arterielle Hypertonie ist eine multifaktorielle Erkrankung, die aus der Kombination aus verschiedenen Genen, Umweltfaktoren und krankheitsbeeinflussendem Verhalten bestimmt wird (Rapp, 2000; Lifton et al., 2001; Delles et al., 2010). So spielen ein höheres Lebensalter, Ernährungsfaktoren wie Salzaufnahme oder Alkoholkonsum, Stress, Rauchen und endokrine Faktoren eine begünstigende Rolle in der Krankheitsausprägung (Stanton et al., 1982; Bacon et al., 2004; Blumenthal et al., 2010; Cheriyian et al., 2010). Die gesundheitspolitische Bedeutung der arteriellen Hypertonie ist vor allem in ihrer Rolle als Hauptrisikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Endorganschäden zu sehen (He and Whelton, 1999; Kannel, 2000; Cheriyian et al., 2010). Nach einem asymptomatischen Beginn der Erkrankung prädisponieren strukturelle Veränderungen an Herz und Gefäßen im Laufe der Jahre zu kardiovaskulären Komplikationen, die vor allem die Organsysteme Herz, Niere, Zentralnervensystem, Auge und peripheres Gefäßsystem betreffen. Mit steigendem systolischen Blutdruck konnte eine deutliche Zunahme der Morbidität und Mortalität vor

allem durch Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, Apoplex und terminale Niereninsuffizienz gezeigt werden (He and Whelton, 1999; Kannel, 2000; Cheriyan *et al.*, 2010).

Hypertensive Nierenschäden sind nach dem Diabetes mellitus die zweithäufigste Ursache, die eine terminale Niereninsuffizienz bedingt (Frei *et al.*, 2008). Als erstes Anzeichen einer hypertensiven Nephropathie gilt der Nachweis einer Mikroalbuminurie, die im Laufe der Erkrankung mit einer beginnenden Nephrosklerose einhergeht. Das klinische Endstadium der hypertensiven Nephropathie ist durch eine terminale Niereninsuffizienz mit arterio-arteriolosklerotischen Schrumpfnieren gekennzeichnet. Im Vordergrund stehen urämische Symptome wie zum Beispiel Übelkeit, Erbrechen, Pruritus, urämische Polyneuropathie und Enzephalopathie. Die dauerhafte Anreicherung harnpflichtiger Substanzen bedingt im menschlichen Organismus ein Intoxikationssyndrom, das ohne eine Nierenersatztherapie letal in einem Coma uraemicum endet. Als Nierenersatzverfahren stehen hauptsächlich die Hämodialyse, Peritonealdialyse und die Nierentransplantation zur Verfügung. Nach den Angaben des Jahresberichts 2006/2007 der QuaSi-Niere gGmbH befanden sich in Deutschland im Jahr 2006 insgesamt 91.718 Patienten in der Behandlung einer chronischen Nierenersatztherapie, von denen 66.508 Patienten mit einem Dialyseverfahren versorgt und 25.210 Patienten nach Nierentransplantation in der Nachsorge betreut wurden (Frei *et al.*, 2008). Insgesamt waren im Jahr 2006 17.548 neue Patienten auf eine Nierenersatztherapie angewiesen, wobei die Diagnosen Diabetes mellitus mit 34% und Nephropathien vaskulärer Genese mit 24% am häufigsten den Beginn eines Dialyseverfahrens verursachten. Die Bedeutung der terminalen Niereninsuffizienz liegt zum einen in der massiven Einschränkung der Lebensqualität betroffener Patienten und zum anderen in den durch kostenintensive Behandlungsstrategien hervorgerufenen immensen Belastungen für das Gesundheitssystem. Vor diesem Hintergrund rücken Bemühungen zur Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Prävention einer terminalen Niereninsuffizienz immer mehr in den Vordergrund. Bei einem Teil der Krankheitsfälle mit einer infektiösen, obstruktiven oder autoimmunologischen Genese ist eine kausale Therapie möglich, doch sind Risikofaktoren, wie beispielsweise eine genetische Prädisposition therapeutisch bislang nicht beeinflussbar. Die Zielsetzung der derzeitigen pharmakologischen Therapie besteht vor allem in der positiven Beeinflussung von Initiations- und Progressionsfaktoren einer chronischen Nephropathie. Von entscheidender Bedeutung sind neben einer optimalen Blutzuckereinstellung im Rahmen eines Diabetes mellitus, insbesondere die medikamentöse Senkung einer

bestehenden Proteinurie und arteriellen Hypertonie. Trotz verbesserter Therapieregime und dem Einsatz effektiverer Medikamentenklassen zur Beeinflussung dieser Faktoren, ist eine steigende Inzidenzrate terminal-niereninsuffizienter Patienten nicht aufzuhalten (Frei *et al.*, 2008). Vor diesem Hintergrund kommt der Identifizierung kausaler Faktoren und hier insbesondere der Charakterisierung genetischer Grundlagen, die zu einer chronischen Nephropathie, einem Diabetes mellitus oder einer arteriellen Hypertonie führen, eine immer bedeutendere Rolle zu.

## **1.2 Mikroalbuminurie – Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen**

Als erstes Anzeichen einer Nierenschädigung im Rahmen einer hypertensiven oder diabetischen Nephropathie gilt der Nachweis einer Mikroalbuminurie, die als eine Albuminausscheidung von 30-300 mg im 24-Stundenurin definiert ist (Hillege *et al.*, 2002; de Zeeuw *et al.*, 2006; Singh and Satchell, 2011). Unter physiologischen Bedingungen werden täglich zwischen 180 und 200 l Primärharn im kapillären Netzwerk der Glomeruli gebildet. Wasser, Elektrolyte, niedermolekulare Substanzen wie Glukose und geringe Mengen niedermolekularer Proteine können die glomeruläre Filtrationsbarriere problemlos passieren, während höhermolekulare Proteine wie das Albumin zum einen auf Grund der Größe und zum anderen wegen der elektrischen Ladung kaum filtriert werden können (Tryggvason *et al.*, 2006). Diese Eigenschaften werden bedingt durch die einzigartige Dreischichtung der glomerulären Filtrationsbarriere bestehend aus dem glomerulären Endothel mit seiner Glykokalix, der Basalmembran und den Podozyten (Satchell and Tooke, 2008). Unter physiologischen Bedingungen die glomeruläre Filtrationsbarriere passierende Albuminmoleküle werden überwiegend im proximalen Tubulus reabsorbiert und metabolisiert, so dass im Endurin kein bzw. sehr wenig Albumin nachweisbar ist. Eine Beeinträchtigung der glomerulären Filtrationsbarriere und Überschreitung der Reabsorptionskapazität des Tubulussystems führen demnach zu einer vermehrten Albuminausscheidung im Urin.

Mikroalbuminurie ist vor allem bei Patienten mit arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus prävalent (Satchell and Tooke, 2008; Singh and Satchell, 2011). Interessanterweise konnte jedoch in mehreren groß angelegten epidemiologischen Studien gezeigt werden, dass auch Individuen ohne bestehende arterielle Hypertonie oder Diabetes mellitus eine Mikroalbuminurie aufweisen und dadurch einem höheren

kardiovaskulären Risiko unterliegen (Hillege *et al.*, 2002; de Zeeuw *et al.*, 2006; Menne *et al.*, 2010; Singh and Satchell, 2011). In der PREVEND-Studie, bei der rund 40.000 Einwohner der Stadt Groenigen in Bezug auf Nierenfunktion und Mikroalbuminurie untersucht wurden, konnte innerhalb der Allgemeinbevölkerung eine Mikroalbuminurie mit einer Prävalenz von 7% nachgewiesen werden und nach Ausschluss von Individuen mit bestehendem Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie war eine Mikroalbuminurie weiterhin bei 6,6% der Individuen prävalent (Hillege *et al.*, 2002). Die Signifikanz der Mikroalbuminurie besteht in ihrem Stellenwert als eigenständiger Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, der unabhängig von etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren wie der arteriellen Hypertonie oder dem Diabetes mellitus agiert (Arnlov *et al.*, 2005; de Zeeuw *et al.*, 2006; Singh and Satchell, 2011). Mikroalbuminurie ist zudem ein sensitiver Marker für das Neuentstehen weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren wie Diabetes mellitus oder arterielle Hypertonie. Brantsma *et al.* konnten zeigen, dass Individuen mit nachweislicher Mikroalbuminurie ein vierfach höheres Risiko für die Entstehung eines Diabetes mellitus und ein zweifach höheres Risiko für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie aufwiesen als Individuen mit einer normalen Albuminausscheidung (Brantsma *et al.*, 2005; Brantsma *et al.*, 2006). Als pathophysiologische Zusammenhänge einer erhöhten Albuminausscheidung und dem Entstehen kardiovaskulärer Erkrankungen werden eine allgemeine Schädigung des systemischen Gefäßsystems im Zusammenhang mit einer endothelialen Dysfunktion diskutiert (Stehouwer and Smulders, 2006; Satchell and Tooke, 2008; Singh and Satchell, 2011). Die Niere entspräche demnach einem Fenster für das gesamte Gefäßsystem, wonach eine erhöhte Albuminpermeabilität der Nierengefäße einer Schädigung des systemischen Gefäßsystems in Zusammenhang mit einem erhöhten kardiovaskulärem Risiko bedeutet (de Zeeuw *et al.*, 2006; Weir, 2007). Bislang ungeklärt sind jedoch die Kausalitäten einer Gefäßschädigung bzw. endothelialen Dysfunktion. In tierexperimentellen Arbeiten zeigten Untersuchungen junger gesunder Ratten eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität der endothelialen Funktion mit einer Assoziation für das Entstehen renaler Schäden im Alter (Gschwend *et al.*, 2002; de Zeeuw *et al.*, 2006; Ochodnický *et al.*, 2006). Diese Studien lassen eine genetische Komponente vermuten, mit der bereits bei Geburt die Gefäßfunktion und mit ihr eine Albuminexkretion innerhalb physiologischer Grenzen festgelegt ist und konsekutiv für die Ausbildung kardiovaskulärer Erkrankungen prädispositioniert (de Zeeuw *et al.*,

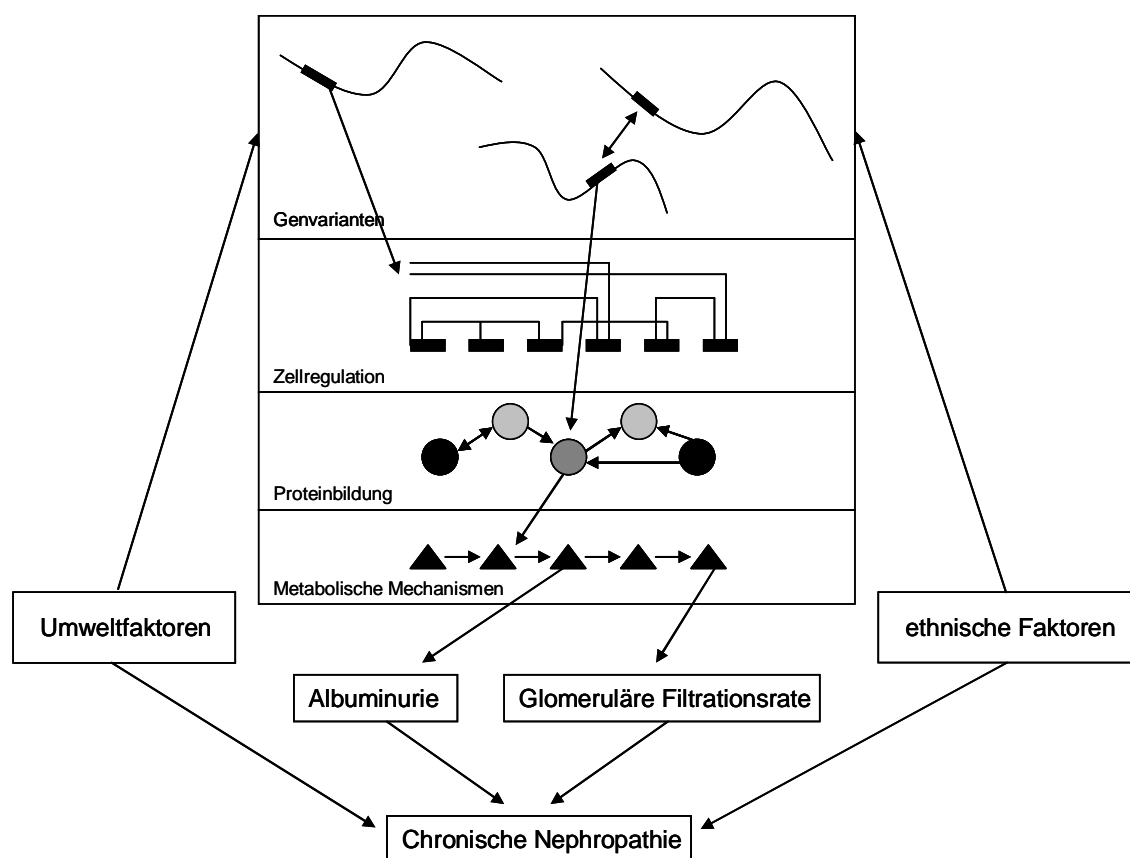


2006; Weir, 2007). Eine in Zukunft besondere Herausforderung wird es sein, genetische und molekulare Mechanismen der Albuminurie zu identifizieren, um über die Entwicklung neuer Therapien das Fortschreiten assoziierter kardiovaskulärer Erkrankungen wie z. B. endotheliale Dysfunktion zu verlangsamen oder zu verhindern.

### **1.3 Chronische Nephropathie – eine polygenetisch determinierte Erkrankung**

Die chronische Nephropathie gehört wie die essentielle Hypertonie zu den multifaktoriell, polygenetisch determinierten Erkrankungen. Sie werden nicht wie monogenetische Erkrankungen durch die Mutation eines einzelnen Gens verursacht, sondern durch ein Zusammenspiel aus verschiedenen Genen, demographischen, ethnischen und Umweltfaktoren bestimmt (Keller *et al.*, 2012). Im Rahmen der chronischen Nephropathien konnten bislang die Ursachen mehrerer monogenetisch determinierter Nierenerkrankungen nachgewiesen werden. Hierzu gehören unter anderen die autosomal dominant und rezessiv vererbten zystischen Nierenerkrankungen oder das kongenital nephrotische Syndrom vom finnischen Typ, bei dem verschiedene Mutationen im NPHS1 Gen ursächlich für eine pathologische Strukturveränderung der Podozyten innerhalb des Glomerulus sind (Kuhlmann *et al.*, 2003). Gene, die zur Auslösung und dem Fortschreiten einer multifaktoriellen und polygenetischen Erkrankung führen, sind in der Regel schwierig zu detektieren, da sie typischerweise individuell nur kleine Effekte an der Phänotypausprägung beitragen (Keller *et al.*, 2012). Seltene Genvarianten, die zumeist einen großen physiologischen Effekt an der Krankheitsausprägung aufweisen, sind dabei aufgrund ihres geringen Vorkommens innerhalb großer zu untersuchender Patientenpopulationen nur erschwert auffindbar. Komplizierend kommt hinzu, dass auch häufig vorkommende Genvarianten innerhalb einer betroffenen Patientenpopulation schwer detektierbar sind, da sie oft nur einen schwachen Effekt an der Krankheitsausprägung beitragen, jedoch kumulativ mit einem großen physiologischen Effekt am Phänotyp beteiligt sind (Keller *et al.*, 2012). Die individuellen Geneffekte werden über unterschiedliche Mechanismen derselben Zell- oder Gewebsphysiologie vermittelt, wodurch die gemeinsame Krankheitsausprägung bestimmt wird. Der Austausch eines Nukleotids in einer kodierenden Genregion beispielsweise kann im Rahmen der Translation zu einer veränderten Aminosäure führen und über ein funktionsgestörtes Protein die

Pathogenese des zu untersuchenden Merkmals verursachen. Pathologische Veränderungen auf Ebene der DNA können dabei auch innerhalb Promotor-, Enhancer- oder Repressorregionen vorkommen und über eine gestörte Zellregulation zu einer Beeinträchtigung der metabolischen Mechanismen führen, die den Krankheitsphänotyp bedingen. Das Zusammenspiel verschiedener Genvarianten auf unterschiedlichen Ebenen der Zell- bzw. Gewebsphysiologie bestimmt schließlich das Ausmaß der Krankheitsausprägung einer chronischen Nephropathie. Über verschiedene quantitative Merkmale wie beispielsweise Mikroalbuminurie oder die glomeruläre Filtrationsrate ist die Ausprägung der chronischen Nephropathie messbar (Abb. 1).



**Abb. 1: Chronische Nephropathie – eine multifaktorielle, polygenetisch determinierte Erkrankung**

Die Krankheitsausprägung der chronischen Nephropathie wird durch ethnische und Umweltfaktoren sowie durch verschiedene Gene beeinflusst. Die unterschiedlichen Genvarianten beeinflussen sich dabei gegenseitig oder nehmen direkten bzw. indirekten Einfluss auf die Zellregulation und die Proteinbildung, wodurch metabolische Mechanismen beeinträchtigt werden, die über messbare quantitative Merkmale die Pathogenese der chronischen Nephropathie beschreiben (Keller *et al.*, 2012).

Desweiteren spielen auch ethnische Faktoren in der Entstehung chronischer Nephropathien eine Rolle. In diesem Zusammenhang konnte eine von der ethnischen Herkunft abhängige Akkumulation für das Entstehen einer terminalen Niereninsuffizienz

beobachtet werden. Im Vergleich zur weißen Bevölkerung wurde für Amerikaner afrikanischer Herkunft ein 4fach höheres Risiko für die Entstehung einer terminalen Niereninsuffizienz nachgewiesen (Freedman *et al.*, 2005).

#### **1.4 Inzuchtrattenmodelle sind ein wichtiges Hilfsmittel für die Untersuchung polygenetischer und multifaktorieller Erkrankungen**

Die Untersuchung polygenetischer und multifaktorieller Erkrankungen am Menschen erweist sich in erster Linie auf Grund des heterogenen Genoms als schwierig (Cowley, Jr., 2006). Die genetische Heterogenität kann durch ihre statistisch limitierte Aussagekraft die Detektion von Genvarianten insbesondere mit schwachem Effekt auf den Phänotyp erschweren oder sogar verhindern. Zur Umgehung dieser Problematik wurden für die Erforschung polygenetisch determinierter Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen verschiedene ingezüchtete Rattenmodelle etabliert (Rapp, 2000; Cowley, Jr. *et al.*, 2004a; Delles *et al.*, 2010). Ratten mit Ausprägung eines hypertensiven Phänotyps werden über mehrere Generationen Bruder-Schwester-verpaart, wobei jeweils die Tiere mit der stärksten phänotypischen Ausprägung für die weitere Zucht ausgewählt werden (Saavedra, 2009). Sobald der Phänotyp in allen Nachkommen fixiert ist, wird durch weitere Bruder-Schwester-Verpaarungen über 20 Generationen eine genetische Homozygotie von ca. 99% gleichgeschlechtlicher Tiere erreicht und der Inzuchtstamm erfolgreich etabliert (Ganten *et al.* 1994). Auf diese Weise wurden in der Vergangenheit verschiedene experimentell hypertensive Rattenmodelle selektiv gezüchtet, die neben einer arteriellen Hypertonie zum Teil weitere genetisch determinierte Merkmalsausprägungen aufwiesen (Rapp, 2000; Delles *et al.*, 2010). Beispielsweise stellt die salzsensitive Dahl-Ratte ein hypertensives Rattenmodell dar, das unter gesteigerter Salzzufuhr mit einer Erhöhung des Blutdrucks reagiert und frühzeitig eine Proteinurie als Zeichen einer Nephropathie ausbildet (Poyan *et al.*, 2003; Siegel *et al.*, 2004; Garrett *et al.*, 2006), während die SHRSP-Ratte vor dem Hintergrund einer arteriellen Hypertonie ein außergewöhnlich hohes Schlaganfallrisiko aufweist (Rapp, 2000; Slemmer *et al.*, 2012). Die Ratte als favorisiertes Tiermodell der Hypertonie- und Nierenforschung ermöglicht außerdem einfache und standardisierte Haltungsbedingungen, wodurch sich im Vergleich zu humanen klinischen Studien merkmalsbeeinflussende Umweltfaktoren besser

regulieren und kontrollieren lassen (Kreutz and Hubner, 2002). Im Rahmen pharmakologischer und physiologischer Studien in vivo können Tiermodelle auf diese Weise gut untersucht und physiologische bzw. therapiespezifische Einflüsse sorgfältig herausgearbeitet werden. Der Ratte kommt zudem eine bedeutende Rolle für die Realisierung von gezielten Kreuzungsexperimenten zu, um chromosomale Regionen und konsekutiv Kandidatengene mit Einfluss auf quantitative Merkmale im Rattengenom zu identifizieren, die in weiteren Untersuchungen Aufschlüsse über die Pathogenese multifaktorieller Erkrankungen beim Menschen ergeben können. Umgekehrt können durch genomweite Assoziationsstudien im humanen Genom identifizierte Kandidatengene im Tiermodell überprüft werden (Delles *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2012). Auf diese Weise liefern Tiermodelle neue Einblicke in wichtige Regulationsmechanismen multifaktorieller Erkrankungen auf genetischer und physiologischer Ebene im Tiermodell und weiterführend beim Menschen.

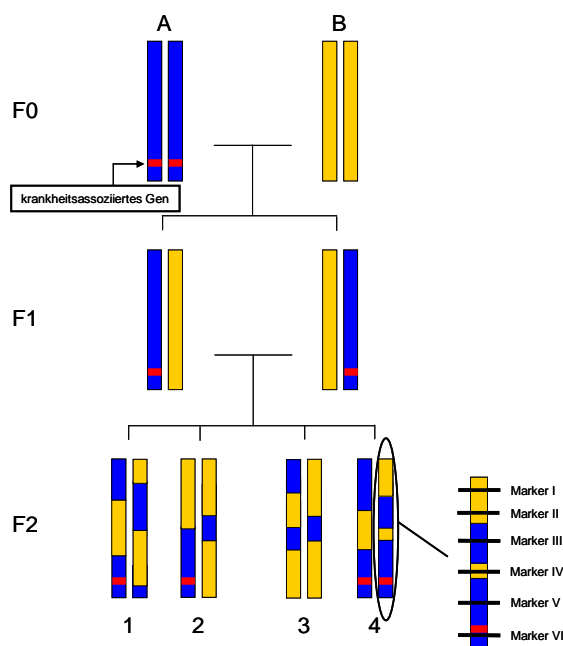
## **1.5 Strategien für die Identifizierung von Genen multifaktorieller, polygenetisch determinierter Erkrankungen**

Die Vergangenheit hat gezeigt, dass die Charakterisierung genetischer Grundlagen multifaktorieller Erkrankungen, wie der essentiellen Hypertonie oder der chronischen Nephropathie insbesondere durch ihre polygenetische Determination mit vielfältiger Beeinflussung von Umwelt- und demographischen Faktoren eine schwierige Herausforderung ist. Vor diesem Hintergrund wurden verschiedene Strategien für die Identifizierung krankheitsregulierender Gene entwickelt.

Eine effektive Methode, die die Identifizierung bislang unbekannter Gene im Rahmen multifaktorieller Erkrankungen ermöglicht, stellt die genomweite Kosegregations- und Kopplungsanalyse dar. Die Zielsetzung dieser Strategie besteht in der Detektion chromosomaler Regionen, die mit Wahrscheinlichkeit ein oder mehrere Gene mit Einfluss auf den zu untersuchenden Phänotyp beinhalten. Diese Genloci mit Einfluss auf ein quantitatives Merkmal wie der essentiellen Hypertonie oder Albuminurie, werden als Quantitative Trait Loci (QTL) bezeichnet (Rapp, 2000).

Durch dieses Verfahren konnten im humanen Genom bislang mehrere hundert QTL mit einer Assoziation zu Hypertonie-verwandten Phänotypen und Albuminurie identifiziert werden (Satko *et al.*, 2005; Cowley, Jr., 2006; Kottgen *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2012). Ein entscheidender Schwachpunkt der QTL-Kartierungen im humanen Genom stellt

jedoch die genetische Heterogenität unter Beeinflussung verschiedener ethnischer, demographischer und Umweltfaktoren dar. Auf Grund der durch diese Problematik bedingten reduzierten statistischen Aussagekraft sind der Erfolg und die Reproduzierbarkeit von Kopplungsanalysen innerhalb verschiedener Bevölkerungsgruppen limitiert und die Identifizierung von Genregionen mit schwachem Einfluss auf den Phänotyp erschwert (Cowley, Jr. *et al.*, 2004a). Erfolgsversprechender ist die Durchführung von Kosegregations- und Kopplungsanalysen von genetisch homogenen Inzuchtstämmen unter standardisierten Haltungsbedingungen. Ausgangspunkt ist die Verpaarung zweier sich im zu untersuchenden Phänotyp kontrastierender Inzuchtstämme, deren Nachkommen der F1-Generation auf Grund der Gesetzmäßigkeiten der Mendelschen Gesetze phäno- und genotypisch nahezu identisch sind (Abb.2).



**Abb. 2: Prinzip genomweiter Kosegregations- und Kopplungsanalysen am Beispiel der geno- und phänotypischen Untersuchung einer F2-Population**

A und B repräsentieren zwei Inzuchtstämme, die sich in Bezug auf den zu untersuchenden Phänotyp unterscheiden. A beinhaltet auf einem Chromosomenpaar das krankheitsassoziierte Gen in homozygoter Form. Während der von den Inzuchtstämmen ausgehenden Zucht einer F2-Population kommt es durch Rekombinationsereignisse während der meiotischen Reifeteilungen zur Neuverteilung der Allele. F2-Individuen mit Vorliegen beider krankheitsassoziierten Gene im Genom bleiben mit dem Krankheitsphänotyp assoziiert (4). Bei einem kodominanten oder dominanten Vererbungsmodus bleiben die F2-Tiere 1 und 2 mit dem Phänotyp assoziiert, während das F2-Individuum 3 ohne das krankheitsregulierende Gen im Genom keine Assoziation zum Phänotyp aufweist. Bei der Genomanalyse mit Hilfe polymorpher Mikrosatellitenmarker (Marker I-VI) zeigt der Marker, der sehr dicht am krankheitsassoziierten Gen lokalisiert ist, die stärkste Assoziation zum Phänotyp (Marker VI).

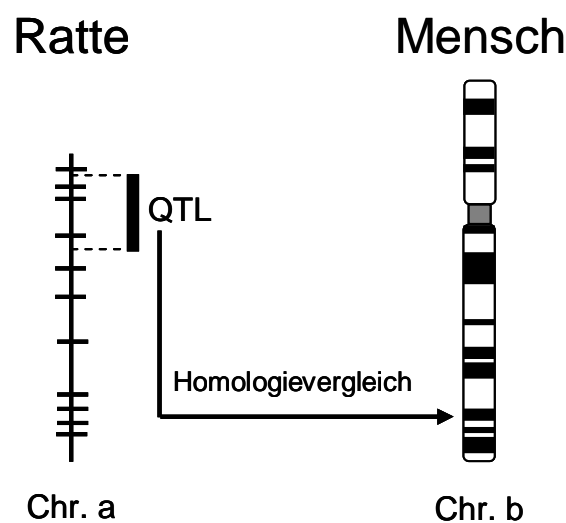
Durch die Generierung einer F2-Population oder alternativ einer Backcross-Population entstehen infolge genetischer Rekombination und Segregation der Allele während der Meiose Nachkommen, die phänotypisch die vollständige Variabilität des zu untersuchenden quantitativen Merkmals repräsentieren. Im Rahmen der meiotischen Reifeteilung tauschen väterliche und mütterliche Chromosomen durch Crossing-Over-Ereignisse homologe Chromosomensegmente aus, wobei voneinander weit entfernte Genloci unabhängig voneinander vererbt werden. Diese Gesetzmäßigkeiten kommen zur Anwendung bei der genomweiten Analyse von Assoziationen zwischen dem untersuchten Phänotyp und chromosomaler Regionen. Als probate Hilfsmittel werden polymorphe Mikrosatellitenmarker eingesetzt. Sehr nahe am Krankheitsgen lokalisierte genetische Marker bleiben durch gekoppelte Vererbung bzw. Kosegregation mit dem pathologischen Phänotyp verbunden, wohingegen vom Krankheitsgen entfernt gelegene Marker unabhängig vererbt werden und damit keine Assoziation zum Phänotyp aufweisen (Abb. 2).

Die statistische Auswertung der Kopplungsanalyse ermittelt, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Kopplung zwischen Genort (genetischer Marker) und untersuchtem Phänotyp im Verhältnis zur Nicht-Kopplung vorliegt. Ausgedrückt wird diese Wahrscheinlichkeit über den LOD-Score (logarithm of the odds) (Rapp, 2000). Die Sicherheit der statistischen Resultate wird gewährleistet durch eine dichte und gleichmäßige Verteilung genetischer Marker über das gesamte Genom sowie durch die geno- und phänotypische Untersuchung einer großen Studienpopulation, das heißt der Untersuchung möglichst vieler Meiosen und damit Rekombinationsmöglichkeiten.

Die funktionelle Relevanz der auf diese Weise identifizierten QTL kann im Anschluss durch die Zucht konsomer und teilkongener Stämme, bei denen das QTL-tragende Chromosom bzw. Chromosomsegment von einem in den anderen Inzuchtrattenstamm überführt wird, verifiziert werden (Kreutz and Hubner, 2002; Saavedra, 2009; Delles *et al.*, 2010). Über die Zucht und phänotypische Charakterisierung teilkongener Linien kann zudem die QTL-Region im Idealfall auf eine Größe kleiner 1 cM eingegrenzt werden, um eine effiziente Suche nach kausalen Krankheitsgenen zu gewährleisten. Einerseits können über die Sequenzierung von Genen oder über differentielle Genexpressionsanalysen krankheitsrelevante Gene identifiziert werden. Andererseits kann die Untersuchung bereits aus der Literatur bekannter Kandidatengene innerhalb dieser Region erste Aufschlüsse liefern (Lee and Cicila, 2002; Delles *et al.*, 2010). Die Auswahl des zu untersuchenden Kandidatengens stützt sich auf die Annahme, dass ein

oder mehrere kodierende Produkte des Kandidatengens funktionell an der phänotypischen Ausprägung der untersuchten Erkrankung beteiligt sind (Delles *et al.*, 2010).

Die Relevanz für den Menschen der im Rattenmodell identifizierten QTL-Regionen zeigt sich im Rahmen vergleichender Genomanalysen, bei denen die QTL des Rattengenoms, orthologen Chromosomenregionen im humanen Genom zugeordnet werden (Stoll *et al.*, 2000) (Abb.3). In humanen Assoziationsstudien können dann relevante Kandidatengenpolymorphismen demaskiert und anschließend in klinischen Studien näher charakterisiert werden.



**Abb. 3: Identifizierung krankheitsrelevanter Gene im Rattenmodell mit Übertragung auf den Menschen**

Durch genomweite Kosegregations- und Kopplungsanalysen können im Rattenmodell chromosomale Regionen mit Einfluss auf den Krankheitsphänotyp identifiziert und über den Homologievergleich dem humanen Genom zugeordnet werden.

In den letzten Jahren gewannen genomweite Assoziationsstudien im humanen Genom an Bedeutung. Durch den Fortschritt im Rahmen der Genotypisierungstechnologie mit der Einführung von chipbasierenden Genomanalysen ist die Genotypisierung einer großen Anzahl genetischer Marker innerhalb großer Studienpopulationen möglich. Ziel ist der statistische Nachweis einer Assoziation zwischen einer DNA-Variante und dem zu untersuchenden Phänotyp (Delles *et al.*, 2010). Eine Herausforderung bleibt jedoch die Verknüpfung zwischen der nachgewiesenen DNA-Variante und der zu untersuchenden Phänotypausprägung auf genetischer, zellulärer und gewebsspezifischer Ebene. Erst ein besseres Verständnis und die Aufdeckung der

pathophysiologischen Mechanismen polygenetischer Erkrankungen ermöglicht die Entwicklung neuer Therapiestrategien.

## **1.6 Die MWF-Ratte – ein Tiermodell zur Evaluation genetischer Grundlagen der arteriellen Hypertonie und Proteinurie**

Initial wurde die Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte ausgehend von Munich Wistar-Ratten selektiv für das spezielle Vorhandensein subkapsulärer Glomeruli gezüchtet, die in Mikropunktionsstudien durch ihre Lage im normalerweise glomerulusfreien Cortex cortici direkt zugänglich waren (Hackbarth et al., 1983).

Die phänotypische Charakterisierung des MWF-Inzuchtrattenmodells zeigte zudem, dass die MWF-Ratte als weitere phänotypische Besonderheiten eine spontan arterielle Hypertonie und eine bereits frühzeitig einsetzende Proteinurie mit überwiegendem Anteil der Albuminfraktion entwickelt (Hackbarth *et al.*, 1991; Kreutz *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2002). Korrespondierend fanden sich in histologischen Untersuchungen altersabhängige glomerulosklerotische und fibrotische Nierenveränderungen (Remuzzi *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2007) sowie eine Erhöhung renaler Retentionsparameter im Blut als Nachweis einer progressiven Minderung der Nierenfunktion (Schulz *et al.*, 2007). Weitere morphologisch interessante Merkmale der MWF-Ratte stellen die 30-50%ige Reduktion der Nephronanzahl im Vergleich zu den nierengesunden Lewis-, Wistar- und SHR-Ratten sowie der ausgeprägte sexuelle Dimorphismus dar, der bei den MWF-Weibchen trotz gleicher Nephronreduktion mit einem milderem arteriellen Hypertonus und einer geringeren Albuminurie als bei den MWF-Männchen einhergeht (Hackbarth *et al.*, 1991; Remuzzi *et al.*, 1992; Fassi *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 2008a; Schulz *et al.*, 2008b). Dieses auch als „gender effect“ bezeichnete Phänomen, ist auch beim Menschen nachweisbar und zeichnet sich im Rahmen von Nierenerkrankungen durch das bislang ungeklärte schnellere Fortschreiten einer chronischen Nephropathie bei männlichen im Vergleich zu weiblichen Patienten aus (Neugarten et al., 2000; Silbiger and Neugarten, 2008).

Auf der Suche nach genetischen Ursachen, die im MWF-Inzuchtrattenmodell für die spontane Albuminurie verantwortlich und konsekutiv an der Ausbildung einer progressiven Glomerulosklerose beteiligt sind, wurde die MWF-Ratte mit dem kontrastierenden SHR-Inzuchtrattenstamm in einer genomweiten Kosegregations- und Kopplungsanalyse untersucht. Als phänotypische Ausprägung weist die SHR-Ratte eine



spontan arterielle Hypertonie, aber im Gegensatz zur MWF-Ratte eine physiologische Albuminurie und eine histologisch gesunde Nierenstruktur auf (Schulz *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2007). Sie bietet sich auf Grund dessen als kontrastierender Rattenstamm zur Untersuchung der Albuminurie vor dem Hintergrund einer in beiden Rattenstämmen ausgebildeten arteriellen Hypertonie an. In einer experimentellen Backcross-Studie zwischen dem MWF- und SHR- Rattenstamm konnten acht QTL mit wahrscheinlicher und signifikanter Kopplung zum Phänotyp der Albuminurie identifiziert werden (Schulz *et al.*, 2003). Dem Albuminurie-QTL auf Rattenchromosom 6 (RNO6) kam dabei eine besondere Bedeutung zu. Neben seiner ausgeprägten Beteiligung an der Gesamtvarianz der Albuminurie innerhalb der Backcross-Population, konnte für den QTL bereits bei jungen Tieren im Alter von 8 Wochen eine signifikante Kopplung zur Albuminurie nachgewiesen werden, die mit steigendem Alter bis zur 24. Woche zunahm. Ein kolokalisierter Albuminurie-QTL auf RNO6 der MWF-Ratte, der ebenfalls im Zusammenhang mit einer frühzeitigen Manifestation der Albuminurie (early age of onset effect) stand, konnte bereits in einem früheren Backcross-Experiment zwischen dem MWF- und normotensiven und nierengesunden Lewis-Rattenstamm detektiert werden, dessen statistische und phänotypische Ausprägung jedoch geringer war (Schulz *et al.*, 2002). Zusätzliche Bedeutung gewann der Albuminurie-QTL auf RNO6 durch die im selben Chromosomenbereich lokalisierten QTL für Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt sowie für renale interstitielle Fibrose innerhalb der (SHR x MWF)-Backcross-Population (Schulz *et al.*, 2003).

Zur weiteren Untersuchung der funktionellen Relevanz der identifizierten QTL auf RNO6, wurde ein konsomer MWF-6<sup>SHR</sup>-Rattenstamm generiert, bei dem das gesamte RNO6 des SHR-Stamms in den isogenetischen Hintergrund des MWF-Stamms überführt wurde (Schulz *et al.*, 2007). Durch den Austausch der Chromosomen zwischen den Stämmen konnte die phänotypische Charakterisierung des konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamms zeigen, dass im Vergleich zum MWF-Stamm die frühzeitige Ausbildung der Albuminurie und deren Fortschreiten in den Bereich nephrotischer Werte signifikant supprimiert werden konnte. Des Weiteren wiesen konsome MWF-6<sup>SHR</sup>-Tiere eine höhere Glomeruluszahl pro Niere und eine verminderte Anzahl kapselkontaktierender Glomeruli als MWF-Tiere auf und die histologischen Nierenveränderungen im Sinne einer Glomerulosklerose, Tubulosklerose und renalen interstitiellen Fibrose waren bei den konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Tieren im Gegensatz zum MWF-Stamm ebenfalls signifikant reduziert (Schulz *et al.*, 2007). Über die

Charakterisierung des konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamms konnte die funktionelle Relevanz des Albuminurie-QTLs auf RNO6 der MWF-Ratte eindrucksvoll verifiziert werden und lässt vermuten, dass ein oder mehrere kausale Gene für die Ausbildung der Albuminurie auf RNO6 der MWF-Ratte lokalisiert sind. Inwieweit diese Gene in einem Zusammenhang mit der phänotypischen Ausbildung einer reduzierten Glomerulusanzahl, kapselkontaktierender Glomeruli und der Entstehung einer interstitiellen Nierenfibrose bei der MWF-Ratte stehen, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

## 1.7 Ziel der Arbeit

Die arterielle Hypertonie und Mikroalbuminurie als Zeichen einer Nephropathie sind wichtige Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, die in der industrialisierten Welt die Haupttodesursache darstellen. Trotz etablierter antihypertensiver und antiproteinurischer Therapieansätze, sind die kausalen Faktoren, die zur Entstehung einer essentiellen Hypertonie und Mikroalbuminurie führen, weitestgehend unbekannt. Ein vielversprechender Forschungsansatz stellt die Identifizierung neuer Pathomechanismen über die Detektion krankheitsrelevanter Gene in genetisch vereinfachten Tiermodellen dar, um gewonnene Erkenntnisse in Zukunft auf den Menschen zu übertragen und neue Therapiestrategien im Kampf gegen Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen zu entwickeln.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand in der näheren Charakterisierung des bedeutsamen Albuminurie-QTLs auf RNO6 der MWF-Ratte. Nachdem im konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm die funktionelle Relevanz des Albuminurie-QTLs bestätigt werden konnte (Schulz *et al.*, 2007), sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Albuminurie-QTL im genetischen Hintergrund des kontrastierenden SHR-Stamms evaluiert werden. In einem ersten Schritt erfolgte die genotypische Charakterisierung des konsomen Stamms SHR-6<sup>MWF</sup>, bei dem im Vergleich zum konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm in reziproker Weise das RNO6 und mit diesem der Albuminurie-QTL vom MWF-Stamm in das Genom des SHR-Stamms überführt wurde. Die phänotypische Charakterisierung des konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamms wurde unter Berücksichtigung des sexuellen Dimorphismus getrennt nach dem Geschlecht und zur Erfassung altersabhängiger Faktoren zu mehreren Messzeitpunkten durchgeführt. Im Anschluss wurden die phänotypischen Befunde der Albuminurie und des arteriellen Blutdrucks mit den zuvor

in der Arbeitsgruppe (Schulz *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 2008a; Schulz *et al.*, 2008b) erhobenen Ergebnissen der Parentaltierstämme SHR und MWF sowie des konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamms vergleichend analysiert.

Zur weiteren Analyse des Albuminurie-QTLs wurde in einem zweiten Schritt eine zusätzliche Kosegregations- und Kopplungsanalyse auf RNO6 durchgeführt. Ausgehend vom konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm wurde nach Kreuzung mit dem MWF-Stamm eine (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F<sub>2</sub>-Population gezüchtet, die bis auf das rekombinierte RNO6 für das restliche Genom eine Homozygotie für MWF aufwies. Im Gegensatz zur initial durchgeführten Kosegregations- und Kopplungsanalyse (Schulz *et al.*, 2003) der (MWF x SHR)-Backcross-Population sollte auf diese Weise der Albuminurie-QTL auf RNO6 innerhalb einer F<sub>2</sub>-Population mit einem für MWF einheitlicheren Hintergrundgenom evaluiert werden. Vor diesem Hintergrund einer größeren statistischen Aussagekraft war es die Aufgabe, im Vergleich zur (MWF x SHR)-Backcross-Population potentielle Unterschiede in Bezug auf die QTL-Kartierung und Ausprägung herauszuarbeiten. Um auch genetische Faktoren mit einem altersabhängigen Effekt auf die Albuminurie zu erfassen (age of onset), erfolgte die Phänotypisierung der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F<sub>2</sub>-Tiere zu drei verschiedenen Messzeitpunkten.

Zeitgleich wurde mit der Charakterisierung teilkongener Stämme begonnen, bei denen ausgehend vom konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm zunehmend kleinere Chromosomensegmente des RNO6 von SHR in das MWF-Genom übertragen wurden. Über die geno- und phänotypische Analyse der teilkongenen Stämme ist die Zielsetzung, die QTL-Region für Albuminurie auf RNO6 in ihrer Größe einzugrenzen, um eine effiziente Suche und Charakterisierung von Kandidatengenen zu ermöglichen. Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Dissertation soll in folgenden Arbeiten die Etablierung subkongener Stämme zur weiteren Eingrenzung der QTL-Region auf eine Größe von zirka 0,5 - 1 cM erfolgen. Über die Sequenzierung von Genen beispielsweise und über differentielle Genexpressionsstudien sollen Kandidatengene innerhalb der QTL-Region detektiert werden, die kausal an der Ausprägung der Albuminurie im MWF-Rattenmodell verantwortlich sind. Identifizierte Kandidatengene können anschließend über den Homologievergleich dem humanen Genom zugeordnet werden und bieten so die Grundlage für gezielte humangenetische Studien.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Substanzen und Radionukleotide

Substanz	Firma
[gamma- <sup>32</sup> P]dATP(10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, wässrige Lösung)	Amersham
10 x PCR-Puffer	Promega
10 x TBE (Tris-Borat-EDTA-Lösung)	Gibco BRL
Aceton	Baker
Acrylease	Stratagene
Albumin, Rat; Polyclonal Antibody, Anti-Rat	ICN
Bromphenolblau, Natriumsalz	Merck
dNTP's (2,5 mM)	Promega
Diethylmalonsäure (98%)	Aldrich
Di-Natrium-EDTA-Dihydrat (Titrierkomplex III, MG 372,24)	Roth
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Roth
Ethanol (100%)	J.T. Baker
Formamid	Merck
Gelatine (75 bloom)	Sigma
Harnstoff	Roth
Isopropanol	Sigma
Magnesiumchlorid (50 mM)	Rapidozym
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Aldrich
Primer	Tib Molbiol, Genset
Rattenserum-Albumin (RSA)	Sigma
Rotiphorese (40% Acrylamid, 2% Bisacrylamid)	Roth

Schwefelsäure (96%)	Merck
SDS (Lauryl-Sulfate)	Sigma
Temed (N,N,N',N'- Tetramethylenethyldiamin)	Sigma
3,3',5,5' Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid (TMB) Tabletten	Sigma
Trizma Base (MG 121,1)	Sigma
Tween 20	BioRad, Sigma, Roth
Wasserstoffperoxid (30%)	Sigma
Xylen Cyanol FF	Sigma

### 2.1.2 Enzyme

	Enzym	Aktivität	Firma
Kinasen	T4-Polynukleotidkinase	5 U/μl	Promega
Polymerasen	Taq-Polymerase	5 U/μl	Promega
Endoproteasen	Proteinase K	34 U/mg	Sigma

### 2.1.3 Lösungen

Lösung	Bestandteil	Konzentration
Coating-Solution	Rattenserum-Albumin Natriumhydrogencarbonat	0,2 mg/ml 0,1 M
Formamid-Laufpuffer	Bromphenolblau Xylen Cyanol FF Formamid Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	1% 1% 10% 0,5 M
10 x Laufpuffer	Glycerin Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat Bromphenolblau Xylen Cyanol FF	50% 10,0 mM, pH7 0,25% 0,25%
Lysispuffer	Trizma Base Di-Natrium-EDTA-Dihydrat Natriumchlorid SDS	50 mM, pH8 100 mM, pH8 100 mM 1%
Polyacrylamidgel-Lösung	Harnstoff 100 x TBE Rotiphorese (40% Acrylamid) Aqua bidest.	31,5 g 7 ml 10,5 ml 27,0 ml

Puffer A	Diethylmalonsäure Natriumchlorid Di-Natrium-EDTA-Dihydrat Tween 20 Gelantine Aqua bidest.	20 mM 150 mM 0,1 mM, pH8 0,1% 5 g ad 1 l, pH7,4
Rattenserum-Albumin-Stock-Lösung	Rattenserum-Albumin Natriumhydrogencarbonat	1 mg/ml 0,1 M
Substrat	3,3',5,5' TMB Aqua bidest. Puffer A Wasserstoffperoxid 300	2 Tabletten 10 ml 10 ml 4 µl

#### 2.1.4 Tierhaltung, Futtermittel

Material	Firma
Haltungsfutter für Ratten und Mäuse (Normalfutter)	Altromin
Lochzange für Labortiere	Esculap
Makrolonkäfige Typ IV	Ebeco
Makrolonkäfige Typ III	Ebeco
Restrainer	Werkstatt Charité CBF
Stoffwechsellkäfige für Ratten bis 300 g	Ehret

#### 2.1.5 Sonstige Materialien

Material	Firma
96-well Optical Reaction Plates	Applied Biosystems
Bio-Max MR-1-Röntgenfilme (35 x 43)	Kodak
Edelstahlklemmen	Peq Lab
Gel-Blotting-Papier GB 002	Schleicher & Schuell
Glasplatten für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Haifischzahnkamm Mikrotiterformat, für Polyamidacrylgele	Peq Lab
Mehrkanalspritze (8-Kanal, 0-10 µl)	Hamilton
Multipipette plus	Eppendorf
Paketklebeband	Tesa

PCR Tubes 0,2 ml	Biozym
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Röntgenkassetten Typ G, 35 x 43 cm	Peq Lab
Schweißfolie	GENETIX
Spacer für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Standardpipetten	Eppendorf
Standardtips 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Szintillationsgefäße aus Kunststoff	Packard
Thermo-Fast 96-Mikrotiterplatten (ohne Rand)	AB-Gene
Tube 50 ml	Sarstedt
Verpackungsfolie	Saran

### 2.1.6 Geräte

Gerät	Firma
Analysen-Waage BP 610	Sartorius
Automat für die Filmentwicklung X-OMAT 5000 RA	Kodak
Blutdruckmessgerät	TSE
Brutschrank	Roth
ELISA-MRX-Plate-Readers	Dynex
Folienschweißgerät	MDC
Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech
Magnetrührer mit Heizfunktion MR 2002	Heidolph
Mikrotiterplattenschüttler	Roth
PCR-Cycler	MJ-Research
pH-Meter	Knick
Photometer UV-1202	Schimadzu
Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer	Peq Lab
Power Supply für die Elektrophoresekammer	Biometra
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Vortexer VF 2	Janke&Kunkell KA Labortechnik

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierhaltung und Zucht

#### 2.2.1.1 Tierhaltung

Die Haltung und Zucht der für diese Arbeit verwendeten Rattenstämme erfolgte in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité – Universitätsmedizin Berlin in Absprache mit dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité, Campus Benjamin Franklin (CBF). Unter standardisierten und tierschutzgerechten Bedingungen wurden bis zu vier Ratten getrennt nach Geschlecht in Makrolonkäfigen Typ IV untergebracht, wobei die Ratten freien Zugang zu Wasser und Futter erhielten. In den Haltungsräumen wurden eine Temperatur von 22 °C mittels einer Klimaanlage sowie ein Tag-Nacht rhythmus von 12 Stunden mit Hilfe eines automatischen Lichtschaltsystems eingehalten. Zu Paarungszwecken wurde jeweils ein Männchen mit bis zu vier Weibchen in Makrolonkäfigen Typ III gehalten. Die Jungtiere wurden im Alter von vier Wochen von den Muttertieren abgesetzt und mittels einer Lochzange mit einer systematisch fortlaufenden Nummer ohrmarkiert.

#### 2.2.1.2 Parentaltierstämme MWF und SHR

Die ingezüchteten Rattenstämme MWF<sub>Rkb</sub> und SHR<sub>Rkb</sub> stammen aus der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Die ursprüngliche Kolonie MWF/Ztm stammt aus dem zentralen Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule in Hannover und wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Reinhold Kreutz im Jahr 1996 am Universitätsklinikum (UKBF) der Freien Universität (FU) Berlin als MWF<sub>Fub</sub> etabliert und später in MWF<sub>Rkb</sub> umbenannt. Der SHR-Stamm wurde aus der Zucht von M&B, Bomholtvej in Dänemark 1997 bezogen und als eigene Kolonie SHR<sub>Rkb</sub> in der Arbeitsgruppe etabliert.

#### 2.2.1.3 Die konsomen Stämme MWF-6<sup>SHR</sup> und SHR-6<sup>MWF</sup>

Im Jahre 2005 wurde der konsome Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> in der Arbeitsgruppe von Prof. Kreutz etabliert (Schulz *et al.*, 2007). Mittels eines Marker-gestützten Selektionsprotokolls wurde RNO6 des SHR-Rattenstamms in den isogenetischen Hintergrund des MWF-Rattenstamms übertragen. Ein Jahr später wurde durch dieselbe Arbeitsgruppe der konsome Stamm SHR-6<sup>MWF</sup> (Schulz *et al.*, 2010) etabliert. Hierbei



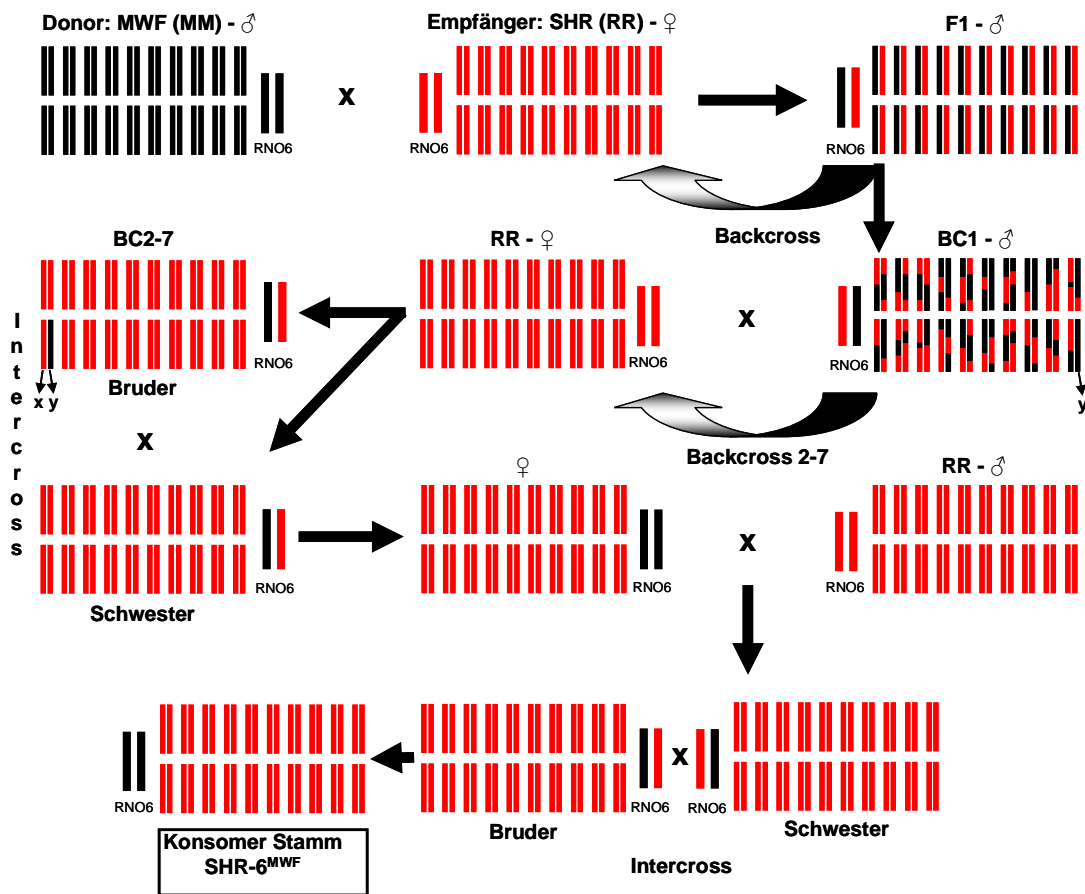
wurde in reziproker Weise verglichen mit dem MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm MWF-RNO6 in den isogenetischen Hintergrund des SHR-Stamms transferiert. Die Zucht des SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamms erfolgte analog durch ein Marker-gestütztes Selektionsprotokoll (Schulz *et al.*, 2010).

#### **2.2.1.4 Prinzip der markergestützten Zucht konsomer Rattenstämme am Beispiel der Zucht des konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamms**

Ziel der konsomen Rattenzucht ist es, die funktionelle Relevanz eines QTLs einer Chromosomenregion, die in einer vorangegangenen Kosegregations- und Kopplungsanalyse identifiziert wurde, zu verifizieren und weiter zu analysieren. Hierbei wird zur Etablierung eines konsomen Rattenstamms das QTL-tragende Chromosom eines als Donor fungierenden Inzuchtstamms in einen als Empfänger fungierenden Inzuchtstamm übertragen. Auf diese Weise kann gezeigt werden, ob die Übertragung des QTL-tragenden Chromosoms eines Inzuchtstamms in den isogenetischen Hintergrund eines anderen Inzuchtstamms einen Einfluss im Sinne einer Abschwächung bzw. Verstärkung auf den zu untersuchenden Phänotyp ausübt. Prinzipiell gibt es für die Generierung konsomer Rattenstämme zwei Möglichkeiten: Einerseits kann der eine Inzuchtstamm mit stärkerer Merkmalsausprägung als Donor und entsprechend der andere Inzuchtstamm als Empfänger genutzt werden oder umgekehrt. Der Hauptunterschied beider Strategien liegt im genetischen Hintergrund, der die Merkmalsausprägung des QTLs durch Geninteraktionen unterschiedlich stark beeinflussen kann. Die Etablierung konsomer Stämme in beide Richtungen erlaubt eine genauere Untersuchung des merkmalsstragenden QTLs, da hierbei sein Einfluss auf das Merkmal in beiden Hintergrundgenomen analysiert werden kann (Kreutz and Hubner, 2002).

Das Zuchtprotokoll zur Generierung eines konsomen Stamms sieht nach Bildung einer F1-Generation aus Donor- und Empfängerstamm eine Backcross-Kaskade vor, bei der Nachkommen mit Tieren des Empfängerstamms über mehrere Generationen zurückgekreuzt werden. Am Beispiel der Züchtung des konsomen Stamms SHR-6<sup>MWF</sup> wurden entsprechend der vorangegangenen Kosegregations- und Kopplungsanalyse (Schulz *et al.*, 2003) die Parentaltierstämme MWF und SHR ausgewählt. Bei dem Transfer des von MWF stammenden RNO6 in den isogenetischen Hintergrund des

SHR-Stamms, fungierte der SHR-Stamm als Empfänger- und der MWF-Stamm als Donorstamm.



**Abb. 4: Zucht des konsomen Stamms SHR-6<sup>MWF</sup> ausgehend von den Parentaltierstämmen MWF und SHR**

M (schwarz), MWF-Allel; R (rot), SHR-Allel; F, Filialgeneration; BC, Backcross-Generation; RNO6, Rattenchromosom 6

Ein MWF-Männchen (Donorstamm) und SHR-Weibchen (Empfängerstamm) werden zur Generierung einer F1-Generation gekreuzt. Über mehrere Backcrosse mit SHR-Weibchen wird durch Marker-gestützte Selektion der Tiere das RNO6 von MWF in den isogenetischen Hintergrund von SHR übertragen. Durch Bruder-Schwesterverpaarung wird nachfolgend das heterozygote RNO6 in den homozygoten Zustand überführt. Zur Einführung des von SHR stammenden Y-Chromosoms erfolgt die Kreuzung eines konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchens mit einem SHR-Männchen. Durch erneute Bruder-Schwesterverpaarung erfolgt im Intercross die Überführung des wieder heterozygoten RNO6 in den homozygoten Zustand und schließlich die Etablierung des konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamms.

Im ersten Schritt wurde zur Bildung einer F1-Generation ein MWF-Männchen mit einem SHR-Weibchen verpaart. Ein Männchen der F1-Generation wurde folgend mit 4 SHR-Weibchen zurückgekreuzt. Aus der ersten Backcross-Generation wurden alle männlichen Nachkommen bezüglich der Heterozygotie des zu übertragenden RNO6 untersucht. Hierfür wurde aus den Schwanzspitzen der Ratten isolierte DNA mit Hilfe von polymorphen Mikrosatellitenmarkern im Abstand von 10 cM über RNO6 verteilt

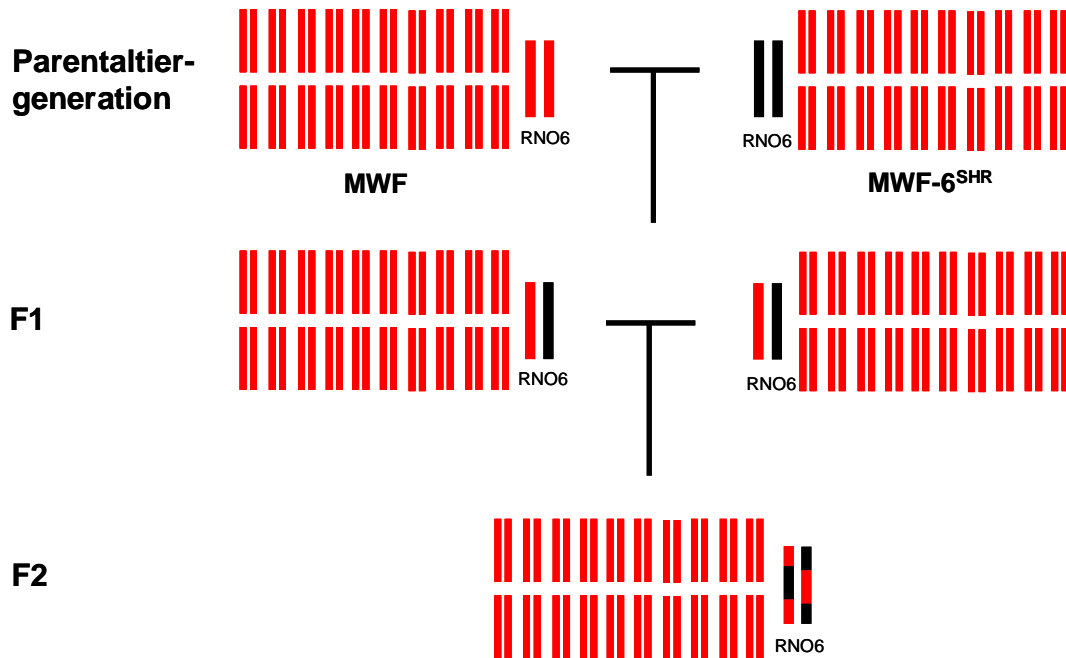
untersucht. Lag RNO6 in heterozygoter Form vor, wurde im Anschluss das gesamte Genom der Tiere untersucht. Die Männchen, die heterozygot bezüglich des RNO6 waren und gleichzeitig die höchste Homozygotie des restlichen Genoms für SHR aufwiesen, wurden für die weitere Zucht der Backcross-Kaskade ausgewählt. In den folgenden Backcross-Generationen wurde nach demselben Schema verfahren, jedoch beschränkte sich die Untersuchung des Hintergrundgenoms auf die Marker, die bislang noch in heterozygoter Form vorlagen. Anschließend wurde im Intercross ein Männchen mit einem Weibchen verpaart, die RNO6 in heterozygoter Form und das übrige Hintergrundgenom vollständig homozygot für SHR aufwiesen. Aus dieser Verpaarung hervorgegangene weibliche Nachkommen mit einem für MWF homozygoten RNO6 wurden zur Einführung des Y-Chromosoms des SHR-Stamms mit SHR-Männchen verpaart. Das hierbei erneut entstandene heterozygote RNO6 wurde durch wiederholte Intercrosse in den für MWF homozygoten Zustand überführt und der konsome Stamm SHR-6<sup>MWF</sup> durch anschließende systematische Bruder-Schwester-Verpaarungen etabliert (Abb. 4).

#### **2.2.1.5 Kosegregations- und Kopplungsanalyse zwischen dem Parentaltierstamm MWF und dem konsomen Stamm MWF-6<sup>SHR</sup>**

Nachdem der Albuminurie-QTL auf RNO6 im konsomen Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> als funktionell bedeutsam identifiziert wurde (Schulz et al., 2007), sollte er in der vorliegenden Arbeit in einer zusätzlichen Kosegregations- und Kopplungsanalyse höherer Spezifität im Rahmen eines genetisch einheitlicheren Hintergrundgenoms analysiert werden. Als Grundlage für die Durchführung der Kopplungsanalyse wurde ausgehend von dem konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>- und MWF-Stamm eine F2-Generation gezüchtet. Da in den einzelnen (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Tieren die Heterozygotie des Hintergrundgenoms entfiel, die die Sensitivität traditioneller Kosegregations- und Kopplungsanalysen normalerweise reduzierte, kam dieser Kopplungsanalyse eine statistisch gesteigerte Aussagekraft zu.

In einem ersten Schritt wurde ein konsomes MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen mit einem albuminurischen MWF-Parentaltiermännchen verpaart. Die Nachkommen wiesen bei einem für MWF vollständig homozygoten Hintergrundgenom nur das RNO6 in heterozygoter Form auf und wurden zur Bildung einer F2-Generation Bruder-Schwester-Verpaarung. Da das Genom während der F1- und F2-Generation bis auf RNO6

homozygot bezüglich des MWF-Stamms blieb, erfolgten alle für die Kosegregations- und Kopplungsanalyse benötigten Rekombinations-Vorgänge ausschließlich auf RNO6 (Abb. 5).



**Abb. 5: Zucht einer F2-Generation ausgehend von MWF und MWF-6<sup>SHR</sup>**

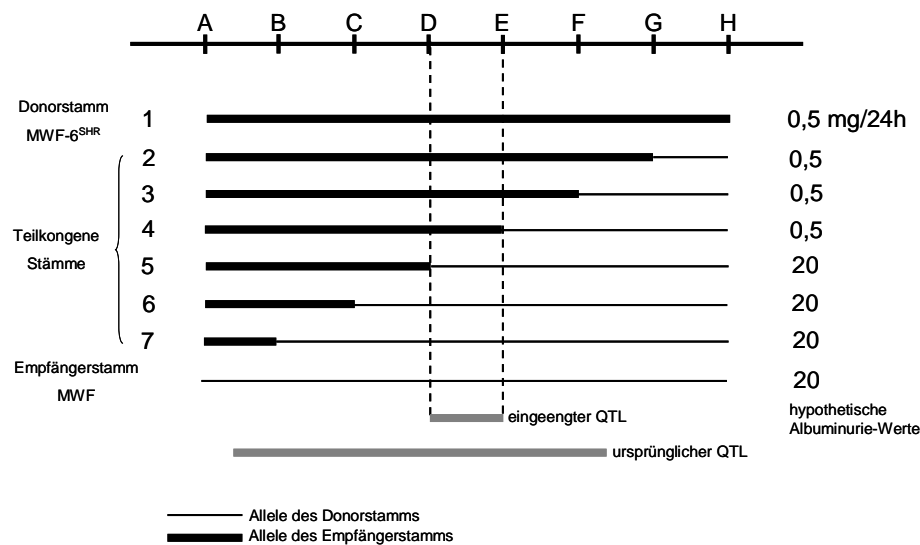
F1, 1. Filialgeneration; F2, 2. Filialgeneration; rot, Allele von MWF; schwarz, Allele von SHR  
 Zur Bildung einer F2-Generation werden der MWF-Stamm und der konsome MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm, der das von SHR stammende RNO6 aufweist, gekreuzt. Aufgrund des einheitlichen Hintergrundgenoms von MWF erfolgen sämtliche Rekombinationsereignisse ausschließlich auf RNO6.

### 2.2.1.6 Prinzip der Eingrenzung einer QTL-Region über die geno- und phänotypische Charakterisierung teilkongener Stämme

Ausgehend von einem konsomen Stamm können teilkongene Stämme mit zunehmend kleineren Chromosomensegmenten des Donorstamms innerhalb des Hintergrundgenoms des Empfängerstamms gezüchtet werden.

Für die Zucht der teilkongenen Stämme im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden der konsome Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> mit dem von SHR stammenden RNO6 als Donorstamm und der Parentaltierstamm MWF als Empfängerstamm gekreuzt und die F1-Nachkommen zur Generierung einer F2-Generation miteinander verpaart. Vor dem Hintergrund eines fixierten genetischen Hintergrundes des MWF-Stamms erfolgten die Rekombinationsereignisse während der meiotischen Reifeteilung bei der F2-Bildung ausschließlich auf RNO6. Demnach entstanden F2-Tiere mit unterschiedlichen chromosomalen Abschnitten auf RNO6 von SHR und MWF stammend. Durch die

genotypische Analyse mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker wurden entsprechende Tiere für die Etablierung teilkongener Stämme ausgewählt, die überschneidend zunehmend kleinere chromosomale Abschnitte des Donorstamms im Hintergrundgenom des Empfängerstamms aufwiesen (Abb. 5; Abb. 6). Auf diese Weise entstanden im Rahmen dieser Arbeit folgende teilkongene Stämme: MWF.SHR-(D6Rat1), MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat6), MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat12), MWF.SHR-(D6Rat1-D6Mit8), MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat106), MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat30).



**Abb. 6: Prinzip der Eingrenzung einer QTL-Region über die geno- und phänotypische Charakterisierung teilkongener Stämme**

Schmaler Balken, Allele des Empfängerstamms (MWF); breiter Balken, Allele des Donorstamms (MWF-6<sup>SHR</sup>); A-H, Mikrosatellitenmarker; 1-7, teilkongene Stämme mit zunehmend kleineren Chromosomenabschnitten des Donorstamms im genetischen Hintergrund des Empfängerstamms. Im Vergleich zum teilkongenen Stamm 4 steigert sich beim teilkongenen Stamm 5 die Albuminurie von 0,5 mg/24h auf 20 mg/24h, einem Wert entsprechend dem Empfängerstamm. Im Chromosomenabschnitt zwischen den Mikrosatellitenmarkern D und E ist demzufolge der Albuminurie-beeinflussende Locus im QTL lokalisiert.

Mit Hilfe der phänotypischen Charakterisierung der teilkongenen Stämme ist es nachfolgend möglich die QTL-Region einzugrenzen. Ein teilkongener Stamm mit demselben Phänotyp des Donorstamms beinhaltet im genotypisch definierten Chromosomenabschnitt weiterhin den informativen QTL-Bereich. Im Vergleich ist der informative QTL-Bereich im definierten Chromosomenabschnitt eines teilkongenen Stamms abwesend, der den Phänotyp des Empfängerstamms aufweist (Abb.6). Über dieses systematische Vorgehen kann idealerweise eine QTL-Region erfolgreich auf eine Größe kleiner 1 cM eingegrenzt werden, um eine effektive Suche nach genetischen Faktoren zu ermöglichen, die den Phänotyp bestimmen.

## 2.2.2 Versuchsprotokolle

### 2.2.2.1 Phänotypische Charakterisierung des konsomen Stamms SHR-6<sup>MWF</sup>

Die phänotypische Untersuchung des konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamms wurde in einer Verlaufstudie durchgeführt (Genehmigungsnummer G 0089/04, 13.10.2004). Es wurden 16 männliche und 16 weibliche konsome SHR-6<sup>MWF</sup>-Ratten analysiert. Zur Evaluation des altersabhängigen Albuminurieverlaufs wurde in der 4., 8., 12., 18., 24. und 32. Woche bei allen Tieren ein 24-Stundenurin gesammelt und darin die Albuminexkretion bestimmt. In der 14. und 24. Woche wurden zudem bei den Männchen und Weibchen die systolischen Blutdruckwerte ermittelt.

### 2.2.2.2 Phänotypische Charakterisierung der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population

Im Rahmen der Kosegregations- und Kopplungsanalyse der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population wurden bei insgesamt 104 männlichen F2-Ratten zu drei verschiedenen Zeitpunkten in der 8., 14. und 24. Woche die Albuminurie im 24-Stunden-Urin bestimmt, um mögliche altersabhängige Geneffekte zu identifizieren.

### 2.2.2.3 Phänotypische Untersuchung der teilkongenigen Stämme

Die männlichen Tiere der folgenden teilkongenigen Stämme wurden bezüglich der Albuminausscheidung im 24-Stunden-Urin untersucht:

Teilkongener Stamm	Anzahl der Tiere
MWF.SHR-(D6Rat1)	13
MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat6)	10
MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat12)	11
MWF.SHR-(D6Rat1-D6Mit8)	18
MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat106)	10
MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat30)	10

## **2.2.3 Phänotypische Untersuchungen**

### **2.2.3.1 Blutdruckmessung**

Die Blutdruckmessung erfolgte mittels einer nicht invasiven Tail-cuff-Methode an wachen Tieren mit Hilfe einer computergestützten oszillatorischen Technik (TSE, Bad Homburg, Germany). Zunächst wurden die Tiere zur Ruhigstellung in Plexiglasröhren, sogenannten Restrainern, gesetzt und zur Relaxation und Beruhigung in eine auf 37 – 39°C temperierte Box gelegt. Mit Hilfe einer an der Schwanzwurzel der Tiere angelegten Blutdruckmanschette wurde der Druck bestimmt, der nach Aufpumpen der Manschette die Pulsation der Schwanzarterie verhinderte und der Druck, der nach Druckablassung wieder einen normalen Blutfluss zuließ. Zur Adaptation der Ratten an diesen Messvorgang wurden zwei bis drei Probemessungen vorgenommen, deren Werte nicht in die Auswertung miteinbezogen wurden. Im weiteren Verlauf wurde der systolische Blutdruck unter der Berücksichtigung zirkadianer Rhythmen zu gleichen Tageszeiten an drei aufeinanderfolgenden Tagen durch jeweils denselben Untersucher bestimmt. Es wurden jeweils drei Messungen durchgeführt und auf einen Computer übertragen. Abschließend wurden alle Werte gemittelt.

### **2.2.3.2 Urinuntersuchungen**

#### **2.2.3.2.1 Uringewinnung**

Zur Gewinnung eines 24-Stundenurins wurden die Ratten einzeln unter sonst gleichen Haltungsbedingungen in metabolische Stoffwechselkäfige gesetzt. Dabei hatten die Tiere weiterhin freien Zugang zu Futter und Wasser. Der durch die Apparatur gewonnene Urin wurde nach 24 Stunden in Szintillationsröhrchen dekantiert und das Urinvolumen durch Auswiegen bestimmt, wobei 1 g Urin etwa 1 ml entsprach. Nach sorgfältigem Durchmischen des Urins wurde zur weiteren Albuminbestimmung etwa 1 ml Urin in ein 2 ml Eppendorfgefäß dekantiert und der übergebliebene Urin in Szintillationsgefäßen bei -20°C gelagert.

#### **2.2.3.2.2 Bestimmung der Albuminurie**

Die Albuminkonzentration im 24-Stundenurin wurde mit Hilfe einer in der Arbeitsgruppe etablierten Methode, einer für Ratten spezifischen direkten kompetitiven ELISA -

Technik bestimmt (Kreutz *et al.*, 2000).

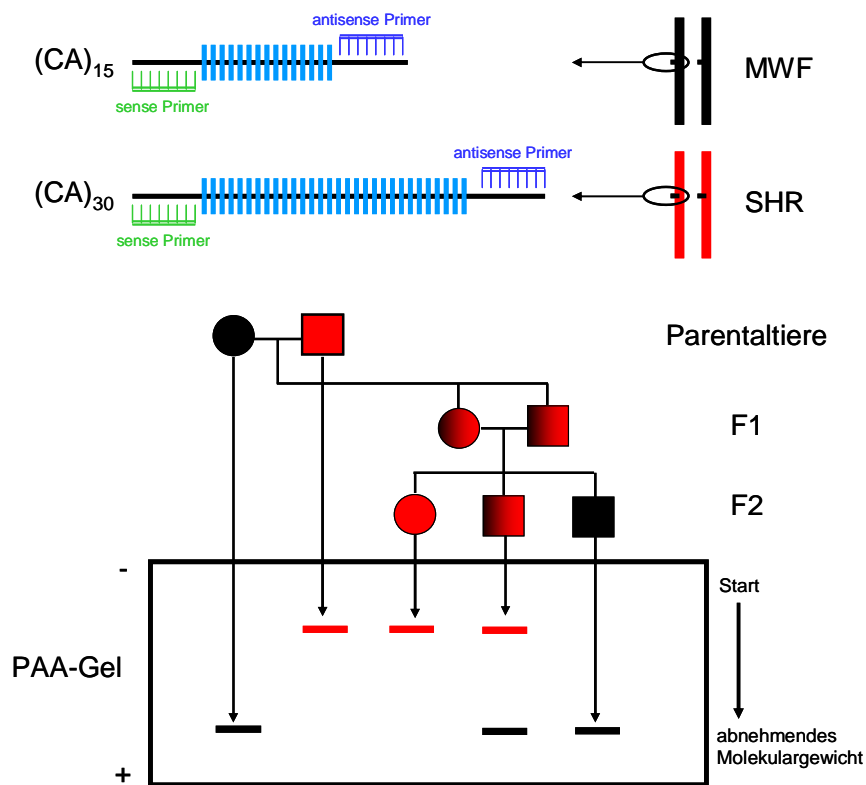
Nach Entfernung von Verunreinigungen durch Zentrifugation der bei -20°C gelagerten Urinproben erfolgte die Messung der Albuminkonzentration in Mikrotiterplatten. Die Messung wurde als Doppelbestimmung mit Hilfe einer Eichgeraden durchgeführt. Die Extinktion der durch die Antigen-Antikörper-Reaktion entstandenen Farbreaktion wurde bei 450 nm mit Hilfe des ELISA-MRX-Plate-Readers gemessen, die Albuminwerte mit dem Computerprogramm Dynex Revelation G3.04 berechnet und abschließend in mg/24h angegeben.

## **2.2.4 Genotypisierung**

### **2.2.4.1 Prinzip der Genomanalyse mittels Mikrosatellitenmarker**

Die Genomanalyse der Ratte erfolgte mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern, auch simple sequence length polymorphism (SSLP) genannt. Sie stellen kurz sich wiederholende DNA-Sequenzen bestehend aus Di-, Tri- oder Tetranukleotiden dar, die über das gesamte Genom verteilt, in vor allem nichtkodierenden Abschnitten der DNA lokalisiert sind. Bezüglich ihrer Länge können sie hoch polymorph sein, so dass sie sich zur Unterscheidung verschiedener Individuen und Rattenstämme eignen. Mit Hilfe der PCR können diese Mikrosatellitenmarker, deren Lokalisationen im Genom in verschiedenen Internetdatenbanken geführt wurden (<http://www.well.ox.ac.uk/~bihoreau/>, <http://www.broadinstitute.org/rat/public/>) bzw. sind (<http://www.rgd.mcw.edu/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), nach radioaktiver Markierung flankierender Primer vervielfältigt werden. Da sich die Anzahl der repetitiven Sequenzen des untersuchten Mikrosatellitenmarkers zwischen den Parentaltierstämmen unterscheidet (Abb. 7), sind die PCR-Amplifikationsprodukte von unterschiedlicher Größe und können mit der Gelelektrophorese auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel voneinander getrennt werden. Das anschließend durch die Autoradiographie sichtbar gemachte Bandenmuster der radioaktiv-markierten Amplifikate zeigt, ob ein Individuum an einem bestimmten Genomort für ein Allel homozygot oder heterozygot bezüglich der Parentaltierstämme ist.





**Abb. 7: Prinzip der Genomanalyse mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern am Beispiel einer (MWF x SHR)-F2-Population**

CA, Mikrosatellitenmarker; F1, 1.Filialgeneration; F2, 2.Filialgeneration; PAA-Gel, Polyacrylamidgel; Kreis, Weibchen; Viereck, Männchen; schwarz, MWF; rot, SHR; schwarz-rot, für MWF und SHR heterozygotes Tier; schwarze Bande, MWF-Allel; rote Bande, SHR-Allel

Der untersuchte Mikrosatellitenmarker (CA) weist bei MWF 15 repetitive Sequenzen und bei SHR 30 repetitive Sequenzen auf. Aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts wandern die PCR-Amplifikationsprodukte bei der Gelelektrophorese unterschiedlich weit auf dem Polyacrylamidgel. Das entstehende Bandenmuster zeigt an, ob die Tiere am Genomort des untersuchten Mikrosatellitenmarkers homo- oder heterozygot bezüglich der Parentaltiere sind.

#### 2.2.4.2 Herkunft der Mikrosatellitenmarker

Die für die Genomanalyse verwendeten Mikrosatellitenmarker wurden an folgenden Instituten entwickelt: A) Medical Collage of Wisconsin [(Rat) <http://www.rgd.mcw.edu/>], B) Massachusetts Institute of Technology [(Mit) Cambridge, MA; <http://genome.wi.mit.edu>], C) Massachusetts General Hospital [(Mgh) Cambridge, MA; <http://genome.wi.mit.edu>].

#### 2.2.4.3 DNA-Isolierung aus Schwanzspitzenbiopsien

Im Alter von 4 Wochen wurde bei den Tieren eine etwa 0,5 cm lange Schwanzspitzenbiopsie vorgenommen und bei -20°C gelagert. Das gewonnene Gewebe wurde zur Isolierung genomischer DNA in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß

mittels 700 µl Tailpuffer und 40 µl Proteinase K bei 55°C, 1-3 Tage verdaut. Nach anschließender 10minütiger Abkühlung des Ansatzes auf Eis wurde die Probe zur Eiweißfällung und Reinigung mit 300 µl gesättigter Natriumchlorid-Lösung (6 M) gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten auf Eis wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 14.000 Upm und 4°C zentrifugiert und der gewonnene Überstand vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Probe wurde zur Fällung der DNA mit 1 ml Isopropanol versetzt und nach 30-50minütiger Inkubation auf Eis erneut für 15 Minuten bei 14.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde nach Verwerfen des Überstandes mit 500 µl -20°C-kaltem, 70%igem Ethanol mittels Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Pellet nach 10minütiger Trocknung bei Raumtemperatur in 200 µl Aqua bidest aufgenommen und bei 37°C für 30 Minuten gelöst. Für die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der gewonnenen DNA wurden die Proben bezüglich ihrer optischen Dichte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260-280 nm gemessen und die ermittelten DNA-Konzentrationen in der Einheit µg/µl angegeben.

#### **2.2.4.4 DNA-Stockplatten**

Für die später durchgeführte PCR wurden DNA-Stockplatten angefertigt, zum einen um Tierverwechslungen zu vermeiden und zum anderen um eine einheitliche Reihenfolge der Tiere für die Elektrophorese auf dem Polyacrylamidgel festzulegen. Hierzu wurden in jedes Loch der Mikrotiterplatte jeweils 10 µl DNA-Lösung in einer Konzentration von 10 ng/µl pipettiert. Zur anschließenden Lagerung bei 4°C wurden die Platten zwei Stunden bei 37° getrocknet.

#### **2.2.4.5 Primerkinasierung: Radioaktive Markierung der Primer am 5'-Ende**

Das 5'-Ende des sense-Primers wurde mit radioaktivem Phosphat in  $\gamma$ -Stellung markiert. In einem Eppendorfgefäß wurde pro DNA-Probe ein Gemisch aus 0,04 µl Kinase-Puffer, 0,017 µl T4-Polynukleotidkinase (10U/µl) und 0,0583 µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATP (3000 Ci/mmol) angefertigt und anschließend 0,11 µl dieser Mischung mit 0,22 µl 6 µM sense-Primer (Endkonzentration 4 µM) versetzt. Der Ansatz wurde bei 37°C für 45 min und dann bei 65°C für 10 min in der PCR-Maschine inkubiert.

#### **2.2.4.6 Polymerasekettenreaktion**

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann eine zwischen zwei spezifischen Primern gelegene Basenabfolge durch mehrfach automatisch ablaufende Zyklen amplifiziert werden. Dabei werden nach Denaturierung der DNA die Einzelstränge durch eine thermostabile Polymerase zu den jeweiligen Doppelsträngen komplementiert. Da die Amplifikate im folgenden Zyklus ebenfalls als Vorlage dienen, erfolgt die Zunahme der DNA-Moleküle in etwa exponentiell.

Für die PCR wurde zunächst je Probe eine Mischung aus 1,3 µl 10x PCR-Puffer, 0,39 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,1 µl 2,5 mM dNTPs, 0,07 µl Taq-Polymerase, 0,22 µl 6 µM antisense Primer, 8,91 µl Aqua bidest und dem gesamten zuvor kinasierten sense Primer gebildet. Pro Ansatz kamen 50 ng genomische DNA zum Einsatz, die mit 10 µl des zuvor hergestellten Gemisches versetzt wurde. Nach Verschluss der Mikrotiterplatten mit Schweißfolie wurde das PCR-Programm gestartet. Als erster Schritt erfolgte eine Denaturierung bei einer Temperatur von 94°C für 2 Minuten. Es folgten 30 Zyklen bestehend aus 15 Sekunden bei 94°C, 1 Minute bei primerspezifischer Annealingtemperatur und 1 Minute bei 72°C. Den 30 Zyklen wurde eine finale Elongation bei 72°C für 7 Minuten angeschlossen. Für eine spezifischere Bindung und ein besseres Amplifikationsergebnis wurde für einige Primer ein Touchdown Programm genutzt, bei dem die Spezifität der Primer-Bindung durch zyklusweise Annäherung der Annealing-Temperatur des Primers erhöht wird. Auf diese Weise werden Primer-Dimere und Artefakte verringert und das gewünschte Amplikon vorzugsweise vermehrt.

#### **2.2.4.7 Auftrennung der PCR-Produkte mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Für die Anfertigung des Gels wurden zwei 43 x 35 cm große Glasplatten verwendet, von denen eine eine Aussparung für den Kamm aufwies. Eine Glasplatte wurde mit 70%igem Ethanol und Aceton behandelt, die andere nach Reinigung mit 70%igem Ethanol mit Acrylease beschichtet. Beide Platten wurden durch 0,4 mm dicke Spacer an den Längsseiten voneinander getrennt übereinandergelegt, mit Edelstahlklammern fixiert und die untere Schmalseite der Platten vor Gießen des Gels mit Paketklebeband verschlossen. Pro Gelansatz wurden 70 ml einer Polyacrylamidgel-Lösung mit 40 µl Temed zur Quervernetzung des Gels und mit 400 µl Ammoniumpersulfat-Lösung (10 mg/ml) zum Starten der Reaktion vermischt. Dieser Ansatz wurde luftblasenfrei

zwischen die Glasplatten gegossen und ein Kamm mit der glatten Seite an der oberen Schmalseite der Platten zum Erhalt einer glatten Gelkante etwa 5 mm weit in die Gelflüssigkeit geschoben. Nach 1½-stündiger Auspolymerisation des Gels bei Raumtemperatur wurden das Paketklebeband und die Klammern entfernt und der Kamm mit den Zinken voran ca. 2 mm tief in das Gel eingeführt. Die Elektrophoresekammern wurden mit 1x TBE-Puffer gefüllt und das Gel in die Kammervorrichtung eingespannt. Die aus der PCR hervorgegangenen Proben wurden mit 10 µl Laufpuffer versetzt und bei 94°C für 5 Minuten denaturiert. Es wurden 3 µl je Probe mit einer Hamilton-Mehrkanal-Spritze in die Geltaschen gefüllt und an der Kammer eine Spannung von 70 Watt angelegt. Entsprechend des elektrischen Gradienten wurden die PCR-Produkte abhängig von der jeweiligen Größe aufgetrennt. Nach ca. 2½ Stunden wurde die beschichtete Glasplatte abgehoben, das Gel auf Gel-Blotting-Papier übertragen, in Verpackungsfolie eingeschlagen und zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Röntgenkassette verbracht. Die Expositionszeit des Röntgenfilms betrug durchschnittlich 18 Stunden und erfolgte bei -20°C. Die anschließende Filmentwicklung erfolgte automatisch in einer Entwicklermaschine. Die entstandenen Autoradiographien wurden von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet.

### **2.2.5 Statistische Analysen**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Computerprogramm SPSS 13.0. Zunächst wurden die ermittelten Werte mittels des Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft und nicht normal verteilte Werte logarithmiert. Bei weiterbestehend fehlender Normalverteilung wurde für die Auswertung der Daten der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Normalverteilte Daten wurden im Paarvergleich mittels des t-Tests und Mehrgruppenvergleiche in einer Varianzanalyse (ANOVA) mit Post-Hoc-Testung (Bonferroni) ausgewertet. Ein  $p < 0,05$  wurde als Signifikanzschwelle definiert.

Im Rahmen der Kosegregations- und Kopplungsanalyse wurde die Erstellung der Chromosomenkarte und die Kartierung der QTL mit Bestimmung der LOD-Score-Werte auf RNO6 mit den Computerprogrammen MAPMAKER/EXP und MAPMAKER/QTL 3.0b vorgenommen. Die in cM angegebenen genetischen Distanzen zwischen den genetischen Markern wurden mit Hilfe des Programms über die

Rekombinationshäufigkeiten mittels des Kosambi-Algorithmus errechnet. Vor Durchführung der Kopplungsanalyse wurden bei fehlender Normalverteilung die phänotypisch ermittelten Albuminurie-Werte der F2-Tiere logarithmiert und eine Normalverteilung erreicht. Die Interpretation der ermittelten LOD-Score-Werte erfolgte nach den Empfehlungen von Lander und Kruglyak (1995). Dabei wurde für die Untersuchung einer F2-Population ein LOD-Score  $\geq 4,3$  als signifikante und ein LOD-Score  $\geq 2,8$  als wahrscheinliche Kopplung definiert. Die Konstruktion des 1-LOD-Intervalls bzw. 95% Konfidenzintervalls, innerhalb dessen ein QTL mit 60-95%iger Wahrscheinlichkeit lokalisiert ist, erfolgte durch Ermittlung der genetischen Distanz einer 1-LOD-Einheit unterhalb des maximalen Ausschlags der LOD-Kurve; für das 2-LOD-Intervall entsprechend zwei LOD-Einheiten unterhalb des Peaks der LOD-Kurve (Rapp, 2000). Zur Ermittlung des genetischen Einflusses der Parentaltierstämme auf die Albuminurie wurden die Peakmarker der ermittelten LOD-Kurven einer Genotyp-Pänotyp-Untersuchung mittels Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 SHR-6<sup>MWF</sup>-Studie

Nach der Identifizierung eines für den MWF-Stamm wichtigen Albuminurie-QTLs auf RNO6 (Schulz *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2003) wurde im Rahmen eines vorangehenden Projekts der Arbeitsgruppe der konsome Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> charakterisiert (Schulz *et al.*, 2007). Durch die Übertragung des gesamten RNO6 vom SHR-Stamm in den isogenetischen Hintergrund des MWF-Stamms und damit die Elimination des MWF-QTLs für Albuminurie, konnte die Albuminexkretion im konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm im Vergleich zum MWF-Parentaltierstamm in der 8. Woche vollständig eliminiert werden ( $p < 0,0001$ ). Im Rahmen dieser Arbeit soll in einem ersten Schritt die Bedeutung des Albuminurie-QTLs auf RNO6 im genetischen Hintergrund des SHR-Stamms geprüft werden. Hierzu wurde der konsome Stamm SHR-6<sup>MWF</sup> gezüchtet, bei dem, im Gegensatz zum konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm, SHR-RNO6 durch MWF-RNO6 vice versa ersetzt wurde.

#### 3.1.1 Genotypische Charakterisierung des konsomen Stamms SHR-6<sup>MWF</sup>

Nach der Etablierung des konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamms wurde mit Hilfe von 237 Mikrosatellitenmarkern im Abstand von ca. 10 cM über das gesamte Genom verteilt die genetische Reinheit des Stamms evaluiert. Im Rahmen dieser abschließenden Genomanalyse konnte nachgewiesen werden, dass das gesamte RNO6 mit dem zuvor identifizierten Albuminurie-QTL des MWF-Stamms erfolgreich in den isogenetischen Hintergrund des SHR-Stamms überführt wurde. Durch die genotypische Charakterisierung konnten des Weiteren Tierverwechslungen und spontane Mutationen während der konsomen Zucht ausgeschlossen und die genetische Reinheit des konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamms bestätigt werden.

Als Resultat der Genomanalyse wurde mit genetisch reinen Tieren eine Kolonie für die Erhaltungszucht sowie nachfolgender tierexperimenteller Studien definiert.

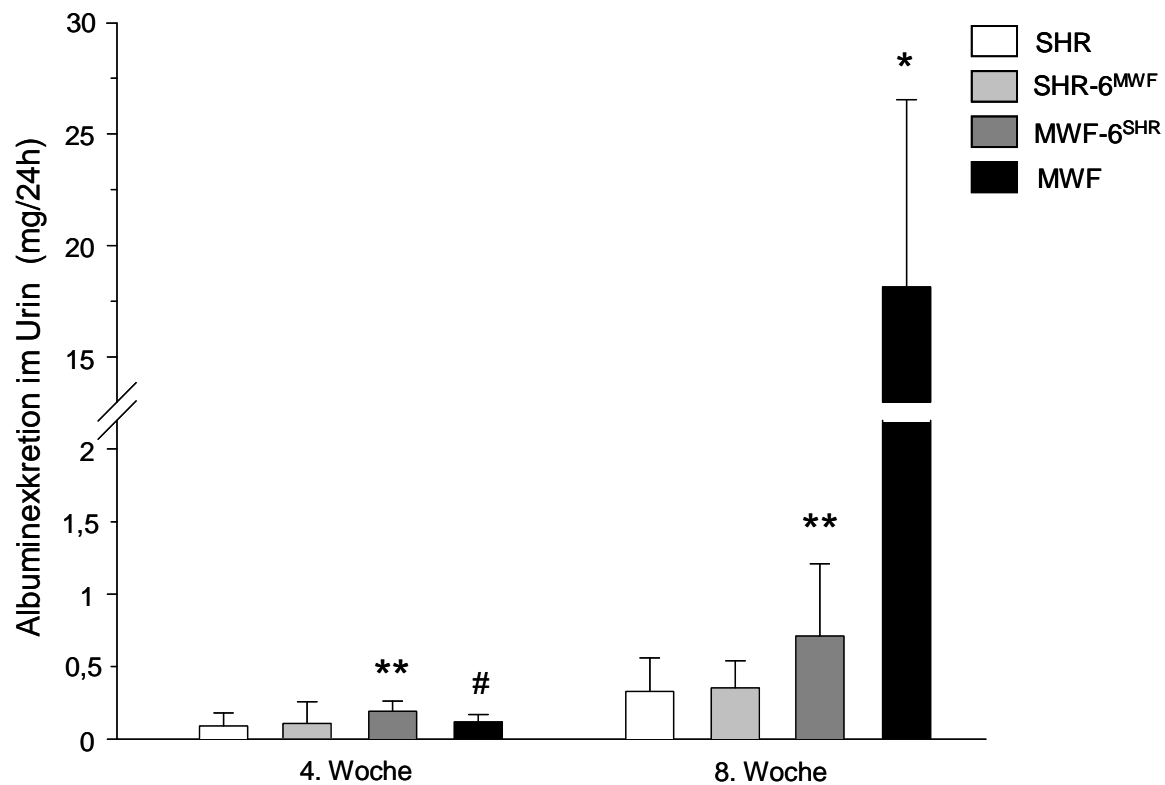
### **3.1.2 Vergleichende phänotypische Charakterisierung konsomer SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen und -Weibchen**

Um den Einfluss des Albuminurie-QTLs auf RNO6 der MWF-Ratte im genetischen Hintergrund des SHR-Stamms näher zu beurteilen und sexuelle Dimorphismen zu analysieren, wurden konsome SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen und -Weibchen in einer Verlaufsstudie hinsichtlich der Albuminexkretion im Urin und des systolischen Blutdrucks phänotypisiert. Anschließend wurden die Phänotypen mit den in der Arbeitsgruppe erhobenen Daten der Parentaltierstämme MWF und SHR sowie des konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamms vergleichend analysiert (Schulz *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 2008b).

#### **3.1.2.1 Albuminurie der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen**

Nach dem Absetzen der Tiere von der Mutter wurde im Rahmen der Albuminurieverlaufsstudie zum Zeitpunkt der 4. Woche mit der 24-Stundenurinsammlung im metabolischen Stoffwechselläufig begonnen. In diesem Alter wiesen die Parentaltierstämme MWF und SHR ebenso wie die konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>- und SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen eine Albuminurie im Bereich von unter 1 mg/24h auf. Die Albuminurie der MWF-Männchen ergab vergleichbare Werte mit den SHR- und MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen und erreichte einen signifikanten Unterschied gegenüber den SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen ( $p < 0,02$ , Abb. 8). Die konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen wiesen eine signifikant höhere Albuminausscheidung im Vergleich mit den SHR- und SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen auf ( $p < 0,03$ , Abb. 8).

Zum Zeitpunkt der 8. Woche stieg die Albuminurie der MWF-Männchen auf einen Wert von  $18,14 \pm 8,39$  mg/24h, der sich im Vergleich zu den unter 1 mg/24h liegenden SHR-, konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>- und MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen hoch signifikant unterschied ( $p < 0,0001$ , Abb. 8). Die konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen zeigten eine zweifach höhere Albuminausscheidung im Urin gegenüber den SHR- und konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen ( $p < 0,02$ , Abb.8). Die Albuminexkretion im Urin der SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen erreichte im Bereich von unter 1 mg/24h gegenüber den SHR-Parentaltiermännchen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 8).



**Abb. 8: Albuminausscheidung bei männlichen SHR-, SHR-6<sup>MWF</sup>-, MWF-6<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 4. und 8. Woche**

\*  $p < 0,0001$  vs. SHR, SHR-6<sup>MWF</sup>, MWF-6<sup>SHR</sup>

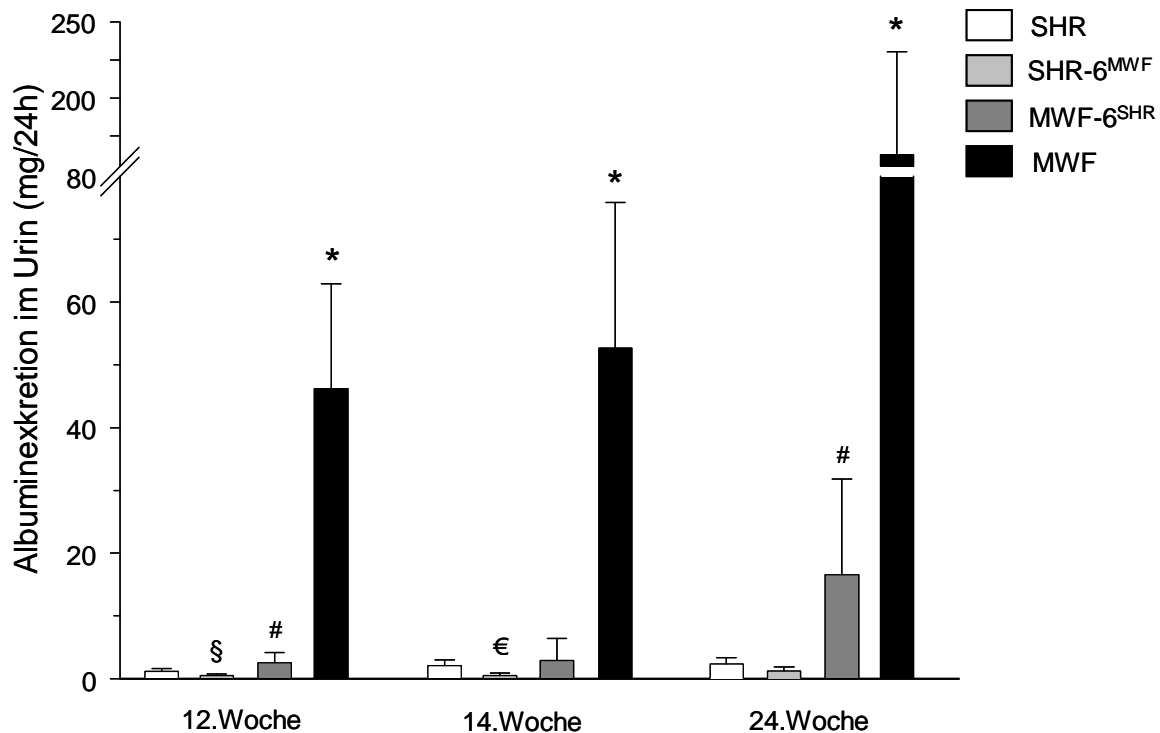
\*\*  $p < 0,03$  vs. SHR, SHR-6<sup>MWF</sup>

#  $p < 0,02$  vs. SHR-6<sup>MWF</sup>

Im weiteren Studienverlauf erhöhte sich die Albuminexkretion im Urin der MWF-Männchen bis zur 24. Woche hoch signifikant auf einen Wert von  $162,64 \pm 67,80$  mg/24h im Gegensatz zu SHR ( $p < 0,0001$ , Abb.9). Die konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen zeigten im Altersverlauf zwischen der 12. und 24. Woche einen deutlich supprimierten und im Vergleich zu MWF hoch signifikant niedrigeren Anstieg der Albuminausscheidung ( $p < 0,0001$ , Abb. 9). Im Vergleich mit den SHR-Männchen wiesen die konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen in der 12. und 24. Woche eine mit bis zu  $14,24$  mg/24h signifikant höhere Albuminexkretion auf ( $p < 0,006$ , Abb.9). Im Gegensatz dazu nahm die Albuminurie der SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen bis zur 32. Woche nur geringfügig bis auf einen Wert von  $1,26 \pm 1,16$  mg/24h zu (Abb. 14). Gegenüber den MWF- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen wurden bei den konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen zu allen Messzeitpunkten ab der 12. Woche signifikant niedrigere Albuminuriewerte nachgewiesen ( $p < 0,0001$ , Abb.9). In der 12. und 14. Woche lag die Albuminausscheidung der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen signifikant unter den



Albuminuriewerten der SHR-Männchen ( $p < 0,0003$ ), glichen sich bis zur 24. Woche jedoch auf ein vergleichbares Niveau an (Abb. 9).



**Abb. 9: Verlauf der Albuminausscheidung von SHR-, SHR-6<sup>MWF</sup>-, MWF-6<sup>SHR</sup>- und MWF-Männchen von der 12. bis zur 24. Woche**

\*  $p < 0,0001$  vs. SHR, SHR-6<sup>MWF</sup>, MWF-6<sup>SHR</sup>

#  $p < 0,006$  vs. SHR, SHR-6<sup>MWF</sup>

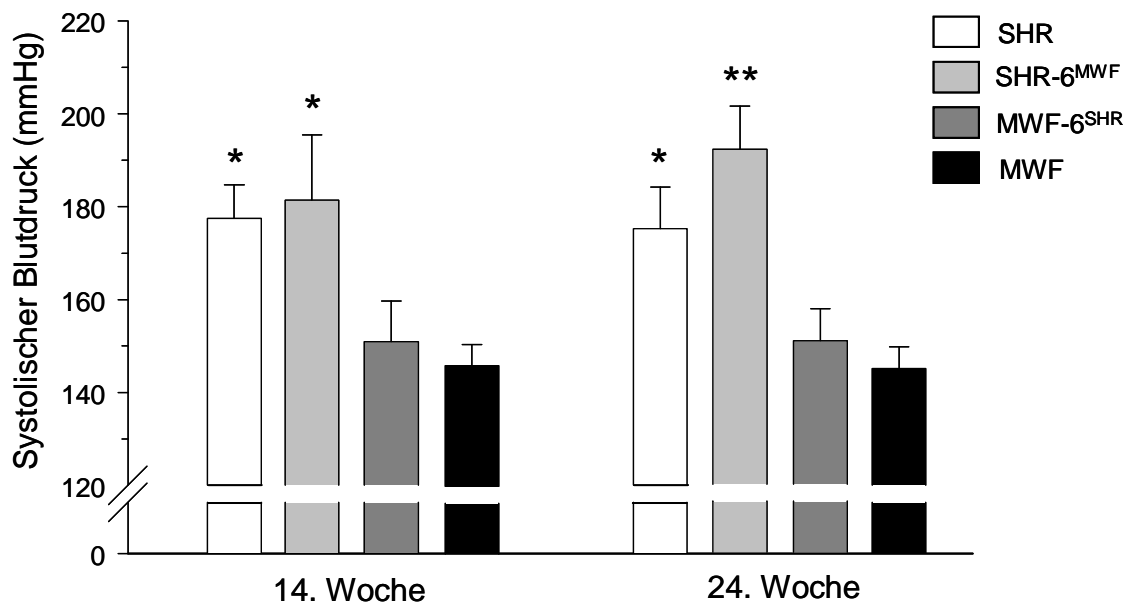
§  $p < 0,0003$  vs. SHR

€  $p < 0,0001$  vs. SHR und MWF-6<sup>SHR</sup>

### 3.1.2.2 Systolischer Blutdruck konsomer SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen

In der 14. Woche wies der systolische Blutdruck der MWF-Männchen ( $146,0 \pm 4,5$  mmHg) im Vergleich mit den SHR-Männchen ( $177,5 \pm 7,2$  mmHg) signifikant niedrigere Werte auf ( $p < 0,0001$ ). Der Blutdruck der konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen ( $151,0 \pm 8,7$  mmHg) war mit dem der MWF-Parentaltiermännchen vergleichbar und lag mit einer Differenz von 26,5 mmHg signifikant unter den Blutdruckwerten der SHR-Männchen ( $p < 0,0001$ , Abb.10). Die systolischen Blutdruckwerte der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen waren mit durchschnittlich  $181,4 \pm 14,0$  mmHg gegenüber den Blutdruckwerten der MWF- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen signifikant erhöht ( $p < 0,0001$ ) und lagen mit den Blutdruckwerten der SHR-Männchen auf einem Niveau (Abb.10). Von der 14. bis zur 24. Woche steigerte sich der systolische Blutdruck der

konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen signifikant auf einen Wert von 192,1±9,4 mmHg (p<0,017, Abb. 10). Die vergleichbaren Blutdruckwerte der MWF- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen blieben in der 24. Woche weiterhin signifikant unter denen der SHR- und konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen (p<0,0001, Abb.10). Im Unterschied zur 14. Woche erreichte der systolische Blutdruck der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen im Vergleich mit den SHR-Parentaltiermännchen in der 24. Woche signifikant höhere Werte (p<0,0001, Abb. 10).



**Abb. 10: Systolischer Blutdruck von SHR-, SHR-6<sup>MWF</sup>-, MWF-6<sup>SHR</sup>- und MWF- Männchen in der 14. und 24. Woche**

\* p<0,0001 vs. MWF-6<sup>SHR</sup> und MWF

\*\* p<0,017 vs. SHR, MWF-6<sup>SHR</sup>, MWF und SHR-6<sup>MWF</sup> der 14. Woche

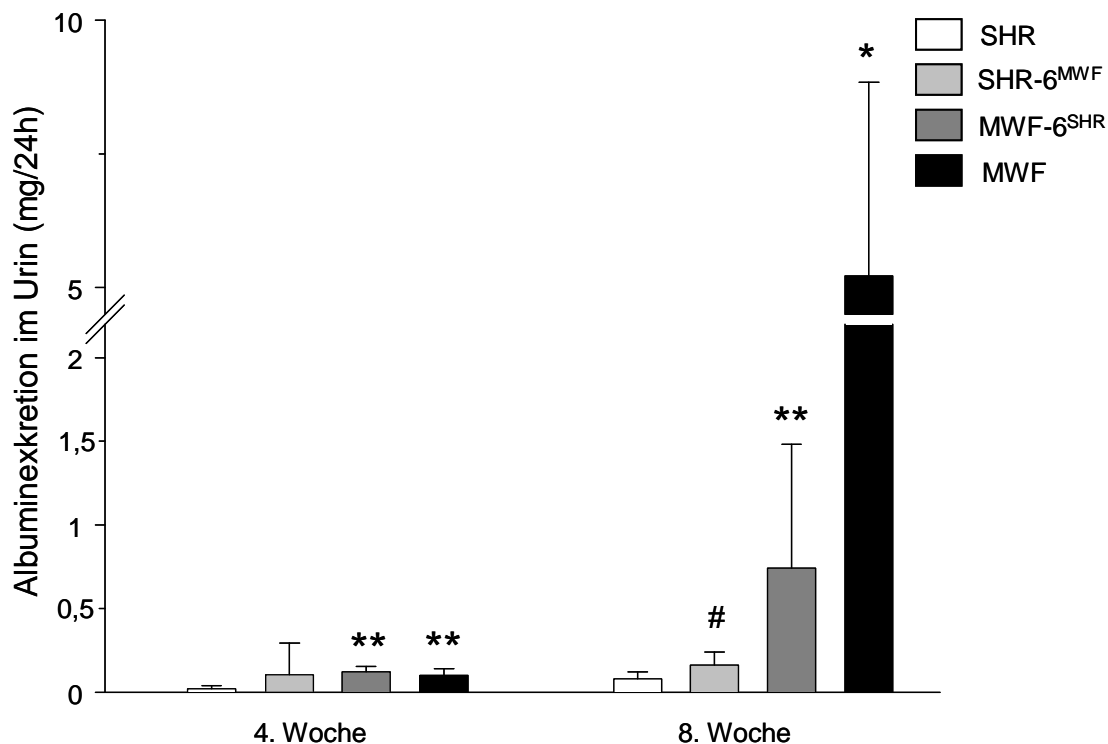
### 3.1.2.3 Albuminurie der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen

Analog zum Studienprotokoll der SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen wurden die konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen hinsichtlich des altersabhängigen Albuminurieverlaufs und des systolischen Blutdrucks vergleichend mit den weiblichen Tieren der Parentaltierstämme MWF und SHR und des konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamms untersucht.

Im Alter von 4 Wochen blieb die Albuminurie der Parentaltier- und konsomen Weibchen im Bereich von unter 1 mg/24h (Abb. 11). Die vergleichbare Albuminurie der MWF- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen erreichte gegenüber SHR und SHR-6<sup>MWF</sup> einen kleinen signifikanten Unterschied (p<0,002, Abb.11). Die konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen

wiesen mit einer Albuminexkretion von  $0,10 \pm 0,19$  mg im 24-Stundenurin eine vergleichbare Albuminurie mit den SHR-Weibchen auf.

Die Albuminurie der MWF-Weibchen stieg bis zur 8. Woche auf einen Wert von  $5,22 \pm 3,62$  mg/24h und erreichte im Vergleich mit den SHR-Weibchen einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,0001$ , Abb. 11). Die Albuminexkretion im Urin der konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen ergab gegenüber den SHR-Weibchen signifikant höhere und im Vergleich mit den MWF-Weibchen signifikant niedrigere Werte ( $p < 0,0001$ , Abb. 11). Die konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen wiesen mit  $0,16 \pm 0,08$  mg/24h in der 8. Woche eine signifikant höhere Albuminausscheidung im Vergleich mit den SHR-Weibchen auf ( $p < 0,004$ ), wohingegen die Albuminurie signifikant unter den Werten der MWF- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen blieb ( $p < 0,0001$ , Abb.11).



**Abb. 11: Albuminausscheidung bei weiblichen SHR-, SHR-6<sup>MWF</sup>, MWF-6<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 4. und 8. Woche**

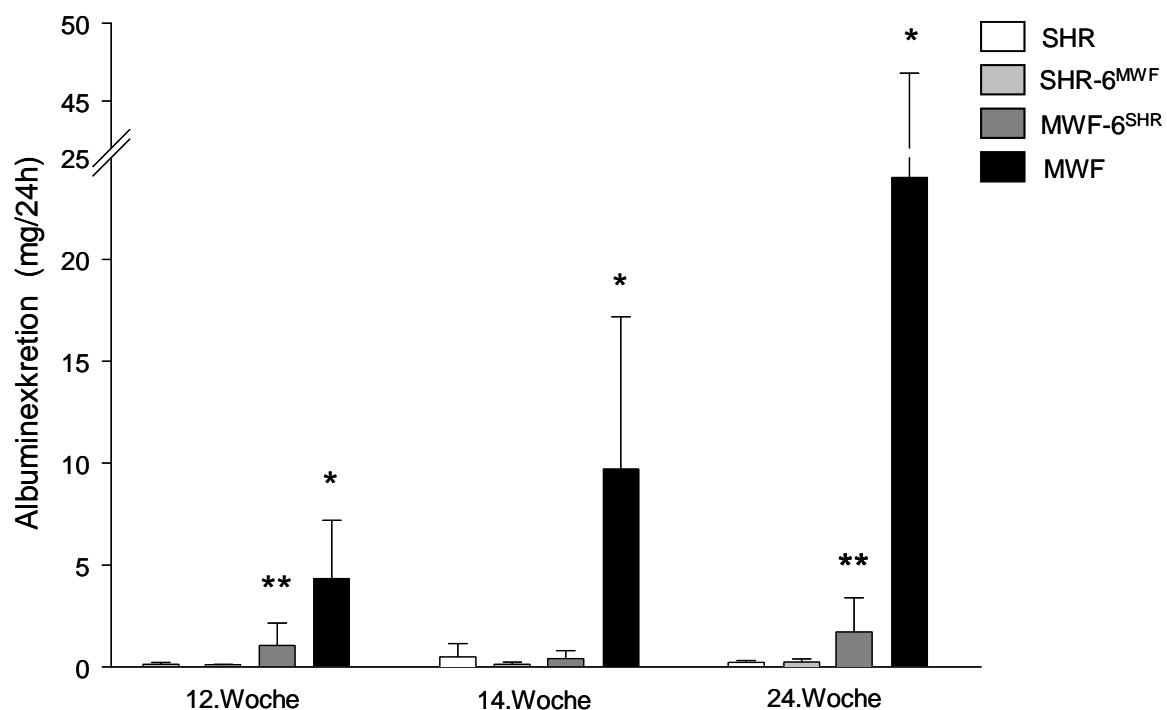
\*  $p < 0,0001$  vs. SHR, SHR-6<sup>MWF</sup> und MWF-6<sup>SHR</sup>

\*\*  $p < 0,002$  vs. SHR und SHR-6<sup>MWF</sup>

#  $p < 0,004$  vs. SHR

Im weiteren Studienverlauf erreichte die Albuminurie der MWF-Weibchen in der 24. Woche signifikant einen Wert von  $24,02 \pm 22,77$  mg/24h ( $p < 0,0001$ ) und wies im Vergleich mit den SHR-Weibchen zu allen Messzeitpunkten von der 12. bis 24. Woche

signifikant höhere Werte auf ( $p < 0,0001$ , Abb.12). Die Albuminexkretion im Urin der konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen steigerte sich von der 8. bis zur 24. Woche um das 2,3fache und lag zu diesem Zeitpunkt zwischen den SHR-Weibchen mit signifikant höheren Werten und den MWF-Weibchen mit signifikant niedrigeren Werten ( $p < 0,0001$ , Abb. 12). Bei den konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen konnte bis zur 24. Woche mit dem Erreichen einer Albuminurie von  $0,24 \pm 0,15$  mg/24h keine wesentliche Steigerung der Albuminexkretion beobachtet werden. In der 24. Woche zeigten die konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen im Vergleich mit den MWF-Weibchen eine 100fach und gegenüber den konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen eine 7fach signifikant niedrigere Albuminurie ( $p < 0,0001$ , Abb. 12). Im Vergleich mit den SHR-Weibchen wiesen die konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen ab der 12. Woche zu allen Messzeitpunkten eine vergleichbare Albuminausscheidung im Urin auf (Abb. 12).



**Abb. 12: Verlauf der Albuminausscheidung von SHR-, SHR-6<sup>MWF</sup>-, MWF-6<sup>SHR</sup>- und MWF-Weibchen von der 12. bis zur 24. Woche**

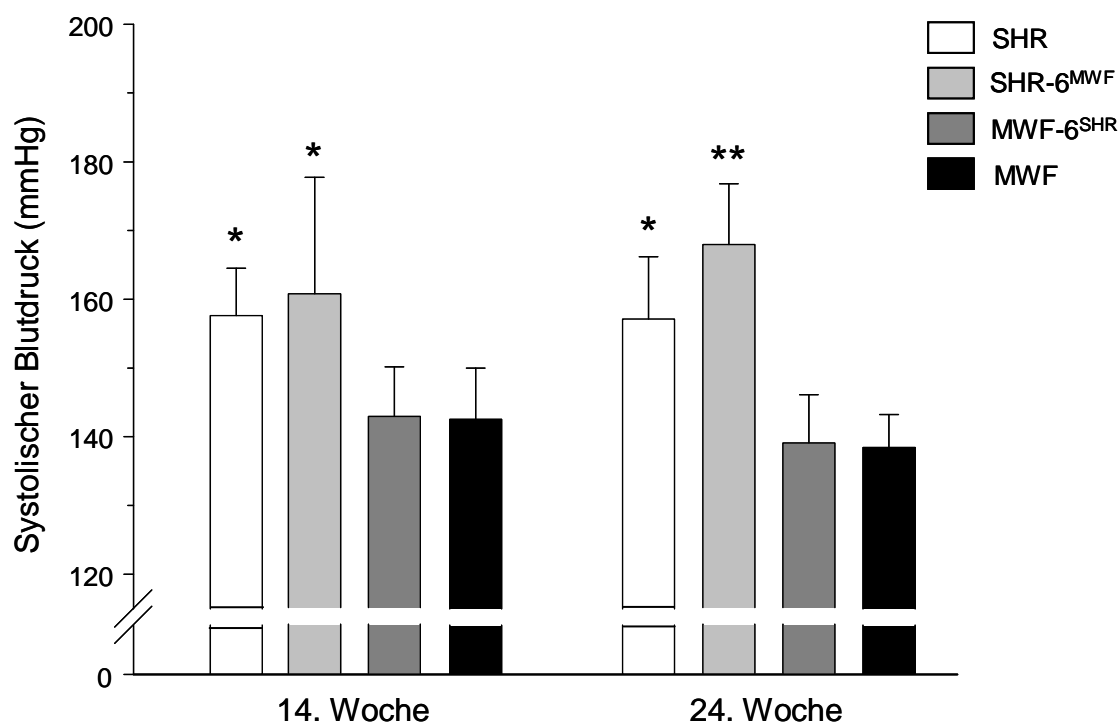
\*  $p < 0,0001$  vs. SHR, SHR-6<sup>MWF</sup> und MWF-6<sup>SHR</sup>

\*\*  $p < 0,0001$  vs. SHR und SHR-6<sup>MWF</sup>

### 3.1.2.4 Systolischer Blutdruck konsomer SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen

Die systolische Blutdruckmessung in der 14. Woche ergab bei den MWF-Weibchen ( $142,5 \pm 7,5$  mmHg) im Vergleich mit den SHR-Weibchen ( $157,6 \pm 6,9$  mmHg) signifikant

niedrigere Werte ( $p < 0,005$ ). Die konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen wiesen mit durchschnittlich  $142,8 \pm 7,2$  mmHg vergleichbare Blutdruckwerte mit den MWF-Weibchen und signifikant niedrigere Werte im Vergleich mit den SHR-Weibchen auf ( $p < 0,004$ ). Der systolische Blutdruck der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen ( $156,3 \pm 1,5$  mmHg) lag mit dem der SHR-Weibchen auf einem Niveau und erreichte im Vergleich mit den MWF- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen mit einer Differenz von 13,5 bzw. 13,8 mmHg einen signifikant höheren Unterschied ( $p < 0,0001$ ). Analog der 14. Woche blieben in der 24. Woche die vergleichbaren Blutdruckwerte der weiblichen MWF- und MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen signifikant unter denen der SHR-Weibchen ( $p < 0,0001$ , Abb. 13). Der systolische Blutdruck der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen steigerte sich von der 14. bis zur 24. Woche um 10,5 mmHg und blieb damit nicht nur signifikant erhöht im Vergleich mit den MWF- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen ( $p < 0,0001$ ), sondern erreichte zudem im Unterschied zur 14. Woche einen signifikant höheren Unterschied gegenüber den SHR-Weibchen ( $p < 0,005$ , Abb.13).



**Abb. 13: Systolischer Blutdruck weiblicher SHR-, SHR-6<sup>MWF</sup>-, MWF-6<sup>SHR</sup>- und MWF-Ratten in der 14. und 24. Woche**

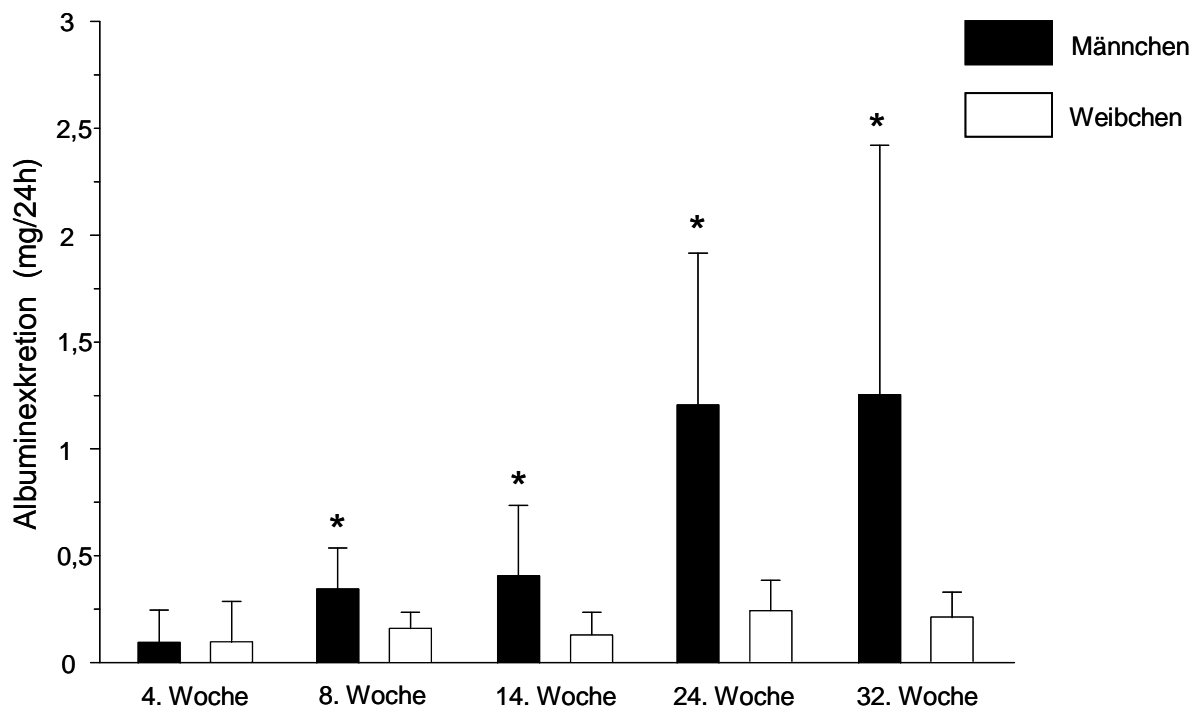
\*  $p < 0,005$  vs. MWF und MWF-6<sup>SHR</sup>

\*\*  $p < 0,005$  vs. SHR, MWF und MWF-6<sup>SHR</sup>

### 3.1.2.5 Phänotypischer Vergleich zwischen weiblichen und männlichen SHR-6<sup>MWF</sup>-Tieren

Im Geschlechtervergleich zeigten die konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen zu allen gemessenen Zeitpunkten eine stärker ausgeprägte Albuminexkretion im 24-Stundenurin gegenüber den weiblichen SHR-6<sup>MWF</sup>-Tieren.

Ab der 24. Woche konnte ein Anstieg der Albuminausscheidung bei den SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen auf über 1 mg/24h beobachtet werden, während die Weibchen bis zur 32. Woche mit einem Wert von  $0,21 \pm 0,12$  mg/24h unter dieser Grenze lagen und eine 6fach niedrigere Albuminurie gegenüber den Männchen aufwiesen ( $p < 0,0008$ , Abb. 14).

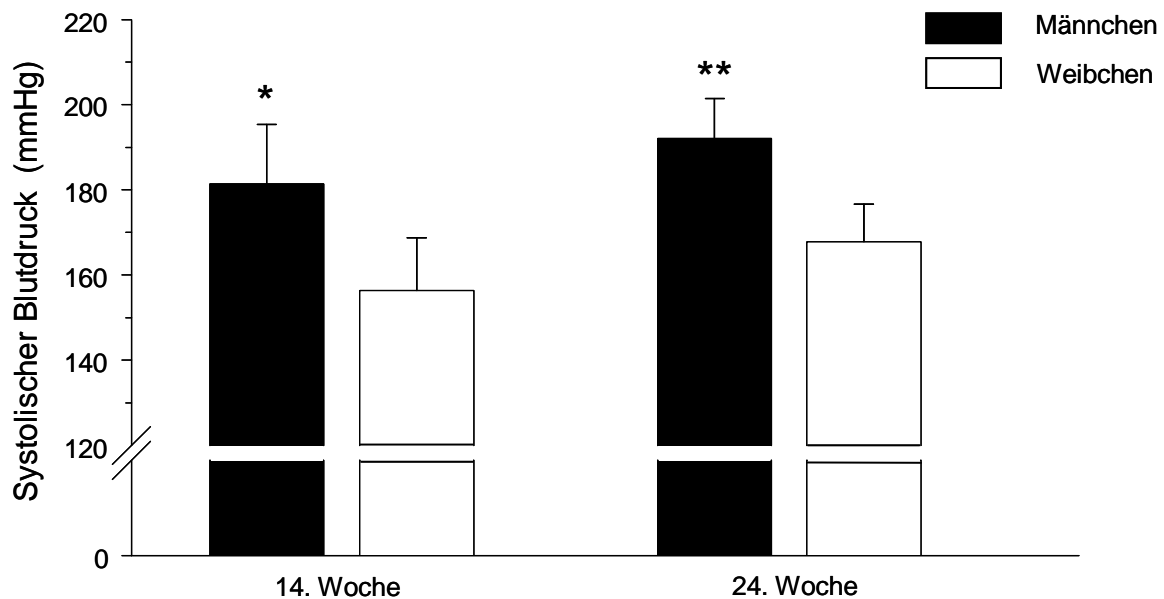


**Abb. 14: Vergleich der Albuminausscheidung zwischen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen und SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen von der 4. bis 32. Woche**

\*  $p < 0,003$  Männchen vs. Weibchen

Der Vergleich der systolischen Blutdruckwerte zwischen weiblichen und männlichen SHR-6<sup>MWF</sup>-Tieren in der 14. und 24. Woche ist in Abbildung 15 dargestellt. Der systolische Blutdruck der SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen lag zu beiden Zeitpunkten um ca. 25 mmHg höher als der Blutdruck der Weibchen und war damit jeweils signifikant unterschiedlich ( $p < 0,0006$ ). Im Verlauf stieg der Blutdruck der Männchen von der

14. bis zur 24. signifikant an ( $p < 0,02$ ), wohingegen sich der Blutdruck der Weibchen im Verlauf nicht signifikant änderte.



**Abb. 15: Vergleich der systolischen Blutdrücke zwischen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen und SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen in der 14. und 24. Woche**

\*  $p < 0,0006$  vs. Weibchen

\*\*  $p < 0,02$  vs. Weibchen und Männchen der 14. Woche

### 3.2 Kosegregations- und Kopplungsanalyse mit den Parentaltierstämmen MWF und SHR

#### 3.2.1 (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population

In der in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe durchgeführten Kopplungs- und Kosegregationsanalyse einer Backcross-Population zwischen dem MWF- und SHR-Rattenstamm konnten 8 Albuminurie-QTL identifiziert werden, wobei dem QTL auf RNO6 bereits in der 8. Woche mit einem LOD-Score von 4,3 ( $p < 0,0001$ ) und in der 24. Woche von 10,1 ( $p < 0,0001$ ) eine besondere Bedeutung zukam (Schulz *et al.*, 2003) (Abb. 16). Um diesen Albuminurie-QTL im isogenetischen Hintergrund von MWF mit einer höheren statistischen Aussagekraft zu untersuchen, wurde eine F2-Generation aus dem MWF- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm gezüchtet.

### 3.2.1.1 Phänotypische Charakterisierung der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population

Insgesamt wurde von 104 Männchen der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population die Albuminexkretion im 24-Stundenurin in der 8. Woche bestimmt und Werte zwischen 0,11 mg/24h und 53,76 mg/24h (MW 10,46±11,52 mg/24h) ermittelt (Tab. 1). Zur Identifizierung genetischer Faktoren mit einem altersabhängigen Effekt („age of onset“) wurde zudem bei 75 Männchen in der 14. Woche und nochmals bei 102 Männchen in der 24. Woche die Albuminausscheidung im 24-Stundenurin bestimmt. In der 14. Woche wurde im Mittel eine Albuminurie von 23,1±20,96 mg/24h beobachtet, wobei die Werte von 1,55 mg/24h bis 98,79 mg/24h stark streuten. In der 24. Woche konnte eine Albuminurie von 70,78±54,06 mg/24h erfasst werden, die ebenfalls mit Werten von 6,56 mg/24h bis 360,47 mg/24h stark streute.

Tab. 1: Phänotypische Charakterisierung einer männlichen (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2 Population

	Anzahl	Albuminurie (mg/24h)	Standardabweichung	Minimalwert (mg/24h)	Maximalwert (mg/24h)
8. Woche	104	10,46	11,52	0,11	53,76
14. Woche	75	23,10	20,96	1,55	98,79
24. Woche	102	70,78	54,06	6,56	360,47

### 3.2.1.2 Genotypische Charakterisierung der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population

Für die Zucht der F2-Population wurden der MWF-Parentaltierstamm und der konsome MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm miteinander verpaart. Da das Genom des konsomen Stamms bis auf das von SHR stammende RNO6 vollkommen homozygot bezüglich des MWF-Stamms war, erfolgten alle Rekombinations-Ereignisse bei der Bildung der F2-Generation ausschließlich auf RNO6, während das restliche Genom homozygot für MWF blieb. Alle F2-Männchen wurden demzufolge ausschließlich auf RNO6 mit 16 Mikrosatellitenmarkern im ungefähren Abstand von 10 cM untersucht. Dabei konnte eine nach Mendelschen Gesetzen stattfindende Aufspaltung der Genotypen im Verhältnis 1:2:1 beobachtet werden. Die F2-Tiere wiesen an den Markerpositionen entweder ein für MWF homozygotes Allel, für MWF und SHR heterozygotes Allel oder für SHR homozygotes Allel auf.

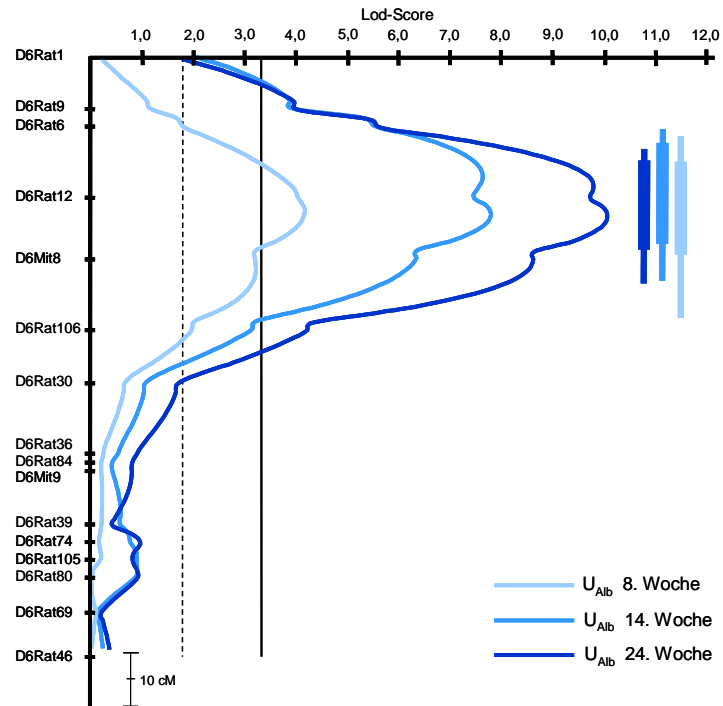


### **3.2.1.3 QTL-Kartierung auf Rattenchromosom 6 und Kopplungsanalyse der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population**

Die Auswertung der Kopplungsanalyse für RNO6 ergab in der etwa 50 cM überspannenden Chromosomenregion zwischen den Markern D6Rat9 und D6Rat30 zu den untersuchten Zeitpunkten der 8., 14. und 24. Woche signifikante Kopplungen zwischen dem Phänotyp der Albuminurie und entsprechenden Markerpositionen (Abb. 17). Der höchste LOD-Score mit einem Wert von 11,2 konnte in der 8. Woche an Markerposition D6Rat12 detektiert werden, der damit zwischen Albuminurie und Marker D6Rat12 eine hoch signifikante Kopplung beschrieb ( $p < 0,0001$ , Abb. 17). Der höchste LOD-Score der 14. Woche wurde am zum Peakmarker der 8. Woche benachbarten Marker D6Mit8 beobachtet und erreichte ebenfalls einen hoch signifikanten, aber im Vergleich zur 8. Woche niedrigeren LOD-Score von 8,6 ( $p < 0,0001$ , Abb. 17). Analog zur 14. Woche war der Peakmarker der 24. Woche ebenfalls D6Mit8, an dem der LOD-Score einen hoch signifikanten Wert von 9,8 ( $p < 0,0001$ ) erreichte und damit intermediär zwischen den maximalen LOD-Scores der 8. und 14. Woche lag (Abb. 17).

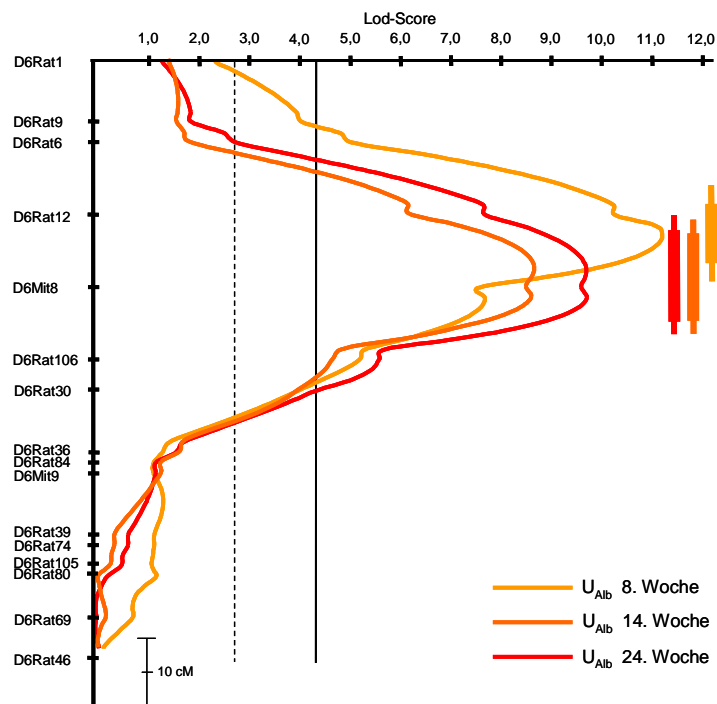
### **3.2.2 Vergleich zwischen den Kopplungsanalysen der (MWF x SHR)-Backcross- und der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population**

Bei der in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe durchgeführten Kosegregations- und Kopplungsanalyse der (MWF x SHR)-Backcross-Population konnte der Marker D6Rat12 nicht nur in der 8. Woche als Peakmarker, sondern zudem in der 14. und 24. Woche detektiert werden (Schulz *et al.*, 2003). Des Weiteren erreichte der höchste LOD-Score des Albuminurie-QTLs für 8 Wochen alte Backcross-Tiere mit einem Wert von 4,3 lediglich  $\frac{1}{3}$  des LOD-Score-Wertes, der für altersgleiche F2-Tiere nachgewiesen wurde (Abb.16). Im Unterschied zur F2-Studie stieg der LOD-Score des Albuminurie-QTLs mit zunehmendem Alter der Backcross-Tiere auf 7,8 in der 14. Woche und 10,1 in der 24. Woche an (Schulz *et al.*, 2003).



**Abb. 16: LOD-Plot von Rattenchromosom 6 für Albuminurie ( $U_{Alb}$ ) der (MWF x SHR)-Backcross-Population (Schulz et al., 2003) in der 8., 14. und 24. Woche**

Durchgezogene Linie bei LOD 3,3, signifikante Kopplung; gestrichelte Linie bei LOD 1,9, wahrscheinliche Kopplung; breite vertikale Balken, 1-LOD-Intervall; schmale vertikale Balken, 2-LOD-Intervall



**Abb. 17: LOD-Plot von Rattenchromosom 6 für Albuminurie ( $U_{Alb}$ ) der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population in der 8., 14. und 24. Woche**

Durchgezogene Linie bei LOD 4,3, signifikante Kopplung; gestrichelte Linie bei LOD 2,8, wahrscheinliche Kopplung; breite vertikale Balken, 1-LOD-Intervall; schmale vertikale Balken, 2-LOD-Intervall

Tabelle 2 gibt die Größenunterschiede der 1- bzw. 2-LOD-Intervalle in Abhängigkeit von der Kreuzungsstudie und dem Alter wieder. Im Rahmen der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population kartierte das 1-LOD-Intervall des LOD-Plots der 8. Woche um den Peakmarker D6Rat12 und überspannte eine genetische Distanz von etwa 11,0 cM, während sich das 2-LOD-Intervall über eine genetische Distanz von ca. 15,5 cM erstreckte (Abb. 17, Tab. 2). Bei der zuvor durchgeführten Kopplungsanalyse der (MWF x SHR)-Backcross-Population maß das 1-LOD-Intervall des altersentsprechenden LOD-Plots eine genetische Distanz von ungefähr 16,0 cM, während das 2-LOD-Intervall über eine Distanz von zirka 34,0 cM reichte (Abb. 16, Tab. 2). Die QTL beinhaltende Chromosomenregion konnte demzufolge durch die statistisch präzisere Kopplungsanalyse der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population für 8 Wochen alte Tiere bezüglich des 1-LOD-Intervalls um etwa 5,0 cM und hinsichtlich des 2-LOD-Intervalls sogar um ca. 18,5 cM, d.h. um etwa die Hälfte, eingengt werden. Das kleinste 1-LOD-Intervall im Rahmen der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Studie wurde mit etwa 11,0 cM anhand des LOD-Plots für 8 Wochen alte Tiere bestimmt. Das kleinste 2-LOD-Intervall mit ungefähr 15,0 cM wurde mit Hilfe des LOD-Plots für 24 Wochen alte Tiere nachgewiesen. In Bezug auf die (MWF x SHR)-Backcross-Population überspannten die 1-LOD-Intervalle zu allen Zeitpunkten eine annähernd gleiche genetische Distanz zwischen 15,5 und 16,0 cM. Das kleinste 2-LOD-Intervall mit zirka 18,0 cM wurde anhand des LOD-Plots der 24. Woche ermittelt. Der Vergleich zwischen den beiden kleinsten 1-LOD-Intervallen aus den jeweiligen Kopplungsanalysen ergab mit Hilfe der statistisch spezifischeren Kosegregations- und Kopplungsanalyse der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population für das 1-LOD-Intervall eine Größenreduktion von ca. 4,5 cM. Bezüglich der kleinsten 2-LOD-Intervalle konnte eine Größenreduktion von etwa 3,0 cM erreicht werden.

**Tab. 2: Vergleich der 1- und 2-LOD-Intervalle zwischen der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2- und (MWF x SHR)-Backcross-Population in der 8., 14. und 24. Woche**

Alter	(MWF x MWF-6 <sup>SHR</sup> )-F2-Population		(MWF x SHR)-Backcross-Population	
	1-LOD-Intervall (cM)	2-LOD-Intervall (cM)	1-LOD-Intervall (cM)	2-LOD-Intervall (cM)
8.Woche	~11,0	~15,5	~16,0	~34,0
14. Woche	~14,0	~16,0	~15,5	~26,0
24. Woche	~14,0	~15,0	~16,0	~18,0

### 3.2.3 Albuminurie der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2 in Abhängigkeit vom Genotyp am Peakmarker

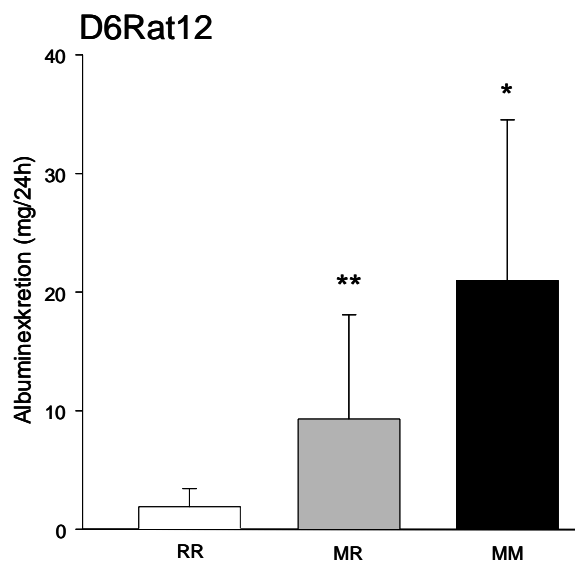
Das Vorhandensein beider MWF-Allele an Markerposition D6Rat12 führte zu einem Anstieg der Albuminurie bei 8 Wochen alten F2-Tieren. Unter dem Einfluss beider MWF-Allele zeigte sich in der 8. Woche eine signifikante Erhöhung der Albuminurie von 19,16 mg/24h im Vergleich zu den an dieser Markerposition für SHR homozygoten F2-Tieren ( $p < 0,0001$ , Abb. 18a). Am Peakmarker D6Mit8 der 14. Woche betrug die Differenz der Albuminexkretion im Urin zwischen an dieser Markerposition für MWF bzw. SHR homozygoten F2-Tieren 37,36 mg/24h und in der 24. Woche am selben Peakmarker 82,63 mg/24h ( $p < 0,0001$ , Abb. 18b, c).

**Tab. 3: Albuminurie der F2-Tiere in Abhängigkeit von Alter und Genotyp am Peakmarker**

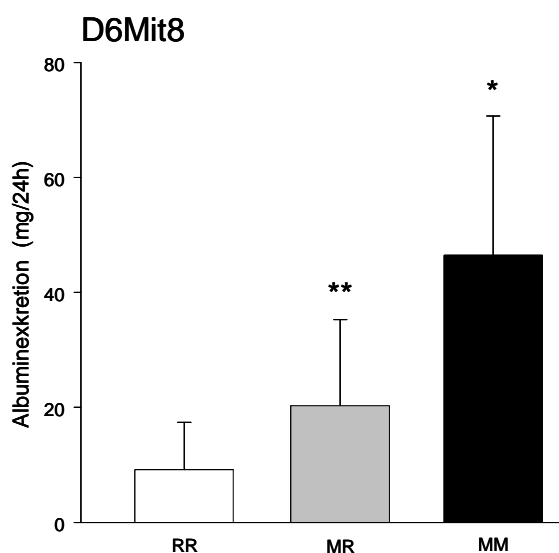
U<sub>Alb</sub>, Albuminurie; M/M, homozygot für MWF; M/R, heterozygot für MWF und SHR; R/R, homozygot für SHR; n, Anzahl der Tiere

	Peakmarker	M/M (n)	M/R (n)	R/R (n)	Max. Lod-Score
<b>8. Woche</b> U <sub>Alb</sub> (mg/24h)	D6Rat12	20,95±13,56 (27)	9,30±8,78 (51)	1,79±1,55 (25)	11,2
<b>14. Woche</b> U <sub>Alb</sub> (mg/24h)	D6Mit8	46,46±24,26 (18)	20,32±14,95 (37)	9,10±8,23 (21)	8,7
<b>24. Woche</b> U <sub>Alb</sub> (mg/24h)	D6Mit8	118,63±65,42 (24)	66,01±39,31 (49)	36,00±32,90 (28)	9,8

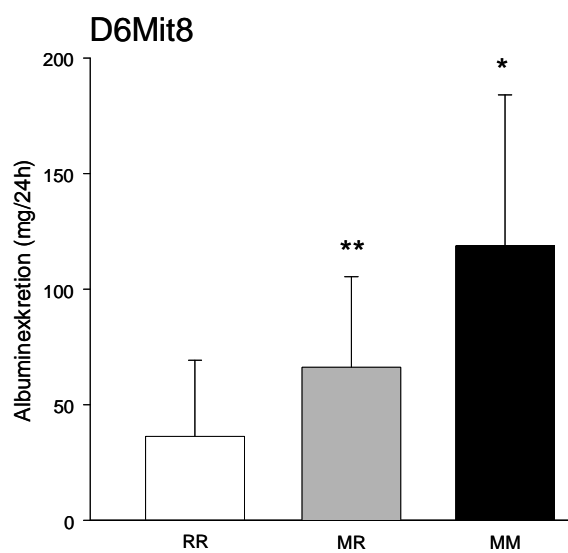
F2-Tiere mit einem für MWF homozygotem Allel am Peakmarker wiesen zu allen drei Messzeitpunkten signifikant höhere Albuminuriewerte auf als F2 Tiere mit einem am Peakmarker heterozygoten Allel für MWF und SHR ( $p < 0,004$ , Abb. 18). F2-Ratten mit einem für SHR homozygoten Allel am Peakmarker zeigten zu allen drei Messzeitpunkten die niedrigsten Albuminuriewerte. Sowohl gegenüber den F2-Ratten mit heterozygotem Allel als auch gegenüber den F2-Ratten mit homozygoten Allel für MWF am Peakmarker ergaben sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,0004$ , Abb. 18).



a) 8. Woche



b) 14. Woche



c) 24. Woche

**Abb. 18: Albuminausscheidung von (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Ratten in Abhängigkeit vom Genotyp am jeweiligen Peakmarker der a) 8., b) 14. und c) 24. Woche**

RR, homozygot für SHR; MR, heterozygot für MWF und SHR; MM, homozygot für MWF

\*p<0,004 vs. RR und MR

\*\*p<0,0004 vs. RR

### 3.3 Einengung der QTL-Region auf Rattenchromosom 6 mittels teilkongener Stämme

#### 3.3.1 Genotypische Charakterisierung teilkongener Stämme

Ausgehend vom konsomen Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> konnten in der Arbeitsgruppe sechs teilkongene Stämme etabliert werden. Als Unterschied wiesen die Stämme in der chromosomalen Region zwischen den Markern D6Rat1 und D6Rat30 auf RNO6 unterschiedlich lange von SHR stammende Chromosomenabschnitte im isogenetischen Hintergrund von MWF auf (Abb. 19b).

Die von den Markern D6Rat1 und D6Rat30 begrenzte Chromosomenregion überspannt eine genetische Distanz von ungefähr 59,7 cM und entspricht damit in etwa der Hälfte des Gesamtchromosoms (Abb. 19b). Der teilkongene Stamm MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat30) besitzt vergleichsweise zu den anderen teilkongenen Stämmen mit ca. 59,7 cM das größte chromosomale Fragment von SHR im isogenetischen Hintergrund von MWF. Ausgehend vom genetischen Marker D6Rat1 weisen die übrigen teilkongenen Stämme auf RNO6 zunehmend kleinere von SHR stammende Chromosomenabschnitte bei einem gleichzeitig zunehmenden Anteil des MWF-Genoms auf (Abb. 19b). Der teilkongene Stamm MWF.SHR-(D6Rat1) ist lediglich an der Markerposition D6Rat1 des RNO6 bezüglich des SHR-Stamms homozygot und weist für das restliche Genom eine Homozygotie für den MWF-Stamm auf.

Die Größen der chromosomalen Fragmente der einzelnen teilkongenen Stämme sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tab. 4: Genotypische Charakterisierung der teilkongenen Stämme**

Teilkongener Stamm	Größe des chromosomalen Fragments (cM)	Flankierende Marker	
MWF.SHR-(D6Rat1)		D6Rat1	
MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat6)	~12,5	D6Rat1	D6Rat6
MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat12)	~25,7	D6Rat1	D6Rat12
MWF.SHR-(D6Rat1-D6Mit8)	~36,6	D6Rat1	D6Mit8
MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat106)	~49,3	D6Rat1	D6Rat106
MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat30)	~59,7	D6Rat1	D6Rat30

Die teilkongeneten Stämme MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat12*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mit8*) unterscheiden sich zwischen den genetischen Markern D6Rat12 und D6Mit8 um ein 10,9 cM großes von SHR stammendes Chromosomenfragment (Abb. 19b). Sowohl in der Kosegregations- und Kopplungsanalyse der (MWF x SHR)-Backcross- als auch der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2- Population wurden in dieser Region die höchsten LOD-Score-Werte bezüglich der Albuminurie-QTL detektiert, womit dieser Bereich der wahrscheinlichsten QTL-Lokalisation entsprach.

### 3.3.2 Phänotypische Charakterisierung der teilkongeneten Stämme

Die männlichen Ratten der jeweiligen teilkongeneten Stämme wurden in der 8. Woche untereinander, mit den MWF- und SHR-Parentaltier- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen phänotypisch verglichen. Bei den MWF-Männchen machte sich wie unter Punkt 3.1.2.1, Abb. 8 dargestellt bereits frühzeitig in der 8. Woche eine ausgeprägte Albuminurie von  $18,1 \pm 2,0$  mg/24h bemerkbar, die bei den konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen signifikant supprimiert werden konnte ( $p < 0,0001$ , Abb. 19a) (Schulz *et al.*, 2007).

Die teilkongeneten Stämme MWF.SHR-(*D6Rat1*), MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat6*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat12*) erreichten Albuminuriewerte von  $20,51 \pm 11,75$  mg/24h bis  $34,45 \pm 11,94$  mg/24h. Im Vergleich zu MWF konnte durch den Austausch der jeweiligen Chromosomenfragmente die Albuminurie bei keinem der drei Stämme reduziert werden. Gegenüber SHR und dem konsomen Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> wiesen die drei Stämme hingegen eine signifikant höhere Albuminexkretion im 24-Stundenurin auf ( $p < 0,0001$ , Abb.19a).

Der teilkongene Stamm MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mit8*) zeigte mit  $1,57 \pm 1,17$  mg/24h eine signifikant niedrigere Albuminurie im Vergleich zu MWF ( $p < 0,0001$ ). Die Phänotypisierung der teilkongeneten MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat12*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mit8*) ergab, dass durch den Wegfall eines MWF-Chromosomenfragments von 10,9 cM die Albuminurie um das 13fache abgesenkt werden konnte ( $p < 0,0001$ , Abb. 19a, b). Der Albuminurie-QTL auf RNO6 weist entsprechend in diesem diskriminierenden Intervall zwischen den beiden Stämmen bezüglich der Albuminuriederuktion einen informativen bzw. krankmachenden DNA-Abschnitt auf. Abbildung 19 verdeutlicht die diskriminierende Differenz in der Albuminurie von

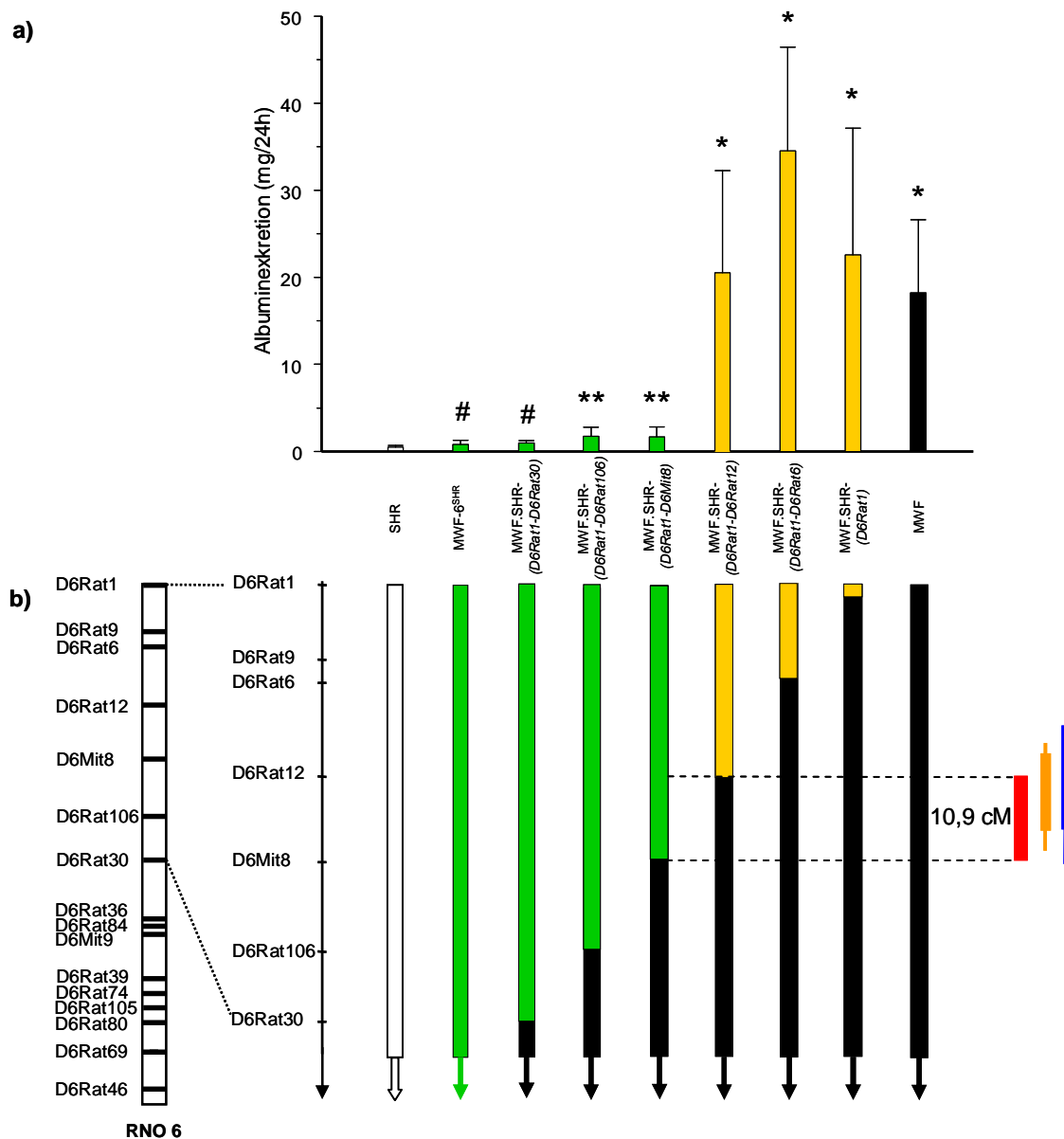
18,94 mg/24h zwischen den teilkongenenen MWF.SHR-(D6Rat1-D6Mit8) und MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat12) in Bezug auf die genotypische Charakterisierung der Stämme.

Die teilkongenenen Stämme MWF.SHR-(D6Rat1-DRat30) und MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat106) zeigten mit  $0,88 \pm 0,31$  mg/24h und  $1,67 \pm 1,04$  mg/24h eine vergleichbare Albuminurie mit MWF.SHR-(D6Rat1-D6Mit8) und damit im Vergleich zu MWF ebenfalls eine hoch signifikant reduzierte Albuminexkretion im 24-Stundenurin ( $p < 0,0001$ , Abb. 19a). Gegenüber SHR wiesen die 3 teilkongenenen Stämme eine um bis zu 1,34 mg/24h signifikant höhere Albuminurie auf ( $p < 0,01$ , Abb. 19a). Ein weiterer kleiner signifikanter Unterschied ergab sich zwischen den konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen und den teilkongenenen MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat106) und MWF.SHR-(D6Rat1-D6Mit8), die beide eine zweifach höhere Albuminurie als MWF-6<sup>SHR</sup> aufwiesen ( $p < 0,05$ ).

Im Rahmen der Kosegregations- und Kopplungsanalyse der (MWF x SHR)-Backcross- als auch der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F<sub>2</sub>- Population wurden um die Marker D6Rat12 und D6Mit8 die höchsten LOD-Score-Werte bezüglich Albuminurie und damit anhand der 1- und 2-LOD-Intervalle die wahrscheinlichste QTL-Lokalisation für Albuminurie auf RNO6 bestimmt (Abb. 16, 17). Mit Hilfe der geno- und phänotypischen Charakterisierung der teilkongenenen Stämme konnte die QTL-Lokalisation in dieser Region bestätigt werden und zwischen den Markern D6Rat12 und D6Mit8 mit einer Größe von 10,9 cM als neue QTL-Region für Albuminurie auf RNO6 definiert werden (Abb. 19).

Im Vergleich zu dem ca. 15,5 cM großem 2-LOD-Intervall der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F<sub>2</sub>- Population für 8 Wochen alte Tiere konnte zudem die QTL-Größe durch die teilkongenenen Stämme um ca. 5,6 cM weiter eingeeengt werden (Abb. 19b). Das 1-LOD-Intervall für 8 Wochen alte Tiere im Rahmen der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F<sub>2</sub>-Population wurde mit einer Größe von ca. 11,0 cM bestimmt. Im Vergleich zu dem etwa 10,9 cM messenden Chromosomensegment zwischen den Markern D6Rat12 und D6Mit8 konnte mit Hilfe der teilkongenenen Stämme keine wesentliche Größenreduktion des Albuminurie-QTLs erreicht werden, wohingegen der Albuminurie-QTL durch die Analyse der teilkongenenen Stämme präziser lokalisiert wurde (Abb. 19b).





**Abb. 19: Genotypische und phänotypische Charakterisierung teilkongener Stämme für Rattenchromosom (RNO)6 aus der Zucht MWF x SHR im Vergleich zu MWF, MWF-6<sup>SHR</sup> und SHR in der 8. Woche.**

**a)** Albuminexkretion im Urin. Im Vergleich zu MWF (schwarze Säule) konnte die Albuminurie der mit grünen Säulen illustrierten teilkongenen Stämme durch den Austausch der jeweiligen Chromosomenfragmente signifikant reduziert werden. Die mit gelben Säulen illustrierten teilkongenen Stämme zeigen hingegen eine mit MWF vergleichbare Albuminurie. Zwischen den teilkongenen MWF.SHR-(D6Rat1-D6Mit8) und MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat12) wird die hoch signifikante Albuminuriederuktion deutlich ( $p < 0,0001$ ).

\* $p < 0,0001$  vs. SHR, MWF-6<sup>SHR</sup>, MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat30), MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat106), MWF.SHR-(D6Rat1-D6Mit8); \*\* $p < 0,01$  vs. MWF-6<sup>SHR</sup>, SHR; #  $p < 0,006$  vs. SHR

**b)** Feinkartierung des Albuminurie-QTLs und physikalische Chromosomenkarte von RNO6. Die von SHR übertragenen Chromosomenabschnitte (grün) in den isogenetischen Hintergrund von MWF (schwarz) repräsentieren Chromosomensegmente mit einem Albuminurie-senkenden Effekt im Vergleich zu MWF. Die von SHR übertragenen mit gelb illustrierten Chromosomensegmente weisen hingegen keinen Albuminurie-senkenden Effekt auf. Der diskriminierende 10,9 cM große Chromosomenabschnitt (rot) zwischen den teilkongenen MWF.SHR-(D6Rat1-D6Mit8) und MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat12) beinhaltet entsprechend den informativen bzw. krankmachenden DNA-Abschnitt im Albuminurie-QTL auf RNO6. Der 10,9 cM große Chromosomenabschnitt ist vergleichend zu den 1- und 2-LOD-Intervallen der (MWF x SHR)-Backcross- (dunkelblau) und (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population (orange) illustriert.

## 4 Diskussion

Albuminurie ist ein wichtiges polygenetisch determiniertes, quantitatives Merkmal, das durch vielfältige Umweltfaktoren, genetische Faktoren und deren Interaktionen beeinflusst wird. Bereits im Bereich der Mikroalbuminurie stellt die Albuminurie einen unabhängigen Risikofaktor für das Entstehen von renalen und kardiovaskulären Erkrankungen dar (Hillege *et al.*, 2002; Arnlov *et al.*, 2005; de Zeeuw *et al.*, 2006). Vor dem Hintergrund einer steigenden Prävalenz dieser Krankheitsbilder ist die Aufklärung kausaler Pathomechanismen erforderlich. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei der Identifizierung genetischer Faktoren zu, auf deren Grundlage neue diagnostische und therapeutische Strategien entwickelt werden können. Die Detektion genetischer Faktoren polygenetisch determinierter Erkrankungen am Menschen gestaltet sich jedoch aufgrund der genetischen Heterogenität und verschiedenen Lebensgewohnheiten als eine bislang schwierige Herausforderung. Zur Umgehung dieser Problematik wurden ingezüchtete Tiermodelle mit der Ausprägung quantitativer Merkmale als genetisch determinierte Erkrankungen etabliert, bei denen Untersuchungen innerhalb eines einheitlichen Inzuchtgenoms unter besser kontrollierbaren Haltungsbedingungen durchführbar sind (Kreutz and Hubner, 2002). Die Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte repräsentiert solch ein Inzuchtrattenmodell, das neben einem Nephrondefizit und einer spontanen arteriellen Hypertonie eine gesteigerte Proteinurie und Albuminurie mit progressiver Glomerulosklerose und renaler interstitieller Fibrose entwickelt (Fassi *et al.*, 1998; Kreutz *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2007). Aufgrund dieser phänotypischen Konstellation stellt die MWF-Ratte ein interessantes Tiermodell für die Erforschung der Pathogenese von Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen dar. Zur Analyse der genetischen Grundlagen, die beim MWF-Stamm die Ausbildung einer Albuminurie bedingen, wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe die MWF-Ratte in einem Backcross-Experiment mit der SHR-Ratte als Referenzstamm untersucht (Schulz *et al.*, 2003). Im Gegensatz zum MWF-Rattenstamm entwickelt die spontan hypertensive SHR-Ratte eine physiologische Albuminurie und weist eine gesunde Nierenstruktur auf (Schulz *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2007). Vor dem Hintergrund der in beiden Stämmen gemeinsam ausgeprägten Hypertonie konnte auf diese Weise die Albuminurie als unabhängiger

Phänotyp vom arteriellen Bluthochdruck untersucht werden. In der genomweiten Kosegregations- und Kopplungsanalyse der (MWF x SHR)-Backcross-Population konnte durch die Identifizierung von insgesamt acht Albuminurie-QTL mit wahrscheinlichen und signifikanten Kopplungen auf unterschiedlichen Chromosomen der polygenetische Einfluss der Albuminurie im MWF-Modell nachgewiesen werden (Schulz *et al.*, 2003). Dem Albuminurie-QTL auf Rattenchromosom 6 (RNO6) kam durch seine große Beteiligung an der Gesamtvarianz der Albuminurie eine besondere Bedeutung zu. Zudem wurde für diesen QTL bereits bei jungen Backcross-Tieren im Alter von 8 Wochen ein signifikanter LOD-Score erreicht, der mit steigendem Alter an Signifikanz zunahm. Ein ähnlicher Effekt, wenngleich phänotypisch und statistisch schwächer ausgeprägt, konnte bereits im Rahmen einer früheren Kosegregationsanalyse in einer Backcross-Population zwischen MWF- und normotensiven, nierengesunden Lewis-Ratten beobachtet werden, die auf RNO6 einen kolokalisierten QTL für Albuminurie aufwiesen (Schulz *et al.*, 2002). Daneben wurden auch in Kosegregations- und Kopplungsanalysen zwischen salzsensitiven Dahl- und SHR-Ratten auf RNO6 mehrere kolokalisierte QTL (Poyan *et al.*, 2003; Garrett *et al.*, 2003; Siegel *et al.*, 2004; Garrett *et al.*, 2006), sowie zwischen Sabra hypertension-prone (SBH/y) und hypertension-resistent (SBN/y)-Ratten ein partiell kolokalisierter QTL für Albuminurie identifiziert (Yagil *et al.*, 2010). Die kolokalisierten bzw. partiell kolokalisierten Albuminurie-QTL auf RNO6 innerhalb des MWF- als auch des salzsensitiven Dahl-Rattengenoms könnten dabei für eine oder mehrere gemeinsame Albuminurie-regulierende Genvariante(n) sprechen, wodurch die Bedeutung des MWF Albuminurie-QTLs zusätzlich unterstrichen wird. Interessanterweise konnten kolokalisiert mit dem Albuminurie-QTL auf RNO6 innerhalb der (MWF x SHR)-Backcross-Population auch QTL für interstitielle Nierenfibrose und Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt bei ausgewachsenen Tieren im Alter von 24 Wochen nachgewiesen werden (Schulz *et al.*, 2003). Da genomweite Kopplungsanalysen auf statistischen Berechnungen beruhen, stellen die identifizierten QTL lediglich chromosomale Regionen dar, die mit einem wahrscheinlichen Maß ein oder mehrere merkmalsregulierende Gene beinhalten. Um die Existenz und den funktionellen Einfluss eines QTLs auf den zu untersuchenden Phänotyp zu bestätigen, werden in einem nächsten Schritt durch die Überführung QTL-tragender Chromosomen oder alternativ chromosomaler Fragmente zwischen zwei Stämmen konsome bzw. teilkongene Stämme gezüchtet. Konsome bzw. teilkongene Stämme können dabei auf zweierlei

Wegen generiert werden. Einerseits kann der Rattenstamm mit Ausprägung des zu untersuchenden Phänotyps als Empfänger und der Referenzstamm als Donor fungieren oder umgekehrt. Der Hauptunterschied zwischen beiden Strategien besteht im genetischen Hintergrund, in dem der QTL untersucht wird. Insgesamt bietet die Analyse konsomer Stämme in beide Richtungen eine ausführlichere experimentelle Untersuchung des QTLs, um dessen Einfluss in einem für den Phänotyp zugänglichen und andererseits resistenten genetischen Hintergrund zu evaluieren. Der Erfolg dieses methodischen Vorgehens wurde unter anderen von der Arbeitsgruppe Frantz *et al.* im Rahmen der Untersuchung Blutdruck-regulierender genetischer Faktoren bestätigt (Frantz *et al.*, 1998; Cowley, Jr. *et al.*, 2004a; Lagrange and Fournie, 2010). Durch die Übertragung eines Blutdruck-steigernden QTLs auf Rattenchromosom 1 von der hypertensiven SHR- in die normotensive Wistar Kyoto Ratte wurde bei den kongenen Tieren der Blutdruck im Vergleich zum Wistar Kyoto-Parentaltierstamm gesteigert, während bei den in reziproker Weise gezüchteten kongenen Tieren der Blutdruck im Vergleich zum SHR-Parentaltierstamm erfolgreich supprimiert wurde (Frantz *et al.*, 1998).

In diesem Sinne wurde für die Evaluation des zuvor identifizierten Albuminurie-QTLs auf RNO6 der MWF-Ratte zunächst der konsome Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> etabliert, bei dem das gesamte RNO6 der SHR-Ratte in den für Albuminurie sensitiven isogenetischen Hintergrund der MWF-Ratte überführt wurde (Schulz *et al.*, 2007). Hierbei wurde das in der konsomen Zucht häufigere Vorgehen gewählt, bei dem ein QTL beinhaltendes Chromosom durch das entsprechende Chromosom des kontrastierenden Referenzstamms ersetzt wird (Mattson *et al.*, 2007). Durch den Nachweis eines protektiven Effekts des Referenzstamms innerhalb des für den Phänotyp sensitiven Genoms versprach diese Strategie höhere Erfolgchancen, einen QTL-Effekt zu verifizieren (Rapp, 2000).

Tatsächlich ergab die Charakterisierung des konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamms, dass durch die Eliminierung eines wichtigen Albuminurie-QTLs bei der MWF-Ratte die Albuminurie konsomer MWF-6<sup>SHR</sup>-Tiere im Vergleich zum MWF-Parentaltierstamm signifikant gesenkt werden konnte (Schulz *et al.*, 2007). Dieser Effekt war bereits bei jungen konsomen Tieren im Alter von 8 Wochen nachweisbar. Bei älteren konsomen Tieren waren zusätzlich strukturelle Veränderungen wie die interstitielle Nierenfibrose im Vergleich zum MWF-Parentaltierstamm signifikant reduziert (Schulz *et al.*, 2007). Als Hauptbefund der Untersuchung des konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamms konnte die Existenz

und funktionelle Relevanz des Albuminurie-QTLs verifiziert und somit bestätigt werden (Schulz *et al.*, 2007). Die Ergebnisse belegen, dass auf RNO6 der MWF-Ratte ein oder mehrere Gene mit Einfluss auf die Albuminurie lokalisiert sind.

Ein Bestandteil dieser Arbeit war die nähere Untersuchung des Albuminurie-QTLs auf RNO6 im genetischen Hintergrund der nierengesunden SHR-Ratte. In reziproker Weise wurde hierfür der konsome SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamm mittels eines markergestützten Selektionsprotokolls generiert, jedoch mit dem Unterschied, dass diesmal der SHR-Stamm als Empfänger und der MWF-Stamm als Donor fungierten. Das gesamte RNO6 wurde vom MWF-Stamm in das für Albuminurie resistente Hintergrundgenom des SHR-Stamms überführt. Entgegen der konsomen Zucht des MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamms gilt die Verifizierung eines QTL-Effekts durch die Induzierung eines Krankheitsphänotyps innerhalb des resistenten Referenzstamms weniger erfolgversprechend (Rapp, 2000; Kreuz and Hubner, 2002). Die eindrücklichen Ergebnisse des konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamms mit vollständiger Suppression der Albuminurie rechtfertigten jedoch die weiterführende Untersuchung des Albuminurie-QTLs. Durch die Isolation vom MWF-Genom sollte der Albuminurie-QTL getestet werden, inwieweit eine Albuminurie im SHR-Hintergrundgenom induzierbar war und ob der konsome SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamm für weiterführende funktionelle Studien einsetzbar war.

Zur Überprüfung des QTL-Einflusses im genetischen Hintergrund der SHR-Ratte und zur Erfassung geschlechtsabhängiger Effekte wurden konsome Männchen getrennt von den Weibchen in einer Verlaufstudie hinsichtlich der Albuminurie und des systolischen Blutdrucks phänotypisiert und vergleichend mit den Parentaltierstämmen MWF und SHR sowie dem konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm untersucht. Zum Zeitpunkt der 4. Woche wiesen die konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen mit den Parentaltier- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen eine Albuminexkretion im 24-Stundenurin von unter 1 mg/24h auf. Signifikante Unterschiede, die zwischen den Stämmen erreicht wurden ( $p < 0,03$ ), blieben jedoch ohne Bedeutung, da im physiologischen Bereich von unter 1 mg/24h die Tiere als gesund zu betrachten sind. In der 8. Woche trat die frühzeitige Albuminurie der MWF-Männchen mit einer signifikanten Steigerung auf einen Wert von  $18,14 \pm 8,39$  mg/24h ( $p < 0,0001$ ) deutlich in Erscheinung, wohingegen die Albuminexkretion der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen in dem gegenüber MWF signifikant niedrigeren Bereich der SHR- und MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen von unter 1 mg/24h blieb ( $p < 0,0001$ ). Im Gegensatz zum reziproken konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm konnte

der frühzeitige Einfluss des Albuminurie-QTLs bei den konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen im Sinne einer Albuminurie-Steigerung im Vergleich zum SHR-Stamm nicht beobachtet werden. Im weiteren Studienverlauf bis zur 24. Woche kam es zu einem progressiven Albuminurieanstieg der MWF-Männchen auf einen Wert von 162,64±67,8 mg/24h. Interessanterweise nahm die Albuminausscheidung der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen im selben Zeitraum, trotz der Übertragung des Albuminurie-QTLs von MWF in das Hintergrundgenom von SHR, nur geringfügig bis auf einen Wert von 1,26±1,16 mg/24h zu. Während die Albuminexkretion bei 24 Wochen alten konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen um das 10fache im Vergleich zu den MWF-Männchen supprimiert war, konnte bei gleichaltrigen konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen kein Unterschied der Albuminexkretion im Vergleich zu SHR-Männchen beobachtet werden. Entgegen der Erwartung eine im Vergleich zu SHR-Männchen gesteigerte Albuminurie aufzuweisen, zeigten die konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen in der 12. und 14. Woche sogar signifikant niedrigere Albuminuriewerte als vergleichbare SHR-Männchen ( $p < 0,0003$ ). Die von MWF stammenden Albuminurie-Allele auf RNO6 schienen außerhalb des MWF-Genoms damit nicht nur neutralisiert, sondern innerhalb des SHR-Genoms sogar überkompensiert zu werden.

Der eindeutige Beweis des zuvor identifizierten Albuminurie-QTLs auf RNO6, wie er eindrucksvoll im konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm erbracht wurde, konnte im reziproken konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamm nicht gezeigt werden. Als Ursache kommen in erster Linie epistatische Effekte des genetischen Hintergrundes in Betracht, von denen die phänotypische Ausprägung des Albuminurie-QTLs abhängig zu sein scheint. Die Bedeutung genetischer Hintergrundeffekte wurde auch durch die Identifizierung unterschiedlicher Albuminurie-QTL in den beiden Kosegregations- und Kopplungsanalysen zwischen dem MWF- und Lewis- bzw. SHR-Rattenstamm gezeigt. Identifizierte Albuminurie-QTL, die in der (MWF x Lewis)- und nicht in der (MWF x SHR)-Backcross-Studie nachgewiesen wurden, waren vom spezifischen Lewis-Hintergrundgenom abhängig und umgekehrt (Schulz *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2003). Andere Ursachen für den fehlenden QTL-Nachweis im konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamm, wie die Übertragung eines zu kleinen Chromosomenfragments, welches die Albuminurie-beeinflussenden Gene nicht beinhaltet, konnte durch den Austausch eines ganzen Chromosoms ausgeschlossen werden. Der Einfluss des genetischen Hintergrundgenoms auf die Phänotypausprägung wurde durch die in der Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchung eines weiteren wichtigen Albuminurie-QTLs auf

Rattenchromosom 8 (RNO8) der MWF-Ratte unterstrichen (Schulz *et al.*, 2008a; Schulz *et al.*, 2012). Analog zu den konsomen Stämmen MWF-6<sup>SHR</sup> und SHR-6<sup>MWF</sup> wurden in reziproker Weise die konsomen Stämme MWF-8<sup>SHR</sup> und SHR-8<sup>MWF</sup> generiert. Übereinstimmend mit den Ergebnissen des konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamms konnte durch den Transfer des RNO8 vom Albuminurie-resistenten SHR-Stamm in das für Albuminurie sensitive Genom von MWF die Albuminurie im konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Stamm im Vergleich zu MWF ebenfalls signifikant supprimiert werden (Schulz *et al.*, 2008a). Die Analyse des reziproken SHR-8<sup>MWF</sup>-Stamms zeigte hingegen, dass durch die Übertragung des Albuminurie-QTLs auf MWF-RNO8 in das für Albuminurie resistente SHR-Hintergrundgenom die Albuminurie im Vergleich zu SHR gesteigert werden konnte (Schulz *et al.*, 2012). Im Gegensatz zum konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamm wurde beim konsomen SHR-8<sup>MWF</sup>-Stamm durch die Übertragung des Albuminurie-QTLs in das SHR-Hintergrundgenom direkt der Albuminurie-Phänotyp induziert (Schulz *et al.*, 2012). Das Ausbleiben der Albuminurie im konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamm ist in erster Linie durch Gen-Interaktionen innerhalb des Hintergrundgenoms erklärbar. So scheint der Albuminurie-QTL auf RNO6 zur Ausbildung seiner vollen Penetranz von synergistischen Effekten mit weiteren genetischen Faktoren des MWF-Genoms abzuhängen. Im Gegensatz dazu konnte die Untersuchung der reziproken konsomen MWF-8<sup>SHR</sup> und SHR-8<sup>MWF</sup>-Stämme zeigen, dass der Albuminurie-QTL auf RNO8 unabhängig von weiteren MWF-Allelen anderer Chromosomen den Phänotyp der Albuminurie induzieren kann (Schulz *et al.*, 2012).

Neben der Betrachtung von Genen, die einen direkten Einfluss auf die Albuminurie ausüben ist es von Bedeutung auch Gene in Betracht zu ziehen, die protektiv gegen die Entwicklung einer Albuminurie wirken und damit indirekt durch das Ausbalancieren proalbuminurischer Faktoren auf den Phänotyp der Albuminurie Einfluss nehmen. So könnte SHR-RNO6 Albuminurie-resistente Allele statt MWF-RNO6 proalbuminurische Allele beinhalten, die im konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm die signifikante Albuminuriederuktion im Vergleich zu MWF bewirken. Diese Hypothese findet durch die Ergebnisse des konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamms jedoch keine Unterstützung, da der Austausch des SHR-RNO6 durch das MWF-RNO6, d.h. Wegfall möglicher Albuminurie-resistenter Allele, keinen Einfluss auf die Albuminurie ausübte. Es sei denn, im SHR-Hintergrundgenom wirken weitere Albuminurie-resistente Allele anderer Chromosomen, die die Entstehung einer Albuminurie auch ohne die Allele auf RNO6 effektiv unterdrücken. Allerdings hätten diese Albuminurie-resistenten Allele auch die

Albuminurie im konsomen SHR-8<sup>MWF</sup>-Stamm unterdrücken müssen, sodass die Hypothese Albuminurie-resistenter Allele auf RNO6 eher unwahrscheinlich scheint. Inwieweit RNO6 von SHR Albuminurie-resistente Allele bzw. RNO6 von MWF proalbuminurische Allele beinhaltet, bleibt durch die künftige Feststellung der zugrundeliegenden molekularen Pathomechanismen der Albuminurie zu untersuchen.

Zur Klärung der Frage, inwieweit die Höhe des systolischen Blutdrucks und die Entwicklung von Nierenschädigungen einander bedingen, wurden in der 14. und 24. Woche die systolischen Blutdrücke mittels nicht invasiver Tailcuff-Methode bestimmt. Die systolischen Blutdrücke der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen waren gemeinsam mit denen der SHR-Männchen zu beiden Messzeitpunkten signifikant erhöht gegenüber den Blutdruckwerten der MWF- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen ( $p < 0,0001$ ). Interessanterweise stieg der systolische Blutdruck der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen in der 24. Woche signifikant im Vergleich zu den SHR-Parentaltiermännchen an ( $p < 0,0001$ ). Dies könnte hinweisend auf einen Blutdruck-steigernden QTL auf RNO6 der MWF-Ratte sein, der in der zuvor durchgeführten Kosegregations- und Kopplungsanalyse der (MWF x SHR)-Backcross-Population nicht identifiziert wurde (Schulz *et al.*, 2003). Dieser Befund steht jedoch nicht im Einklang mit der Untersuchung der reziproken konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen, bei denen tendenziell höhere Blutdruckwerte gegenüber den MWF-Männchen gemessen wurden und somit eher für einen Blutdruck-steigernden QTL auf RNO6 der SHR-Ratte sprechen. Erklärbar könnten diese widersprüchlichen Befunde mit der Vorstellung sein, dass durch veränderte Geninteraktionen im SHR-Hintergrundgenom Blutdruckfaktoren anderer Chromosomen stärker hervorgehoben werden und dadurch den Blutdruck der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Tiere im Vergleich zu SHR-Männchen steigern. Inwieweit Blutdruck-beeinflussende Effekte auf RNO6 der MWF- bzw. SHR-Ratte eine Rolle spielen, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen durch die Charakterisierung kongener Stämme. Zusätzlich könnten die Ergebnisse der Tailcuffmethode durch die genauere Telemetrie überprüft werden. Als wichtiger Befund bleibt jedoch festzuhalten, dass, trotz der höheren Blutdrücke der konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>- im Vergleich zu MWF- und der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>- gegenüber der SHR-Männchen, eine Albuminurie bei den konsomen Stämmen supprimiert bzw. nicht induziert werden konnte. Die Albuminurie wird damit nicht direkt durch eine Erhöhung des Blutdrucks verursacht und scheint daher unabhängig vom Blutdruck genetisch determiniert zu sein. Unterstützt



wird dieser Befund durch die Blutdruckanalyse des konsomen Stamms SHR-8<sup>MWF</sup>, bei dem ein wichtiger Albuminurie-QTL auf RNO8 in das Hintergrundgenom von SHR übertragen wurde (Schulz *et al.*, 2012). Trotz eines niedrigeren Blutdrucks verglichen mit SHR-Männchen, zeigten die konsomen SHR-8<sup>MWF</sup>-Männchen eine höhere Albuminurie als SHR (Schulz *et al.*, 2012).

Die Untersuchung der Albuminurie der weiblichen konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Tiere im Vergleich zu den Parentaltier- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen ergab eine ähnliche stammesspezifische Verteilung der Albuminuriewerte wie sie bereits bei der Untersuchung der Männchen beobachtet werden konnte. Die MWF-Weibchen zeigten Anzeichen einer Albuminurie erstmals in der 8. Woche, die sich signifikant bis zur 24. Woche auf einen Wert von über 20 mg/24h steigerte (Schulz *et al.*, 2008b). Die konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen wiesen hingegen zu allen Messzeitpunkten eine signifikant niedrigere Albuminurie als MWF-Weibchen auf, so dass auch bei ihnen, in Übereinstimmung mit den Männchen, eine Suppression der Albuminurie durch die Eliminierung des Albuminurie-QTLs auf RNO6 der MWF-Ratte nachgewiesen werden konnte (Schulz *et al.*, 2008b). Die Albuminausscheidung der reziproken konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen erreichte bis zum Endpunkt der Verlaufsstudie in der 32. Woche keine Werte über 1 mg/24h und blieb damit durchgehend auf dem Niveau der SHR-Weibchen. Der erwartete Anstieg der Albuminexkretion, begründet durch den für MWF wichtigen Albuminurie QTL im isogenetischen Hintergrund von SHR, konnte damit auch bei den konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen nicht dokumentiert werden.

Die unterschiedlich starke Ausprägung der Albuminuriewerte zwischen den konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen und -Weibchen spiegelt den in der Literatur für MWF beschriebenen sexuellen Dimorphismus wider, der bei den MWF-Männchen im Vergleich zu den Weibchen mit einer stärkeren Ausprägung und schnelleren Progression der Nephropathie im Sinne einer gesteigerten Albuminurie und interstitiellen Nierenfibrose einhergeht (Fassi *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 2008b). Zum Endpunkt der Albuminurie-Verlaufsstudie in der 32. Woche war die Albuminexkretion im Urin der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen im Vergleich zu den leicht über den physiologischen Bereich angestiegenen Werten der konsomen Männchen, signifikant um das 6fache erniedrigt ( $p < 0,0001$ ). Die Mechanismen, die zu einer mildereren Verlaufsform der Nierenschädigung bei den Weibchen im Vergleich zu den Männchen

führen, sind bislang nicht verstanden. Beide Geschlechter der MWF-Ratte weisen eine vergleichbare Reduktion der absoluten Nephronanzahl um ca. 50% im Vergleich zu normotensiven Wistar-Ratten auf (Fassi *et al.*, 1998). Dennoch schreitet die Proteinurie bei männlichen Tieren mit dem Alter schneller und ausgeprägter voran als bei den Weibchen (Schulz *et al.*, 2008b). Die verminderte Anzahl der Nephrone scheint die Weibchen daher nicht alleinig vor massiver Proteinurie und Nierenschädigung zu schützen. Im Vergleich der relativen Nephronanzahl weisen MWF-Männchen jedoch eine geringere Nephronanzahl im Verhältnis zum Körpergewicht auf als MWF-Weibchen (Fassi *et al.*, 1998). Dabei könnte das schlechtere Verhältnis zwischen Nephronanzahl und metabolischen Bedarf bei den MWF-Männchen für die ausgeprägtere Proteinurie und Glomerulosklerose im Vergleich zu den MWF-Weibchen eine Rolle spielen. Inwieweit genetische Faktoren im MWF-Modell an der Ausbildung des sexuellen Dimorphismus beteiligt sind, wurde bisher in genetischen Kopplungsanalysen, die hauptsächlich auf der Untersuchung männlicher Tiere infolge ihrer stärkeren phänotypischen Ausprägung basierten, nicht analysiert (Schulz *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2003). Die Untersuchung konsomer MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen zeigte jedoch, dass der Austausch des Albuminurie-QTLs auf RNO6 zwischen MWF und SHR nicht nur eine Suppression der Albuminurie bei männlichen konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Tieren, sondern auch bei den MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen im Vergleich zu MWF-Tieren bedingte (Schulz *et al.*, 2008b). Entsprechend konnte demonstriert werden, dass die auf RNO6 gelegenen genetischen Faktoren den frühzeitigen Beginn der Albuminurie sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen MWF-Ratten verursachen (Schulz *et al.*, 2008b). Der sexuelle Dimorphismus hingegen, der sich bei den konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen mit fortschreitendem Alter durch eine stärkere Progression der Albuminurie und Nierenschädigung als bei den konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen äußerte, lässt sich wahrscheinlich auf nicht-genetische Faktoren, wie z.B. den Einfluss eines unterschiedlichen Hormonstatus zwischen Männchen und Weibchen zurückführen (Schulz *et al.*, 2008b). Verschiedene experimentelle Tiermodelle konnten zeigen, dass Testosteron die Prognose renaler Erkrankungen verschlechtert, während Östrogene eher einen protektiven Effekt ausüben (Verhagen *et al.*, 2000; Baltatu *et al.*, 2003; Elliot *et al.*, 2007). Die genauen Mechanismen, inwiefern Geschlechtshormone in die Entstehung des sexuellen Dimorphismus eingreifen, bleiben jedoch Gegenstand zukünftiger Studien.

Die erhobenen Blutdruckwerte der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen ergaben im Vergleich mit den Parentaltier- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen eine ähnliche stammesspezifische Verteilung, wie sie bereits bei den Männchen beobachtet wurde. Zu beiden Messzeitpunkten der 14. und 24. Woche lagen die systolischen Blutdruckwerte der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen bei gleichzeitig signifikant niedrigeren Werten der Albuminexkretion im 24-Stundenurin signifikant über den Werten der MWF- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen ( $p < 0,0001$ ). In Übereinstimmung mit den Befunden der Männchen konnten demnach auch bei den Weibchen die Blutdruckunterschiede nicht als Erklärung für die Entstehung der Albuminurie verantwortlich gemacht werden und stehen damit im Einklang mit den Daten genetischer Analysen, denen zufolge die Albuminurie unabhängig vom arteriellen Blutdruck determiniert zu sein scheint (Schulz *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2003). Die Blutdrucksteigerung von der 14. bis zur 24. Woche der konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen mit Erreichen eines signifikanten Unterschiedes gegenüber den SHR-Weibchen ( $p < 0,005$ ) unterstreicht die bereits bei den Männchen beobachtete Annahme eines Blutdruck-steigernden QTLs auf RNO6 der MWF-Ratte, bleibt jedoch Gegenstand weiterer Untersuchungen. Insgesamt sind die Blutdrücke der weiblichen SHR-6<sup>MWF</sup>-Ratten im Sinne eines sexuellen Dimorphismus niedriger ausgeprägt als bei den Männchen, ebenso wie die Blutdrücke der MWF-, MWF-6<sup>SHR</sup> und SHR-Weibchen niedriger sind als bei den entsprechenden Männchen der jeweiligen Stämme (Schulz *et al.*, 2008b). Trotz der unabhängigen genetischen Determination der Albuminurie vom arteriellen Blutdruck, ist der Einfluss niedrigerer Blutdrücke auf die gleichzeitig verminderte Albuminurie der Weibchen im Vergleich zu den Männchen zwangsläufig nicht ausgeschlossen.

Im Gegensatz zum konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm (Schulz *et al.*, 2007) konnte in der vorliegenden Arbeit die funktionelle Relevanz des zuvor in der Kopplungsanalyse der (MWF x SHR)-Backcross-Population identifizierten Albuminurie-QTLs auf RNO6 der MWF-Ratte (Schulz *et al.*, 2003) nicht durch die Charakterisierung des reziproken konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamms verifiziert werden. Der experimentelle Nachweis des Albuminurie-QTLs auf RNO6 der MWF-Ratte sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Tieren (Schulz *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 2008b) belegte jedoch eindeutig die Relevanz des QTLs und rechtfertigte die weiterführende Untersuchung des Albuminurie-QTLs, mit dem Ziel die genetischen Grundlagen der

frühzeitigen Entstehung und Progression der Albuminurie im MWF-Modell zu identifizieren. Zur weiteren Evaluation des Albuminurie-QTLs auf RNO6 der MWF-Ratte wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgehend vom konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm eine weitere Kosegregations- und Kopplungsanalyse durchgeführt. Im Gegensatz zur in der Arbeitsgruppe bereits erfolgten Kosegregations- und Kopplungsanalyse der (MWF x SHR)-Backcross-Population (Schulz *et al.*, 2003) sollte diesmal jedoch ausschließlich der QTL auf RNO6 in einem für MWF einheitlicheren Hintergrundgenom und im Rahmen einer F2-Population untersucht werden.

Mit Hilfe von genetischen Kosegregations- und Kopplungsanalysen zwischen zwei sich im Phänotyp kontrastierenden Inzuchtstämmen ist es möglich, Regionen im Genom zu identifizieren, die für polygenetische Erkrankungen kodieren (Rapp, 2000; Cowley, Jr. *et al.*, 2004b). Auf Grund der phäno- und genotypischen Untersuchung großer F2- bzw. Backcross-Populationen, die notwendig ist, um eine ausreichend große statistische Aussagekraft für die Identifizierung von QTL-Regionen zu erreichen, stellen sie jedoch einen zeit- und arbeitsaufwendigen Prozess dar. Die statistische Aussagekraft dieser Studien ist, selbst unter gut kontrollierten Studienbedingungen, in erster Linie durch die genetische Heterogenität der einzelnen F2- bzw. Backcross-Tiere limitiert, wodurch insbesondere schwache Geneffekte modifiziert oder supprimiert werden können (Cowley, Jr. *et al.*, 2004b). Ein Beispiel zeigt eine von Cowley *et al.* durchgeführte Kosegregations- und Kopplungsanalyse zwischen salzsensitiven Dahl- und Brown Norway-Ratten, die im Gegensatz zu früheren genetischen Studien (Rapp *et al.*, 1989; St Lezin *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997) keinen QTL für arterielle Hypertonie auf Rattenchromosom 13 nachweisen konnte (Cowley, Jr. *et al.*, 2000). Dennoch zeigten konsome Tiere, bei denen das Rattenchromosom 13 von der Brown Norway-Ratte in den genetischen Hintergrund der salzsensitiven Dahl Ratte überführt wurde, einen protektiven Effekt gegenüber Hypertonie und Nephropathie, was für ein oder mehrere Gene auf Rattenchromosom 13 spricht, die an der Ausbildung einer Hypertonie und Nephropathie beteiligt sein könnten (Cowley, Jr. *et al.*, 2001). Diese Arbeit unterstreicht die Problematik heterogener Hintergrundgenome einzelner F2- bzw. Backcross-Tiere, die im Rahmen traditioneller Kosegregations- und Kopplungsanalysen Effekte antihypertensiver und nephroprotektiver Allele innerhalb eines Chromosoms verdecken können. Mit Hilfe konsomer Stämme hingegen können Störeffekte, die durch ein heterogenes Hintergrundgenom bedingt sind, vermieden werden und auch QTL mit schwacher Ausprägung identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Albuminurie-QTL auf RNO6 der MWF-Ratte daher in einer Kosegregations- und Kopplungsanalyse innerhalb eines statistisch aussagekräftigeren Hintergrundgenoms weiter evaluiert werden. Hierfür wurden die Stämme MWF und MWF-6<sup>SHR</sup> ausgewählt, die im Gegensatz zur bereits durchgeführten Kosegregations- und Kopplungsuntersuchung bei MWF und Lewis bzw. MWF und SHR nicht innerhalb einer Backcross-Population (Schulz *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2003), sondern innerhalb einer F2-Population untersucht wurden. Begründet wurde die Wahl des Kreuzungsschemas vor allem durch die Befunde der Albuminurie einer (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F1-Population, bei denen ein „Gen-Dosis-Effekt“ nachgewiesen werden konnte (Schulz *et al.*, 2007). Konsome F1-Tiere, die bei einem für MWF homozygoten Hintergrundgenom ein für SHR und MWF heterozygotes Allel für RNO6 aufwiesen, zeigten eine signifikant höhere Albuminausscheidung im Urin als F1-Tiere mit einem für SHR homozygoten Allel und signifikant niedrigere Albuminuriewerte als MWF-Parentaltiere (Schulz *et al.*, 2007). Ein Allel von SHR schien damit die Albuminurie des MWF-Stamms zu stören, während erst das Vorhandensein beider SHR Allele in der Lage war, die Albuminurie vollständig zu supprimieren. Der Albuminurie-QTL auf RNO6 unterlag somit keinem rezessiven Vererbungsmodus und stand damit nicht im Einklang anderer Untersuchungen, die einen rezessiven Erbgang der Albuminurie im MWF-Modell zeigten (Murayama *et al.*, 1998; Shiozawa *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2002). Die Analyse einer aus MWF- und normotensiven, nierengesunden Lewis-Ratten hervorgehenden F1-Generation beispielsweise ergab eine vergleichbare Albuminausscheidung mit den Lewis-Parentaltieren und verwies so auf einen rezessiven Vererbungsmodus der Albuminurie (Schulz *et al.*, 2002). Die Untersuchung eines Phänotyps mit rezessivem Vererbungsmodus lässt sich im Rahmen einer Kosegregations- und Kopplungsanalyse mit Hilfe einer Backcross-Population statistisch aussagekräftiger untersuchen. Durch die zu erwartende Genotypenaufspaltung im Verhältnis 1:1 homozygoter vs. heterozygoter Individuen lässt sich durch eine Backcross-Population eine höhere Anzahl homozygoter Genotypen in Abhängigkeit vom Phänotyp untersuchen als in einer F2-Population. Vor dem Hintergrund eines kodominanten Vererbungsmodus sollte das Verhalten des Albuminurie-QTLs auf RNO6 innerhalb dieser Kosegregations- und Kopplungsanalyse in Abhängigkeit von einer F2-Population untersucht werden, die eine Genotypenaufspaltung im Verhältnis 1:2:1 erwarten ließ

Eine im Vorfeld wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung der Kosegregations- und Kopplungsanalyse im Rahmen dieser Arbeit war die von Schulz *et al.* durchgeführte phänotypische Charakterisierung des MWF- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamms mit Nachweis eines hochsignifikanten phänotypischen Unterschiedes bezüglich ihrer Albuminurie (Schulz *et al.*, 2007).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die Zucht der F2-Population der konsome MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm mit dem albuminurischen MWF-Parentaltierstamm gekreuzt und F1-Nachkommen Bruder-Schwester-verpaart. Da das Genom bis auf das zu untersuchende RNO6 während der Kreuzungen im homozygoten Status fixiert blieb, erfolgten alle für die Kopplungsanalyse benötigten Rekombinations-Ereignisse ausschließlich auf dem zu untersuchenden RNO6. Die statistische Aussagekraft jeder einzelnen F2-Ratte im Rahmen dieser Kopplungsanalyse gewann dadurch an Bedeutung, da die Heterozygotie der übrigen Chromosomen im Genom entfiel, die normalerweise die Sensitivität traditioneller Kopplungsanalysen reduziert. Infolge dessen bestand die Möglichkeit, den Albuminurie-QTL innerhalb dieser Kopplungsanalyse nicht nur mit stärkerer Ausprägung, sondern auch präziser zu kartieren.

Bei der phänotypischen Charakterisierung der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Generation beschränkte sich die Untersuchung analog der vorherigen Kosegregations- und Kopplungsanalyse der (MWF x SHR)-Backcross-Population (Schulz *et al.*, 2003) auf die Männchen, die auf Grund des sexuellen Dimorphismus eine stärkere Ausprägung der Albuminurie aufwiesen als die Weibchen und daher mit einer höheren statistischen Sensitivität zu bewerten waren. Insgesamt wurden 105 Männchen bezüglich der Albuminurie im 24-Stundenurin in der 8., 14. und 24. Woche phänotypisiert, um durch unterschiedliche Messzeitpunkte auch altersabhängige genetische Effekte zu evaluieren. Die Mittel- und Maximalwerte der Albuminurie untersuchter F2-Tiere waren erwartungsgemäß mit dem Alter ansteigend. Zudem wies die Albuminurie zu allen Messzeitpunkten eine starke Streuung unter den F2-Tieren auf. Für 24 Wochen alte F2-Tiere beispielsweise reichten die Albuminuriewerte von 6,56 bis 360,47 mg/24h. Eine Erklärung für diese Beobachtung lieferte die Untersuchung der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp am jeweiligen Peakmarker. Die Albuminurie acht Wochen alter Tiere in Abhängigkeit vom Genotyp am Peakmarker D6Rat12 ergab für F2-Tiere mit heterozygotem Allel eine signifikant höhere Albuminurie als für F2-Tiere mit einem für SHR homozygoten Allel und eine signifikant niedrigere Albuminurie als für F2-Tiere

mit einem für MWF homozygoten Allel. Ein analoger Befund konnte für 14 und 24 Wochen alte F<sub>2</sub>-Tiere am genetischen Peakmarker D6Mit8 nachgewiesen werden. Die Zunahme protektiver SHR-Allele auf RNO6 ging dementsprechend mit einer Abnahme der Albuminurie einher, während die Anreicherung von MWF-Allelen auf RNO6 eine gesteigerte Albuminurie in Richtung des MWF-Parentaltierstamms bedeutete. Die Untersuchung der Genotypen an den jeweiligen in der 8., 14. und 24. Woche identifizierten Peakmarkern ergab in etwa eine nach Mendel für eine F<sub>2</sub>-Population postulierte Genotypenaufspaltung im Verhältnis 1:2:1, d.h. etwa  $\frac{1}{4}$  der Tiere wiesen für MWF bzw. SHR ein homozygotes und etwa die Hälfte der Tiere ein für MWF und SHR heterozygoten Allel am jeweiligen Peakmarker auf. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Albuminurie der F<sub>2</sub>-Tiere sprach diese Beobachtung für einen kodominanten Vererbungsmodus der Albuminurie auf RNO6 und stand damit im Einklang mit der oben beschriebenen Untersuchung der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F<sub>1</sub>-Population (Schulz 2007), wodurch die Hypothese eines kodominanten Vererbungsmodus des Albuminurie-QTLs auf RNO6 erhärtet wurde. Eine besondere Stellung des RNO6 konnte zusätzlich bei der phänotypischen Untersuchung eines in der Kopplungsanalyse einer F<sub>2</sub>-Generation zwischen salzsensitiven Dahl- und SHR-Ratten identifizierten Albuminurie-QTLs auf RNO6 dokumentiert werden. Als einziger von insgesamt 8 identifizierten QTL wies dieser keinen rezessiven, sondern kodominanten Vererbungsmodus auf (Poyan *et al.*, 2003). Diese Befunde legen unterschiedliche Vererbungsmodalitäten verschiedener Gen-Loci mit einem gemeinsamen Einfluss auf denselben Phänotyp nahe, wodurch die Bedeutung der Albuminurie als komplex polygenetisch determiniertes Merkmal unterstrichen wird.

Die Auswertung der Kopplungsanalyse der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F<sub>2</sub>-Population ergab den am stärksten ausgeprägten QTL für Albuminurie mit einem hochsignifikanten LOD-Score von 11,2 für 8 Wochen alte F<sub>2</sub>-Tiere im Bereich des genetischen Peakmarkers D6Rat12. Bei 14 Wochen alten F<sub>2</sub>-Tieren ergab sich ebenfalls ein signifikanter LOD-Score mit einem Wert von 8,6, der im Gegensatz zu F<sub>2</sub>-Tieren der 8. Woche um den benachbarten Marker D6Mit8 kartierte. Der LOD-Score des Albuminurie-QTLs für 24 Wochen alte F<sub>2</sub>-Tiere erreichte einen signifikanten Wert von 9,8 und war ebenfalls am Peakmarker D6Mit8 lokalisiert. Interessanterweise zeigte sich bei der ursprünglichen Kopplungsanalyse der (MWF x SHR)-Backcross-Population eine andere altersabhängige Verteilung der LOD-Score-Werte (Schulz *et al.*, 2003). 8 Wochen alte

Backcross-Tiere wiesen im Gegensatz zu altersgleichen F2-Tieren dieser Kopplungsanalyse einen weitaus kleiner ausgeprägten Albuminurie-QTL mit einem LOD-Score von 4,3 auf, der sich mit zunehmendem Alter der Backcross-Tiere kontinuierlich auf einen LOD-Score von 7,8 bei 14 Wochen alten Tieren bzw. 10,1 bei 24. Wochen alten Tieren im Sinne eines age of onset-Effekts steigerte. Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Kopplungsanalysen bestand in der Konstanz des Peakmarkers D6Rat12 zu allen drei Messzeitpunkten bei der (MWF x SHR)-Backcross-Population (Schulz *et al.*, 2003).

Bei der Befundinterpretation der Kopplungsanalyse der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population könnte der Albuminurie-QTL 8 Wochen alter F2-Tiere im Bereich des Peakmarkers D6Rat12 auf genetische Einflüsse hinweisen, die an einer frühzeitigen Ausbildung der Albuminurie im MWF-Rattenmodell beteiligt sein könnten. Dies würde auch die bereits frühzeitige und ausgeprägte Suppression der Albuminurie bei noch jungen konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Tieren im Vergleich zum MWF-Stamm erklären (Schulz *et al.*, 2007). Die Albuminurie-QTL der 14. und 24. Woche mit einer im Vergleich zur 8. Woche unterschiedlichen Lokalisation am Peakmarker D6Mit8 könnten hingegen auf genetische Faktoren deuten, die an der Aufrechterhaltung und Progression der Albuminurie zu späteren Lebenszeitpunkten eine Rolle spielen, während die Geneffekte des Albuminurie-QTLs der 8. Woche vielmehr an der Entstehung der Albuminurie beteiligt sein könnten. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die QTL-Kartierung im Rahmen von Kopplungsanalysen lediglich auf statistischen Auswertungen basiert und auf Grund dessen bei der zukünftigen Charakterisierung teilkongener Stämme zu prüfen bleibt, ob die unterschiedliche Kartierung der Peakmarker zu verschiedenen Messzeitpunkten tatsächlich auf veränderte Geneffekte zurückzuführen oder durch Methoden-abhängige Schwankungen verursacht wurde. Letztlich unterstreichen diese Befunde die Relevanz altersabhängiger Geneffekte, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten an- oder abgeschaltet werden bzw. Divergenzen in ihrer Genaktivität aufweisen (Age of onset Effekte).

Nach der Identifizierung einer chromosomalen Region mit Einfluss auf den Phänotyp, gibt der maximale Ausschlag der LOD-Kurve einen Anhalt für die wahrscheinlichste Lokalisation des QTLs (Rapp, 2000). Zur weiteren Eingrenzung der QTL-Region werden Konfidenzintervalle definiert. Das 1-LOD-Intervall bzw. 95%-Konfidenzintervall gibt eine Wahrscheinlichkeit von 60-95% an, mit der ein QTL in der entsprechenden chromosomalen Region beinhaltet ist (Rapp, 2000). Für QTL mit einem geringen



Einfluss auf den Phänotyp bietet das längere 2-LOD-Intervall eine größere Sicherheit, in der entsprechenden Chromosomenregion lokalisiert zu sein. Im Rahmen der Kopplungsanalyse der (MWF x SHR)-Backcross-Population überspannte das 2-LOD-Intervall der am stärksten ausgeprägten LOD-Kurve der 24. Woche eine genetische Distanz von ca. 18 cM. Eine genetische Distanz von 20-35 cM beinhaltet in etwa 4 bis  $6 \times 10^7$  Basenpaare DNA und kodiert für 800 bis 1200 Gene des Rattengenoms (Kreutz and Hubner, 2002). Die Identifizierung konkreter Albuminurie-regulierender Gene in dem etwa 18 cM großen 2-LOD-Intervall ist daher langwierig und nahezu unmöglich. Ziel ist die Einengung der QTL-Region auf eine genetische Distanz von ca. 1 cM, einem Chromosomenbereich, der mit ca.  $2 \times 10^6$  Basenpaaren klein genug ist, eine effektive Suche nach spezifischen Genen zu ermöglichen (Kreutz and Hubner, 2002).

Die Untersuchung des Albuminurie-QTLs auf RNO6 innerhalb der statistisch aussagekräftigeren (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population konnte als Ergebnis nicht nur den zuvor identifizierten Albuminurie-QTL auf RNO6 verifizieren, sondern stellte sich zusätzlich als praktikable Methode heraus, die QTL-Region über einen engeren chromosomalen Bereich zu kartieren. Bei 8 Wochen alten (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Tieren konnte im Vergleich zu altersgleichen (MWF x SHR)-Backcross-Tieren das 2-LOD-Intervall etwa halbiert und das 1-LOD-Intervall von 16 auf 11 cM verkleinert werden.

Wenngleich mit der Kosegregations- und Kopplungsanalyse der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population eine Eingrenzung der QTL-Region erzielt werden konnte, stellt die Größe des 2-LOD-Intervalls mit ca. 15 cM weiterhin einen unübersichtlichen Bereich für die Identifizierung spezifischer krankheitsregulierender Gene dar.

Auf dem Weg zur weiteren Eingrenzung der QTL-Region kommt als nächster Schritt die Charakterisierung teilkongener Stämme zur Anwendung. Ausgehend vom konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm wurden im Rahmen der teilkongen Zucht zunehmend kleinere Fragmente des SHR-Stamms in den isogenetischen Hintergrund des MWF-Stamms überführt. Die Substitution chromosomaler Fragmente erfolgte dabei überlappend, um über die Phänotypisierung der teilkongen Stämme Chromosomenregionen zu identifizieren, die Albuminurie-regulierende Gene beinhalten.

Je größer das substituierte Fragment, desto größer ist die Anzahl potentieller Gene, die einen Einfluss auf den Phänotyp ausüben könnten. Andererseits benötigt ein zunehmend kleineres kongenes Intervall eine größere Dichte genetischer Marker, die

zwischen den Stämmen polymorph ausgeprägt sein müssen. Ein kleiner werdendes Chromosomenfragment bedeutet des Weiteren eine schwierigere Suche nach Individuen mit passenden Rekombinations-Ereignissen für die Generierung neuer teilkongener Linien, so dass zum Teil hunderte von Tieren genotypisiert werden müssen, um für die Etablierung neuer teilkongener Linien passende Allelverteilungen zu identifizieren.

Der Erfolg dieses arbeits- und zeitaufwendigen Prozesses konnte von Rangel-Filho *et al.* durch die Identifizierung des Rab38-Gens gezeigt werden (Rangel-Filho *et al.*, 2005). Ausgehend von Kosegregations- und Kopplungsanalysen konnten bei der Fawn-hooded hypertensiven (FHH)-Ratte 5 QTL, benannt als Rf-1 bis Rf-5, mit Einfluss auf die Entstehung einer Proteinurie, Albuminurie oder/und fokalen Glomerulosklerose identifiziert werden (Brown *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1998). Mit Hilfe kongener Stämme, bei denen unterschiedlich große chromosomale Segmente der nierengesunden Brown Norway-Ratte in den isogenetischen Hintergrund der FHH-Ratte überführt wurden, konnte die ursprüngliche Rf-2 Region auf eine lediglich 8 Gene beinhaltende Region eingeeengt und erstmals das Gen Rab38 für die Entwicklung der Proteinurie und Albuminurie in einem Tiermodell nachgewiesen werden (Rangel-Filho *et al.*, 2005). Eine Mutation im Startkodon des Rab38-Gens scheint bei der FHH-Ratte an einer Fehlfunktion proximaler Tubuluszellen beteiligt zu sein (Rangel-Filho *et al.*, 2005). Durch eine gestörte Reabsorption bzw. einen fehlerhaften Abbau von filtriertem Albumin und Protein im proximalen Tubulus kommt es daher zu einer vermehrten Albuminurie bzw. Proteinurie.

Ausgehend vom konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm konnten in der chromosomalen Region zwischen den Markern D6Rat1 und D6Rat30 sechs teilkongene Stämme mit zunehmend kleineren vom SHR-Stamm übertragenen chromosomalen Fragmenten etabliert werden. Im Rahmen der phänotypischen Charakterisierung der teilkongenen Stämme wurde die Albuminurie teilkongener Männchen im Alter von 8 Wochen untereinander und mit altersentsprechenden MWF- und SHR-Parentaltier- sowie konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen vergleichend analysiert (Schulz *et al.*, 2007). Der teilkongene Stamm MWF.SHR-(D6Rat1-D6Rat30) mit dem größten chromosomalen Fragment von SHR im isogenetischen Hintergrund von MWF wies eine vergleichbare Albuminurie mit konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen auf. Durch die Übertragung des zwischen den Markern D6Rat1 und D6Rat30 gelegenen QTL-Bereichs konnte

demzufolge eine weiterhin bestehende vollständige Suppression der Albuminurie bei teilkongenem MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat30*)-Männchen im Vergleich zu MWF nachgewiesen werden. Als Ausgangspunkt für die nachfolgende Zucht teilkongener Stämme mit zunehmend kleineren Chromosomenfragmenten von SHR im MWF-Genom, wurde auf diese Weise die vollständige Überführung der Albuminurie-regulierenden Gene nachweislich garantiert.

Eine besondere Beachtung galt den teilkongenem Stämmen MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat12*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mit8*), die sich zwischen den genetischen Markern *D6Rat12* und *D6Mit8* um ein 10,9 cM großes von SHR stammendes Chromosomenfragment unterschieden. In beiden Kosegregations- und Kopplungsanalysen der (MWF x SHR)-Backcross- und der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F<sub>2</sub>-Population wurden in dieser Region die höchsten LOD-Score-Werte bezüglich des Albuminurie-QTLs detektiert, womit dieser Bereich der wahrscheinlichsten QTL-Lokalisation entsprach. Interessanterweise konnte zwischen den teilkongenem MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat12*) und MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mit8*) durch den Wegfall eines 10,9 cM großen von MWF stammenden Chromosomenfragments die Albuminurie signifikant um das 13fache supprimiert werden ( $p < 0,0001$ ). MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat12*) wies dabei eine mit MWF vergleichbare Albuminurie auf, wohingegen die Albuminurie von MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mit8*) im Vergleich zum MWF-Parentaltierstamm signifikant reduziert war ( $p < 0,0001$ ). Durch die Zunahme Albuminurie-protektiver Allele von SHR bzw. durch die Abnahme proalbuminurischer Allele von MWF innerhalb des 10,9 cM großen Chromosomenabschnitts konnte bei den teilkongenem MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mit8*) die Albuminurie im Vergleich zu den teilkongenem MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Rat12*) signifikant reduziert werden. Entsprechend weist der Albuminurie-QTL auf RNO6 innerhalb des diskriminierenden Intervalls zwischen den Markern *D6Rat12* und *D6Mit8* einen krankmachenden DNA-Abschnitt auf, der Albuminurie-regulierende genetische Faktoren beinhaltet.

Die phänotypische Untersuchung der teilkongenem Stämme ergab darüber hinaus eine signifikant niedrigere Albuminurie des konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamms im Vergleich zu den teilkongenem Stämmen MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mit8*) und SHR-(*D6Rat1-D6Rat106*) ( $p < 0,05$ ). Mit einer Differenz von bis zu 0,96 mg/24h wiesen die beiden teilkongenem Stämme eine zweifach höhere Albuminurie im Vergleich zum konsomen Stamm MWF-6<sup>SHR</sup> auf. Bei den teilkongenem MWF.SHR-(*D6Rat1-D6Mit8*) und SHR-(*D6Rat1-D6Rat106*) könnten dabei weitere proalbuminurische MWF-Allele auf RNO6 wirken, die

die höhere Albuminurie im Vergleich zum konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm bedingen. Inwieweit der geringe phänotypische Unterschied tatsächlich auf mögliche proalbuminurische MWF-Allele oder lediglich auf methodenabhängige Messschwankungen zurückzuführen ist, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Sowohl in der Kosegregations- und Kopplungsanalyse der (MWF x SHR)-Backcross- als auch der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F<sub>2</sub>- Population wurde im Bereich der Marker D6Rat12 und D6Mit8 die wahrscheinlichste QTL-Lokalisation für Albuminurie auf RNO6 mit Hilfe der 1- und 2-LOD-Intervalle ermittelt. Durch die geno- und phänotypische Analyse der teilkongenen Stämme konnte die QTL-Lokalisation zwischen den Markern D6Rat12 und D6Mit8 bestätigt werden. Darüber hinaus gelang es, mit Hilfe der Analyse der teilkongenen Stämme die Größe des Albuminurie-QTLs weiter einzuengen. Im Vergleich zum ca. 15,5 cM großen 2-LOD-Intervall der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F<sub>2</sub>- Population für 8 Wochen alte Tiere konnte der Albuminurie-QTL durch die teilkongenen Stämme auf eine Größe von 10,9 cM verkleinert werden. Im Vergleich zum 1-LOD-Intervall der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F<sub>2</sub>-Population, das eine Größe von ca. 11,0 cM aufwies, wurde durch die teilkongenen Stämme keine weitere nennenswerte Größenreduktion des Albuminurie-QTLs erreicht. Als entscheidender Vorteil gegenüber der Kosegregations- und Kopplungsanalyse, die lediglich auf statistischen Berechnungen beruht, konnte der Albuminurie-QTL mit Hilfe der teilkongenen Stämme jedoch konfirmiert und präzise zwischen den Markern D6Rat12 und D6Mit8 kartiert werden.

Als herausragender Befund wurde durch die Charakterisierung teilkongener Stämme gezeigt, dass in dem 10,9 cM großen DNA-Abschnitt auf RNO6 des MWF-Genoms zwischen den genetischen Markern D6Rat12 und D6Mit8 mindestens ein oder mehrere Gene lokalisiert sind, die mit einem starken Effekt die Ausprägung der Albuminurie im MWF-Rattenmodell regulieren. Wo genau sich die Albuminurie-regulierenden Gene innerhalb des 10,9 cM großen DNA-Abschnitts befinden bleibt Gegenstand der zukünftigen Charakterisierung weiterer teilkongener Linien. Durch die Übertragung zunehmend kleinerer chromosomaler Fragmente und über die Phänotypisierung neu zu etablierender subkongener Stämme, die das teilkongene informative Intervall weiter einengen, ist es das Ziel, den 10,9 cM großen DNA-Bereich auf eine Größe kleiner 1 cM einzugrenzen, um den Grundstein für eine effiziente Suche nach spezifischen Albuminurie-regulierenden Genen zu legen.

Über vergleichende Kartierungsmethoden (Stoll *et al.*, 2000) zwischen dem Rattengenom und dem humanen Genom konnte der Albuminurie-QTL auf RNO6 der MWF-Ratte dem humanen Chromosom 14q24 zugeordnet werden (Schulz *et al.*, 2003). Die genaue Lokalisation des 99-95% Konfidenzintervalls des Albuminurie-QTLs, welches in der Kosegregations- und Kopplungsanalyse der (MWF x SHR)-Backcross-Population identifiziert wurde, entspricht der Region des humanen Chromosoms 14q23.1 - 14q31.3 (Schulz *et al.*, 2007). Bisher konnten in dieser Region des humanen Genoms keine Albuminurie-QTL detektiert werden. Dennoch ist die potentielle Relevanz dieser Region nicht auszuschließen in Anbetracht der komplex polygenetischen Determination der Albuminurie im humanen Genom, dessen Heterogenität die Detektion potentieller QTL in dieser Region bislang möglicherweise verhinderte.

Die Mehrzahl der untersuchten Kandidatengene, die für eine veränderte Proteinexkretion insbesondere eine erhöhte Albuminurie in Frage kämen, konzentriert sich auf diejenigen, denen eine mögliche Beteiligung an Veränderungen der glomerulären Filtrationsbarriere zukommt. So ist zum Beispiel bekannt, dass Podozytenschädigungen an der Entstehung der Albuminurie im Rahmen renaler Erkrankungen beim Menschen als auch im Tiermodell beteiligt sind (Kawachi *et al.*, 2006; Tryggvason *et al.*, 2006). Die Gene NPHS1 und NPHS2, die für die Proteine Nephrin und Podocin kodieren, repräsentieren solche Kandidatengene. Nephrin und Podocin sind maßgeblich an dem Aufbau und der Funktion von Podozytenschlitzmembranen beteiligt (Tryggvason, 1999). Mutationen der Genloci führen zu den seltenen monogenetisch determinierten Nephropathien des kongenitalen Nephrotischen Syndroms vom Finnischen Typ (NPHS1) bzw. des kongenitalen steroidresistenten Nephrotischen Syndroms (NPHS2), die beide mit massiver Proteinurie und Albuminurie einhergehen (Tryggvason *et al.*, 2006). Inwieweit Genveränderungen dieser beiden Genloci auch eine Rolle bei der Manifestation und Progression von Proteinurie und Albuminurie komplexer polygenetisch determinierter Nephropathien spielen, ist bislang nicht geklärt. Eine Beteiligung an der Albuminurie bedingt durch den Albuminurie-QTL auf RNO6 des MWF-Modells ist jedoch unwahrscheinlich, da NPHS1 und NPHS2 auf Rattenchromosom 1 lokalisiert sind und damit nicht in den Bereich des Albuminurie-QTLs auf RNO6 der MWF-Ratte kartieren. Ein weiteres interessantes Protein, das mit einer erhöhten Albuminurie im MWF-Rattenmodell assoziiert sein könnte, konnten Macconi *et al.* mit dem tight-junction Protein Zonula occludens-1 (ZO-1) zeigen (Macconi *et al.*, 2000). Als Teil der Schlitzmembranen wurde für ZO-1 eine

veränderte Verteilung innerhalb der Podozyten von MWF-Ratten im Vergleich zu nierengesunden Wistar-Ratten nachgewiesen (Macconi *et al.*, 2000). Bei nierengesunden Tieren bleibt ZO-1 auf die zytoplasmatische Seite der Podozytenmembran an den Insertionsstellen der Schlitzmembranen beschränkt, während bei MWF-Ratten ZO-1-Protein-Cluster auch innerhalb des Zytoplasmas der Podozytenfortsätze beobachtet wurden (Macconi *et al.*, 2000). Welche molekularen Mechanismen an der Fehlverteilung von ZO-1 bei MWF-Ratten beteiligt sind, ist derzeit noch unklar, jedoch konnte das ZO-1 kodierende Gen als ursächliches Kandidatengen für den Albuminurie-QTL auf RNO6 der MWF-Ratte bereits ausgeschlossen werden, da es auf Rattenchromosom 1 kartiert (Schulz *et al.*, 2002).

Albuminurie wird typischerweise von einem Podozytenverlust, einer Umverteilung Podozyten-assoziiertes Moleküle und einer Podozytenschädigung, die u.a. durch die Abflachung der Fortsätze gekennzeichnet ist, begleitet (Kerjaschki, 2001). Die Abfolge der Geschehnisse, die zur Entstehung einer Mikroalbuminurie im Zusammenhang mit Podozytenschädigung, Proteinurie und Glomerulosklerose führen, ist beim Menschen jedoch schwierig zu demonstrieren. Einerseits limitiert der Mangel an repräsentativen Nierenbiopsien und andererseits die genetische Heterogenität die Untersuchung der Albuminurieentstehung. Im Rahmen der Untersuchung von frühzeitigen glomerulären Veränderungen bei MWF-Ratten konnte die Arbeitsgruppe Ijpehaar *et al.* zeigen, dass dem Beginn der Albuminurie bei MWF-Ratte im Alter von 6 Wochen eine glomeruläre Hypertrophie vorausgeht (Ijpehaar *et al.*, 2008). Mit einer hohen Wahrscheinlichkeit wurde hierfür das bei MWF-Ratten beobachtete angeborene Nephrondefizit verantwortlich gemacht (Ijpehaar *et al.*, 2008), denn es zeigte sich, dass die reduzierte Nephronanzahl und der damit verbundene Anstieg der glomerulären Filtrationsrate einzelner Nephrone mit Adaptationsprozessen der Glomeruli wie der glomerulären Hypertrophie bei jungen MWF Tiere im Alter von 4 Wochen assoziiert war (Rovira-Halbach *et al.*, 1986; Fassi *et al.*, 1998; Ijpehaar *et al.*, 2008). Einen weiteren Aspekt diesbezüglich lieferte jedoch die histologische Untersuchung von Nierenpräparaten konsomer MWF-6<sup>SHR</sup>-Ratten. Im Vergleich zum MWF-Parentaltierstamm war bei den konsomen Tieren durch den Austausch von RNO6 kein Nephrondefizit, aber weiterhin eine glomeruläre Hypertrophie nachweisbar (Schulz *et al.*, 2007; van Es *et al.*, 2011). Das angeborene Nephrondefizit schien damit nicht alleinig die Ursache für die Entstehung einer glomerulären Hypertrophie zu sein. Zudem konnte die glomeruläre

Hypertrophie als alleinige Ursache der Albuminurie im MWF-Modell ausgeschlossen werden, da konsome MWF-6<sup>SHR</sup>-Tiere trotz nachweislicher glomerulärer Hypertrophie eine deutliche Suppression der Albuminurie im Vergleich zu MWF aufwiesen (van Es *et al.*, 2011). Die Untersuchung konsomer MWF-8<sup>SHR</sup>-Tiere demonstrierte zusätzlich, dass auch das Nephrondefizit nicht alleinig für die Entstehung der Albuminurie im MWF-Modell verantwortlich war, denn konsome MWF-8<sup>SHR</sup>-Ratten wiesen trotz des mit MWF vergleichbaren Nephrondefizits eine deutlich verminderte Albuminurie im Vergleich zum MWF-Parentaltierstamm auf (Schulz *et al.*, 2008a).

Interessanterweise konnte bei MWF-Ratten im Rahmen der Untersuchung frühzeitiger glomerulärer Veränderungen zeitgleich mit dem Beginn der Albuminurie ein fokal segmentaler Verlust der Podoplanin-Protein-Expression und eine vermehrte Expression von Desmin, einem Marker für Podozytenschäden (Floege *et al.*, 1992), innerhalb derselben Podozyten beobachtet werden (Ijpehaar *et al.*, 2008). Die vermehrte Desminexpression bei jungen MWF-Ratten mit glomerulärer Hypertrophie stand dabei im Einklang mit dem Konzept, dass durch die Expansion des glomerulären Kapillarsystems und den erhöhten Filtrationsdurchsatz einzelner Nephrone Adaptationsprozesse der glomerulären Epithelzellen in den Prozess der vermehrten Desmininduktion involviert waren (Kriz *et al.*, 1995). Podoplanin ist ein Podozyten-Membranprotein und wurde bereits in Podozyten der Puromycin Aminonucleosid Nephrosis-Ratte, einem Rattenmodell mit spezifischer Podozytenschädigung und Proteinurie, vermindert vorgefunden (Breiteneder-Geleff *et al.*, 1997). Untersuchungen in Tiermodellen lassen vermuten, dass Podoplanin an der Aufrechterhaltung der Zellstruktur hypertrophierter Podozyten und seiner Fussfortsätze beteiligt ist, die für die Funktionsfähigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere unabdingbar ist (Breiteneder-Geleff *et al.*, 1997; Matsui *et al.*, 1998). Ein segmentaler Podoplaninverlust scheint daher zu strukturellen Podozytenveränderungen zu führen und die Funktionsfähigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere zu stören. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass innerhalb von Podozyten mit verminderter Podoplaninexpression Albumin akkumuliert vorgefunden wurde (Ijpehaar *et al.*, 2008). Schlussfolgernd scheinen diese betroffenen Podozyten innerhalb der glomerulären Filtrationsbarriere Schwachstellen mit vermehrter Albuminfiltration und Albuminreabsorption darzustellen. Da der Austausch von RNO6 von SHR in das Hintergrundgenom von MWF bei konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Tieren eine deutliche Abnahme der Albuminurie und Glomerulosklerose im Vergleich zu MWF ergab (Schulz *et al.*,

2007), könnten Gene innerhalb des Albuminurie-QTLs auf RNO6 ursächlich an den Podozytenveränderungen mit verminderter Podoplanin- und vermehrter Desminexpression beteiligt sein. Kartierungsanalysen ergaben jedoch, dass die für Desmin und Podoplanin kodierenden Gene auf RNO9 bzw. RNO5 lokalisiert sind und daher als Kandidatengene des Albuminurie-QTLs auf RNO6 ausgeschlossen werden konnten (van Es *et al.*, 2011). Nichtsdestotrotz besteht die Möglichkeit, dass die Expressionsveränderungen der beiden Proteine am Mechanismus, der zur Albuminurie beim MWF-Rattenmodell führt, massgeblich beteiligt sind und durch Gene des Albuminurie-QTLs auf RNO6 beeinflusst werden. Die Untersuchung der Podoplanin- und Desminexpression bei konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Tieren ergab im Vergleich zum MWF-Stamm eine verminderte Expression von Desmin und einen vergleichbaren Podoplaninverlust (van Es *et al.*, 2011). Trotz verminderter Albuminurie wiesen konsome MWF-6<sup>SHR</sup>-Ratten eine mit MWF vergleichbare Podoplaninverminderung auf, sodass der Podoplaninverlust als alleinige Erklärung für die Albuminurie im MWF-Tiermodell nicht ausreicht. Interessanterweise konnte im Gegensatz zu den konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Ratten bei konsomen MWF-8<sup>SHR</sup>-Ratten ein verminderter Podoplaninverlust im Vergleich zu MWF nachgewiesen werden (van Es *et al.*, 2011). Die geringere Podoplaninexpression in Podozyten des MWF-Stamms scheint damit von genetischen Faktoren auf RNO8 abhängig zu sein. Obwohl konsome MWF-6<sup>SHR</sup>-Ratten eine mit MWF vergleichbare glomeruläre Hypertrophie aufwiesen, war die Desminexpression bei den konsomen Ratten deutlich vermindert, so dass die glomeruläre Hypertrophie nicht alleinig für die vermehrte Desminexpression verantwortlich ist (van Es *et al.*, 2011).

Veränderungen anderer Podozyten-assoziiierter Moleküle wie ZO-1 oder Nephrin, die beide in älteren MWF-Ratten erhöht vorgefunden wurden, wurden während der Entwicklungsperiode der Mikroalbuminurie nicht beobachtet (Macconi *et al.*, 2000; Macconi *et al.*, 2006; Ijpelaar *et al.*, 2008). Dies lässt vermuten, dass der Podoplaninverlust zu den frühen molekularen Veränderungen im Rahmen der Entstehung der Albuminurie gehört, während die Veränderungen von ZO-1 und Nephrin zu späteren Zeitpunkten nach dem Einsetzen der Albuminurie eine Rolle spielen. Die genauen molekularen Mechanismen, die zum frühzeitigen Podoplaninverlust und einer vermehrten Desminexpression im MWF-Rattenmodell führen und mit dem Beginn der Albuminurie assoziiert sind, sind derzeit noch unklar, scheinen jedoch durch genetische Faktoren wichtiger Albuminurie-QTL auf RNO6 und RNO8 beeinflusst zu werden.



Der Albuminurie-QTL auf RNO6 der MWF-Ratte konnte durch die Charakterisierung teilkongener Stämme im Rahmen dieser Arbeit auf eine Größe von 10,9 cM eingegrenzt werden. Die Diskussion über potentielle Kandidatengene innerhalb dieser Region ist bislang noch offen, insbesondere auf Grund des immer noch relativ großen Umfangs des chromosomalen Fragments, das neben verschiedenen Kandidatengenen eine Vielzahl von Genen mit bislang unbekannter Relevanz für Nierenerkrankungen beinhalten könnte. Die konkrete Beteiligung möglicher Kandidatengene bzw. genetischer Faktoren am Pathomechanismus der Albuminurie muss in zukünftigen Funktionsanalysen untersucht werden. Zeitgleich können durch die Charakterisierung subkongener Linien fragliche Kandidatengene innerhalb zunehmend feinkartierter Chromosomenregionen bestätigt oder ausgeschlossen werden. Auf der Grundlage der Befunde dieser Arbeit wurde bereits mit der Zucht subkongener Stämme begonnen, deren Zielsetzung eine Eingrenzung des Albuminurie-QTLs auf eine Größe von kleiner 1 cM ist. Identifizierte Kandidatengene dieses möglichst kleinen Chromosomenintervalls können im Anschluss mit Hilfe von differentiellen Genexpressionsanalysen, Funktionsstudien und Mutationsuntersuchungen näher charakterisiert und als Albuminurie-regulierende Gene identifiziert werden.

Die Untersuchung genetisch vereinfachter ingezüchteter Tiermodelle ermöglicht ein besseres Verständnis der genetischen Grundlagen pathologischer Stoffwechselwege von komplexen polygenetisch determinierten Erkrankungen beim Menschen. Die im Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse können über den Homologievergleich auf den Menschen übertragen werden und dazu beitragen, in Zukunft neue präventive, diagnostische und therapeutische Behandlungsstrategien mit einer gezielten Abstimmung auf individuelle Risikoprofile zu entwickeln, um kardiovaskuläre und renale Erkrankungen frühzeitig zu therapieren.

## 5 Zusammenfassung

Die arterielle Hypertonie und chronische Nephropathie gehören zu den polygenetischen und multifaktoriellen Erkrankungen. Die Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte repräsentiert auf Grund der phänotypischen Konstellation mit Entwicklung einer arteriellen Hypertonie, frühzeitigen Albuminurie und struktureller Nierenveränderungen im Alter ein interessantes Tiermodell für die Erforschung von Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen. Im Rahmen einer früheren Kosegregations- und Kopplungsanalyse zwischen der MWF- und nierengesunden spontan hypertensiven (SHR)-Ratte konnte auf RNO6 der MWF-Ratte ein wichtiger QTL mit signifikanter Kopplung für Albuminurie identifiziert werden, dessen funktionelle Bedeutung durch den konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm verifiziert werden konnte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur weiteren Evaluation dieses Albuminurie-QTLs im isogenetischen Hintergrund des kontrastierenden SHR-Stamms der konsome SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamm etabliert, bei dem im Vergleich zum konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Stamm in reziproker Weise das RNO6 von MWF in das Genom von SHR übertragen wurde. Im Untersuchungszeitraum von der 4. bis zur 32. Woche wurde bei den konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen kein Unterschied der Albuminurie im Vergleich zu SHR beobachtet, während die Albuminurie der konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Männchen im Vergleich zu MWF zu allen Messzeitpunkten signifikant supprimiert war ( $p < 0,0001$ ). Die funktionelle Relevanz des Albuminurie-QTLs auf RNO6 im isolierten SHR-Hintergrundgenom konnte somit beim konsomen SHR-6<sup>MWF</sup>-Stamm im Sinne einer Albuminuriesteigerung im Vergleich zu SHR nicht nachgewiesen werden. Der blutdruckunabhängige Effekt des Albuminurie-QTLs auf RNO6 konnte bei SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen im Vergleich zu beiden Parentaltierstämmen bestätigt werden. SHR-6<sup>MWF</sup>-Männchen wiesen die höchsten systolischen Blutdruckwerte auf, so dass ein niedriger Blutdruck als Ursache für die geringe Albuminurie ausgeschlossen wurde. Die Werte der Albuminurie und des systolischen Blutdrucks der SHR-6<sup>MWF</sup>-Weibchen ergaben im Vergleich zu den Parentaltier- und konsomen MWF-6<sup>SHR</sup>-Weibchen eine ähnliche stammesspezifische Verteilung wie bei den Männchen, jedoch mit einer milderer Ausprägung im Sinne des sexuellen Dimorphismus.

Zur weiteren Untersuchung des Albuminurie-QTLs auf RNO6 wurde eine statistisch aussagekräftigere Kosegregations- und Kopplungsanalyse innerhalb einer (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population, die bis auf das rekombinierte RNO6 homozygot für MWF war, durchgeführt. Der höchste LOD-Score für den Albuminurie-QTL auf RNO6 konnte am genetischen Marker D6Rat12 für 8 Wochen alte F2-Tiere nachgewiesen werden. Die LOD-Score-Werte der 14 und 24 Wochen alten F2-Tiere kartierten am genetischen Marker D6Mit8. Die Größe des Albuminurie-QTLs konnte mit Hilfe der (MWF x MWF-6<sup>SHR</sup>)-F2-Population anhand der 1- und 2-LOD-Intervalle im Vergleich zur früheren (MWF x SHR)-Backcross-Population verkleinert werden.

Zur weiteren Eingrenzung der QTL-Größe wurden im Chromosomenbereich zwischen den genetischen Markern D6Rat1 und D6Rat30 sechs teilkongene Stämme mit zunehmend kleineren Chromosomensegmenten von SHR im isogenetischen Hintergrund von MWF etabliert. Durch die geno- und phänotypische Charakterisierung der teilkongenen Stämme wurde zwischen den Markern D6Rat12 und D6Mit8 ein diskriminierendes Intervall für die Albuminurie identifiziert, das mit einer Größe von 10,9 cM den Albuminurie-QTL auf RNO6 neu definierte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass zwischen den Markern D6Rat12 und D6Mit8 mindestens ein oder mehrere genetische Faktoren lokalisiert sind, die mit einem starken Effekt die Albuminurie im MWF-Rattenmodell regulieren.

Weiterführende Studien haben zum Ziel, über die Zucht subkongener Stämme den Albuminurie-QTL auf RNO6 der MWF-Ratte weiter einzugrenzen, um die Identifizierung Albuminurie-regulierender Gene zu ermöglichen. Gewonnene Erkenntnisse im Tiermodell können über den Homologievergleich auf den Menschen übertragen werden und dazu beitragen, neue Therapieoptionen gegen kardiovaskuläre und renale Erkrankungen beim humanen Patienten zu entwickeln.

## 6 Literaturverzeichnis

Arnlov J, Evans J C, Meigs J B, et al. (2005): Low-Grade Albuminuria and Incidence of Cardiovascular Disease Events in Nonhypertensive and Nondiabetic Individuals: the Framingham Heart Study. *Circulation* **112**: 969-975.

Bacon SL, Sherwood A, Hinderliter A and Blumenthal J A (2004): Effects of Exercise, Diet and Weight Loss on High Blood Pressure. *Sports Med* **34**: 307-316.

Baltatu O, Cayla C, Iliescu R, Andreev D and Bader M (2003): Abolition of End-Organ Damage by Antiandrogen Treatment in Female Hypertensive Transgenic Rats. *Hypertension* **41**: 830-833.

Blumenthal JA, Babyak M A, Hinderliter A, et al. (2010): Effects of the DASH Diet Alone and in Combination With Exercise and Weight Loss on Blood Pressure and Cardiovascular Biomarkers in Men and Women With High Blood Pressure: the ENCORE Study. *Arch Intern Med* **170**: 126-135.

Brantsma AH, Bakker S J, de Zeeuw D, de Jong P E and Gansevoort R T (2006): Urinary Albumin Excretion As a Predictor of the Development of Hypertension in the General Population. *J Am Soc Nephrol* **17**: 331-335.

Brantsma AH, Bakker S J, Hillege H L, de Zeeuw D, de Jong P E and Gansevoort R T (2005): Urinary Albumin Excretion and Its Relation With C-Reactive Protein and the Metabolic Syndrome in the Prediction of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **28**: 2525-2530.

Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, et al. (1997): Podoplanin, Novel 43-Kd Membrane Protein of Glomerular Epithelial Cells, Is Down-Regulated in Puromycin Nephrosis. *Am J Pathol* **151**: 1141-1152.

Brown DM, Provoost A P, Daly M J, Lander E S and Jacob H J (1996): Renal Disease Susceptibility and Hypertension Are Under Independent Genetic Control in the Fawn-Hooded Rat. *Nat Genet* **12**: 44-51.

Brown DM, van Dokkum R P, Korte M R, et al. (1998): Genetic Control of Susceptibility for Renal Damage in Hypertensive Fawn-Hooded Rats. *Ren Fail* **20**: 407-411.

Cheriyian J, O'Shaughnessy K M and Brown M J (2010): Primary Prevention of CVD: Treating Hypertension. *Clin Evid (Online)* **2010**.

Cowley AW, Jr. (2006): The Genetic Dissection of Essential Hypertension. *Nat Rev Genet* **7**: 829-840.

Cowley AW, Jr., Liang M, Roman R J, Greene A S and Jacob H J (2004a): Consomic Rat Model Systems for Physiological Genomics. *Acta Physiol Scand* **181**: 585-592.

Cowley AW, Jr., Roman R J and Jacob H J (2004b): Application of Chromosomal Substitution Techniques in Gene-Function Discovery. *J Physiol* **554**: 46-55.

- Cowley AW, Jr., Roman R J, Kaldunski M L, et al. (2001): Brown Norway Chromosome 13 Confers Protection From High Salt to Consomic Dahl S Rat. *Hypertension* **37**: 456-461.
- Cowley AW, Jr., Stoll M, Greene A S, et al. (2000): Genetically Defined Risk of Salt Sensitivity in an Intercross of Brown Norway and Dahl S Rats. *Physiol Genomics* **2**: 107-115.
- de Zeeuw D, Parving H H and Henning R H (2006): Microalbuminuria As an Early Marker for Cardiovascular Disease. *J Am Soc Nephrol* **17**: 2100-2105.
- Delles C, McBride M W, Graham D, Padmanabhan S and Dominiczak A F (2010): Genetics of Hypertension: From Experimental Animals to Humans. *Biochim Biophys Acta* **1802**: 1299-1308.
- Egan BM, Zhao Y and Axon R N (2010): US Trends in Prevalence, Awareness, Treatment, and Control of Hypertension, 1988-2008. *JAMA* **303**: 2043-2050.
- Elliot SJ, Berho M, Korach K, et al. (2007): Gender-Specific Effects of Endogenous Testosterone: Female Alpha-Estrogen Receptor-Deficient C57Bl/6J Mice Develop Glomerulosclerosis. *Kidney Int* **72**: 464-472.
- Fassi A, Sangalli F, Maffi R, et al. (1998): Progressive Glomerular Injury in the MWF Rat Is Predicted by Inborn Nephron Deficit. *J Am Soc Nephrol* **9**: 1399-1406.
- Floege J, Alpers C E, Sage E H, et al. (1992): Markers of Complement-Dependent and Complement-Independent Glomerular Visceral Epithelial Cell Injury in Vivo. Expression of Antiadhesive Proteins and Cytoskeletal Changes. *Lab Invest* **67**: 486-497.
- Frantz SA, Kaiser M, Gardiner S M, et al. (1998): Successful Isolation of a Rat Chromosome 1 Blood Pressure Quantitative Trait Locus in Reciprocal Congenic Strains. *Hypertension* **32**: 639-646.
- Freedman BI, Bowden D W, Rich S S, et al. (2005): A Genome Scan for All-Cause End-Stage Renal Disease in African Americans. *Nephrol Dial Transplant* **20**: 712-718.
- Frei U, Schober-Halstenberg H.-J. (2008): Nierenerstztherapie in Deutschland, Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007: Quasie-Niere gGmbH 2008
- Ganten D, de Jong W. Experimental and genetic models of hypertension. In: Gnatien D, de Jong W, eds. *Handbook of Hypertension*. Elsevier Science B.V., 1994; Vol. 16
- Garrett MR, Dene H and Rapp J P (2003): Time-Course Genetic Analysis of Albuminuria in Dahl Salt-Sensitive Rats on Low-Salt Diet. *J Am Soc Nephrol* **14**: 1175-1187.
- Garrett MR, Joe B and Yerga-Woolwine S (2006): Genetic Linkage of Urinary Albumin Excretion in Dahl Salt-Sensitive Rats: Influence of Dietary Salt and Confirmation Using Congenic Strains. *Physiol Genomics* **25**: 39-49.

Gschwend S, Buikema H, Navis G, Henning R H, de Zeeuw D and van Dokkum R P (2002): Endothelial Dilatory Function Predicts Individual Susceptibility to Renal Damage in the 5/6 Nephrectomized Rat. *J Am Soc Nephrol* **13**: 2909-2915.

Hackbarth H, Buttner D, Jarck D, Pothmann M, Messow C and Gartner K (1983): Distribution of Glomeruli in the Renal Cortex of Munich Wistar Fromter (MWF) Rats. *Ren Physiol* **6**: 63-71.

Hackbarth H, Gwinner W, Alt J M, Hagemann I, Thiemann A and Finke B (1991): The Munich Wistar Fromter Rat: Proteinuria and Blood Pressure in Correlation to the Number of Superficial Glomeruli. *Ren Physiol Biochem* **14**: 246-252.

He J and Whelton P K (1999): Elevated Systolic Blood Pressure As a Risk Factor for Cardiovascular and Renal Disease. *J Hypertens Suppl* **17**: S7-13.

Hillege HL, Fidler V, Diercks G F, et al. (2002): Urinary Albumin Excretion Predicts Cardiovascular and Noncardiovascular Mortality in General Population. *Circulation* **106**: 1777-1782.

Ijpeelaar DH, Schulz A, Koop K, et al. (2008): Glomerular Hypertrophy Precedes Albuminuria and Segmental Loss of Podoplanin in Podocytes in Munich-Wistar-Fromter Rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **294**: F758-F767.

Kannel WB (2000): Elevated Systolic Blood Pressure As a Cardiovascular Risk Factor. *Am J Cardiol* **85**: 251-255.

Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han G D, Oriyasa M and Shimizu F (2006): Role of Podocyte Slit Diaphragm As a Filtration Barrier. *Nephrology (Carlton)* **11**: 274-281.

Keller BJ, Martini S, Sedor J R and Kretzler M (2012): A Systems View of Genetics in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int* **81**: 14-21.

Kerjaschki D (2001): Caught Flat-Footed: Podocyte Damage and the Molecular Bases of Focal Glomerulosclerosis. *J Clin Invest* **108**: 1583-1587.

Kottgen A, Pattaro C, Boger C A, et al. (2010): New Loci Associated With Kidney Function and Chronic Kidney Disease. *Nat Genet* **42**: 376-384.

Kraja AT, Hunt S C, Rao D C, Davila-Roman V G, Arnett D K and Province M A (2011): Genetics of Hypertension and Cardiovascular Disease and Their Interconnected Pathways: Lessons From Large Studies. *Curr Hypertens Rep* **13**: 46-54.

Kreutz R and Hubner N (2002): Congenic Rat Strains Are Important Tools for the Genetic Dissection of Essential Hypertension. *Semin Nephrol* **22**: 135-147.

Kreutz R, Kovacevic L, Schulz A, Rothermund L, Ketteler M and Paul M (2000): Effect of High NaCl Diet on Spontaneous Hypertension in a Genetic Rat Model With Reduced Nephron Number. *J Hypertens* **18**: 777-782.

Kriz W, Elger M, Mundel P and Lemley K V (1995): Structure-Stabilizing Forces in the Glomerular Tuft. *J Am Soc Nephrol* **5**: 1731-1739.

Kuhlmann U, Walb D, Luft FC. Nephrologie, Pathophysiologie - Klinik - Nierenersatzverfahren. In: *Nephrologie, Pathophysiologie - Klinik - Nierenersatzverfahren*. Georg Thieme Verlag, 2003; 4. Auflage

Lagrange D and Fournie G J (2010): Generation of Congenic and Consomic Rat Strains. *Methods Mol Biol* **597**: 243-266.

Lee SJ and Cicila G T (2002): Functional Genomics in Rat Models of Hypertension: Using Differential Expression and Congenic Strains to Identify and Evaluate Candidate Genes. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **12**: 297-316.

Lifton RP, Gharavi A G and Geller D S (2001): Molecular Mechanisms of Human Hypertension. *Cell* **104**: 545-556.

Macconi D, Bonomelli M, Benigni A, et al. (2006): Pathophysiologic Implications of Reduced Podocyte Number in a Rat Model of Progressive Glomerular Injury. *Am J Pathol* **168**: 42-54.

Macconi D, Ghilardi M, Bonassi M E, et al. (2000): Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition on Glomerular Basement Membrane Permeability and Distribution of Zonula Occludens-1 in MWF Rats. *J Am Soc Nephrol* **11**: 477-489.

Matsui K, Breiteneder-Geleff S and Kerjaschki D (1998): Epitope-Specific Antibodies to the 43-KD Glomerular Membrane Protein Podoplanin Cause Proteinuria and Rapid Flattening of Podocytes. *J Am Soc Nephrol* **9**: 2013-2026.

Mattson DL, Dwinell M R, Greene A S, et al. (2007): Chromosomal Mapping of the Genetic Basis of Hypertension and Renal Disease in FHH Rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**: F1905-F1914.

Menne J, Chatzikyrkou C and Haller H (2010): Microalbuminuria As a Risk Factor: the Influence of Renin-Angiotensin System Blockade. *J Hypertens* **28**: 1983-1994.

Murayama S, Yagyu S, Higo K, et al. (1998): A Genetic Locus Susceptible to the Overt Proteinuria in BUF/Mna Rat. *Mamm Genome* **9**: 886-888.

Neugarten J, Acharya A and Silbiger S R (2000): Effect of Gender on the Progression of Nondiabetic Renal Disease: a Meta-Analysis. *J Am Soc Nephrol* **11**: 319-329.

Ochodnický P, de Zeeuw D, Henning R H, Kluppel C A and van Dokkum R P (2006): Endothelial Function Predicts the Development of Renal Damage After Combined Nephrectomy and Myocardial Infarction. *J Am Soc Nephrol* **17**: S49-S52.

Poyan MA, Siegel A K, Kossmehl P, et al. (2003): Early Onset Albuminuria in Dahl Rats Is a Polygenetic Trait That Is Independent From Salt Loading. *Physiol Genomics* **14**: 209-216.

Rangel-Filho A, Sharma M, Datta Y H, et al. (2005): RF-2 Gene Modulates Proteinuria and Albuminuria Independently of Changes in Glomerular Permeability in the Fawn-Hooded Hypertensive Rat. *J Am Soc Nephrol* **16**: 852-856.

- Rapp JP (2000): Genetic Analysis of Inherited Hypertension in the Rat. *Physiol Rev* **80**: 135-172.
- Rapp JP, Wang S M and Dene H (1989): A Genetic Polymorphism in the Renin Gene of Dahl Rats Cosegregates With Blood Pressure. *Science* **243**: 542-544.
- Remuzzi A, Puntorieri S, Alfano M, et al. (1992): Pathophysiologic Implications of Proteinuria in a Rat Model of Progressive Glomerular Injury. *Lab Invest* **67**: 572-579.
- Rovira-Halbach G, Alt J M, Brunkhorst R, Frei U, Kuhn K and Stolte H (1986): Single Nephron Hyperfiltration and Proteinuria in a Newly Selected Rat Strain With Superficial Glomeruli. *Ren Physiol* **9**: 317-325.
- Saavedra JM (2009): Opportunities and Limitations of Genetic Analysis of Hypertensive Rat Strains. *J Hypertens* **27**: 1129-1133.
- Satchell SC and Tooke J E (2008): What Is the Mechanism of Microalbuminuria in Diabetes: a Role for the Glomerular Endothelium? *Diabetologia* **51**: 714-725.
- Satko SG, Freedman B I and Moossavi S (2005): Genetic Factors in End-Stage Renal Disease. *Kidney Int Suppl*: S46-S49.
- Schulz A, Hansch J, Kuhn K, et al. (2008a): Nephron Deficit Is Not Required for Progressive Proteinuria Development in the Munich Wistar Fromter Rat. *Physiol Genomics* **35**: 30-35.
- Schulz A, Litfin A, Kossmehl P and Kreutz R (2002): Genetic Dissection of Increased Urinary Albumin Excretion in the Munich Wistar Fromter Rat. *J Am Soc Nephrol* **13**: 2706-2714.
- Schulz A, Schlesener M, Weiss J, et al. (2008b): Protective Effect of Female Gender on the Development of Albuminuria in a Polygenetic Rat Model Is Enhanced Further by Replacement of a Major Autosomal QTL. *Clin Sci (Lond)* **114**: 305-311.
- Schulz A, Schutten S, Schulte L, et al. (2010): Genetic Locus on MWF Rat Chromosome 6 Affects Kidney Damage in Response to L-NAME Treatment in Spontaneously Hypertensive Rats. *Physiol Genomics* **42**: 126-133.
- Schulz A, Schutten-Faber S, van Es N, et al. (2012): Induction of Albuminuria and Kidney Damage in SHR by Transfer of Chromosome 8 From Munich Wistar Fromter Rats. *Physiol Genomics* **44**: 110-116.
- Schulz A, Standke D, Kovacevic L, et al. (2003): A Major Gene Locus Links Early Onset Albuminuria With Renal Interstitial Fibrosis in the MWF Rat With Polygenetic Albuminuria. *J Am Soc Nephrol* **14**: 3081-3089.
- Schulz A, Weiss J, Schlesener M, et al. (2007): Development of Overt Proteinuria in the Munich Wistar Fromter Rat Is Suppressed by Replacement of Chromosome 6 in a Consomic Rat Strain. *J Am Soc Nephrol* **18**: 113-121.



Shiozawa M, Provoost A P, van Dokkum R P, Majewski R R and Jacob H J (2000): Evidence of Gene-Gene Interactions in the Genetic Susceptibility to Renal Impairment After Unilateral Nephrectomy. *J Am Soc Nephrol* **11**: 2068-2078.

Siegel AK, Kossmehl P, Planert M, et al. (2004): Genetic Linkage of Albuminuria and Renal Injury in Dahl Salt-Sensitive Rats on a High-Salt Diet: Comparison With Spontaneously Hypertensive Rats. *Physiol Genomics* **18**: 218-225.

Silbiger S and Neugarten J (2008): Gender and Human Chronic Renal Disease. *Genet Med* **5 Suppl A**: S3-S10.

Singh A and Satchell S C (2011): Microalbuminuria: Causes and Implications. *Pediatr Nephrol* **26**: 1957-1965.

Slemmer JE, Shaughnessy K S, Scanlan A P, Sweeney M I and Gottschall-Pass K T (2012): Choice of Diet Impacts the Incidence of Stroke-Related Symptoms in the Spontaneously Hypertensive Stroke-Prone Rat Model. *Can J Physiol Pharmacol* **90**: 243-248.

St Lezin EM, Pravenec M, Wong A L, et al. (1996): Effects of Renin Gene Transfer on Blood Pressure and Renin Gene Expression in a Congenic Strain of Dahl Salt-Resistant Rats. *J Clin Invest* **97**: 522-527.

Stanton JL, Braitman L E, Riley A M, Jr., Khoo C S and Smith J L (1982): Demographic, Dietary, Life Style, and Anthropometric Correlates of Blood Pressure. *Hypertension* **4**: III135-III142.

Stehouwer CD and Smulders Y M (2006): Microalbuminuria and Risk for Cardiovascular Disease: Analysis of Potential Mechanisms. *J Am Soc Nephrol* **17**: 2106-2111.

Stoll M, Kwitek-Black A E, Cowley A W, Jr., et al. (2000): New Target Regions for Human Hypertension Via Comparative Genomics. *Genome Res* **10**: 473-482.

Tryggvason K (1999): Unraveling the Mechanisms of Glomerular Ultrafiltration: Nephrin, a Key Component of the Slit Diaphragm. *J Am Soc Nephrol* **10**: 2440-2445.

Tryggvason K, Patrakka J and Wartiovaara J (2006): Hereditary Proteinuria Syndromes and Mechanisms of Proteinuria. *N Engl J Med* **354**: 1387-1401.

van Es N, Schulz A, Ijpelaar D, et al. (2011): Elimination of Severe Albuminuria in Aging Hypertensive Rats by Exchange of 2 Chromosomes in Double-Consomic Rats. *Hypertension* **58**: 219-224.

Verhagen AM, Attia D M, Koomans H A and Joles J A (2000): Male Gender Increases Sensitivity to Proteinuria Induced by Mild NOS Inhibition in Rats: Role of Sex Hormones. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**: F664-F670.

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

Yagil Y, Hessner M, Schulz H, et al. (2010): Geno-Transcriptomic Dissection of Proteinuria in the Uninephrectomized Rat Uncovers a Molecular Complexity With Sexual Dimorphism. *Physiol Genomics* **42A**: 301-316.

Zhang QY, Dene H, Deng A Y, Garrett M R, Jacob H J and Rapp J P (1997): Interval Mapping and Congenic Strains for a Blood Pressure QTL on Rat Chromosome 13. *Mamm Genome* **8**: 636-641.

## 7 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie an der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin angefertigt. An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, allen Kollegen und Freunden, die mir bei der Planung, Durchführung und Anfertigung dieser Dissertation mit ihrem Wissen zur Seite standen, meinen Dank auszusprechen.

Ich danke sehr herzlich Herrn Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz für die Aufnahme in sein Institut und für die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Doktorarbeit.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Frau Dr. rer. medic. Angela Schulz für ihre unentwegte und geduldige Hilfestellung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Arbeiten sowie bei der Verfassung der Dissertation. Ohne ihre konsequente Unterstützung wäre diese Dissertation in der hier vorliegenden Form nicht möglich gewesen.

Für die Unterstützung bei der praktischen Arbeit und für das Erlernen labortechnischer Methoden danke ich Sabine Wunderlich, Claudia Plum und Heike Vogelsang. Darüber hinaus danke ich Dr. Markus Wehland von Trebra und Norbert Wendt für die Einarbeitung und Unterstützung tierexperimenteller Arbeiten.

In der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin danke ich allen Tierpflegern und insbesondere Bettina Bublath für die Durchführung der Rattenzucht und stete Hilfsbereitschaft.

Allen Mitarbeitern des Institutes danke ich für die freundliche Atmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe und für die konstruktive Zusammenarbeit, die zu der Durchführung meiner Dissertation beitrugen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, auf deren Motivation und liebevolle Unterstützung ich mich während der Doktorarbeit und meiner ärztlichen Ausbildung immer verlassen konnte.

## **8 Anhang**

### **8.1 Tabellarischer Lebenslauf**

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

## 8.2 Publikationen

### Originalarbeiten

Schulz A, Weiss J, **Schlesener M**, Hansch J, Wehland M, Wendt N, Kossmehl P, Sietmann A, Grimm D, Stoll M, Nyengaard J R and Kreutz R (2007): Development of Overt Proteinuria in the Munich Wistar Fromter Rat Is Suppressed by Replacement of Chromosome 6 in a Consomic Rat Strain. *J Am Soc Nephrol* 18: 113-121.

Schulz A, **Schlesener M**, Weiss J, Hansch J, Wendt N, Kossmehl P, Grimm D, Vetter R and Kreutz R (2008): Protective Effect of Female Gender on the Development of Albuminuria in a Polygenetic Rat Model Is Enhanced Further by Replacement of a Major Autosomal QTL. *Clin Sci (Lond)* 114: 305-311.

Ijpelaar DH, Schulz A, Koop K, **Schlesener M**, Bruijn J A, Kerjaschki D, Kreutz R and de Heer E (2008): Glomerular Hypertrophy Precedes Albuminuria and Segmental Loss of Podoplanin in Podocytes in Munich-Wistar-Fromter Rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F758-F767.

Schulz A, Hansch J, Kuhn K, **Schlesener M**, Kossmehl P, Nyengaard J R, Wendt N, Huber M and Kreutz R (2008): Nephron Deficit Is Not Required for Progressive Proteinuria Development in the Munich Wistar Fromter Rat. *Physiol Genomics* 35: 30-35.

Schulz A., **Schlesener M**. et al.: Fine mapping and candidate gene analysis of an albuminuria QTL on rat chromosome 6 in the MWF rat. (Publikation in Vorbereitung)

## Abstracts

**Schlesener M**, Hänsch J, Wehland M, Weiss J, Wendt N, Kreutz R, Schulz A (2006): Chromosome 6 not only has an important role in the progression of renal disease in male MWF rats but also influences the mild albuminuria in female animals. DMW 131, S190 Supplement 6. (Hochdruckliga; München, Deutschland 2006)

Ijpelaar DH, van Beelen K, Schulz A, **Schlesener M**, Bruijn JA, Kreutz R, de Heer E (2007): Podoplanin loss and albumin entrapment in podocytes during spontaneous development of albuminuria in Munich Wistar Fromter rats. (ASN; San Franzisko, USA 2007)

Kuhn K, **Schlesener M**, Hänsch J, Wehland M, Weiss J, Wendt N, Kreutz R, Schulz A (2007): Genetic effects controlling albuminuria are not purely recessive as expected from QTL mapping studies in the polygenetic Munich Wistar Frömter (MWF) rat. DMW 132, S7 Supplement 1. (Hochdruckliga; Bochum, Deutschland 2007)

Schulz A, Hänsch J, Kuhn K, **Schlesener M**, Wendt N, Nyengaard JR, Kreutz R (2008): Identification of a QTL that protects against albuminuria development in a consomic rat model independent from gender and despite an inherited nephron deficit. (Hypertension ISH/ESH; Berlin, Deutschland 2008)

Schulz A, Kuhn K, **Schlesener M**, Hänsch J, Weiss J, Wendt N, Kreutz R (2008): New insights into gene dosing affecting albuminuria in a consomic strain derived from the polygenetic Munich Wistar Frömter (MWF) rat. (Hypertension ISH/ESH; Berlin, Deutschland 2008)

## Poster

**Schlesener M**, Hänsch J, Wehland M, Weiss J, Wendt N, Kreutz R, Schulz A (2006): Chromosome 6 not only has an important role in the progression of renal disease in male MWF rats but also influences the mild albuminurie in female animals. 30. Wissenschaftlicher Kongress Hypertonie 2006 der Deutschen Hochdruckliga e.V./DHL Deutsche Hypertonie Gesellschaft; München

Hänsch J, **Schlesener M**, Weiss J, Wendt N, Kreutz R, Schulz A (2006): Progression of overt proteinuria in adult MWF rats can be prevented by genetic substitution of chromosome 8 in a consomic strain. DMW 131, S190 Supplement 6. (Hochdruckliga; München, Deutschland 2006)

Schulz A, **Schlesener M**, Weiss J, Hänsch J, Wendt N, Wehland M, Kossmehl P, Grimm D, Kreutz R (2007): Both gender and autosomal genetic loci play an important role for the development of albuminuria and renal damage: Evidence from a polygenetic rat model. (4. Symposium Sex and Gender; Berlin, Deutschland 2007)

Schulz A, **Schlesener M**, Weiss J, Hänsch J, Wendt N, Wehland M, Kossmehl P, Grimm D, Kreutz R (2007): The protective effect of female gender on the development of albuminuria in a polygenetic rat model is further enhanced by replacement of a major autosomal QTL. DMW 132, S48 Supplement 1 (Abstractband). (Hochdruckliga; Bochum, Deutschland 2007)

Schulz A, Hänsch J, Kuhn K, **Schlesener M**, Wendt N, Nyengaard JR, Kreutz R (2008): A quantitative trait locus on rat chromosome 8 is crucial for the development of albuminuria without affecting the inherited nephron deficit In Munich Wistar Frömter rats. (SHR Symposium; Prag, Tschechien 2008)

## **Auszeichnung**

Young Investigator Award 2006

Anlässlich des 30. Wissenschaftlichen Kongresses Hypertonie 2006 der Deutschen Hochdruckliga e.V./DHL Deutsche Hypertonie Gesellschaft in München



### 8.3 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Maria Schlesener, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse und Feinkartierung eines wichtigen Albuminurie-QTLs auf Rattenchromosom 6 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.“

Datum

Unterschrift

21.10.2012