

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

DISSERTATION

*Charakterisierung des doppelkonsomen Rattenstamms
MWF-6^{SHR}8^{SHR} zur Analyse der Albuminurie-QTL
auf Chromosom 6 und Chromosom 8 bei der MWF-Ratte*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kristina Kuhn

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. R. Kreutz
 2. Priv.-Doz. Dr. med. L. Rothermund
 3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Beige

Datum der Promotion: 24.02.2012

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung..... | 5 |
| 1.1 Chronische Nierenerkrankungen (cNE)– epidemiologische Bedeutung..... | 5 |
| 1.2 Albuminurie – Kennzeichen einer cNE und Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen..... | 6 |
| 1.3 Albuminurie - ein quantitatives, komplexes Merkmal | 8 |
| 1.4 Tierversuche bei der Untersuchung komplexer Erkrankungen | 9 |
| 1.5 Strategien zur Identifizierung von Genen komplexer Merkmale..... | 10 |
| 1.6 Die kontrastierenden Inzuchtrattenstämme MWF und SHR..... | 13 |
| 1.7 Kopplungsanalysen und weiterführende Studien bei der MWF-Ratte | 14 |
| 1.8 Ziel der Arbeit..... | 15 |
| 2. Material und Methoden..... | 16 |
| 2.1 Material | 16 |
| 2.1.1 Chemikalien, Radionukleotide und Antikörper..... | 16 |
| 2.1.2 Enzyme | 18 |
| 2.1.3 Puffer und Lösungen | 18 |
| 2.1.4 Primer und Sonden..... | 19 |
| 2.1.5 Sonstige Materialien | 19 |
| 2.1.6 Geräte | 21 |
| 2.2 Charakterisierung des Stamms MWF-6 ^{SHR} 8 ^{SHR} | 21 |
| 2.2.1 Haltung | 21 |
| 2.2.2 Zucht | 22 |
| 2.2.3 Genotypisierung mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker | 24 |
| 2.2.4 Altersverlaufsstudie - Phänotypisierung | 27 |
| 2.2.5 Histologie..... | 30 |
| 2.2.6 Differentielle Genexpressionsanalyse mittels Real-time quantitativer PCR...32 | |
| 2.2.7 Statistische Auswertung | 36 |
| 3. Ergebnisse..... | 36 |
| 3.1 Genotypische Charakterisierung des Stamms MWF-6 ^{SHR} 8 ^{SHR} | 36 |
| 3.2 Phänotypische Charakterisierung männlicher MWF-6 ^{SHR} 8 ^{SHR} -Ratten | 37 |
| 3.2.1 Altersverlauf der Albuminurie-Entwicklung in der 4. bis 32. Woche..... | 37 |
| 3.2.2 Ausprägung der U _{Alb} bei MWF-6 ^{SHR} 8 ^{SHR} und SHR ab der 32. Woche | 38 |

| | |
|---|----|
| 3.2.3 Vergleich der systolischen Blutdrücke in der 14. und 24. Woche | 39 |
| 3.2.4 Biochemische Parameter | 40 |
| 3.2.5 Makroskopische Organbefunde..... | 42 |
| 3.2.6 Histologische Quantifizierung des Nierenschadens bei 24 Wochen alten Tieren | 45 |
| 3.3 Quantifizierung des Nierenschadens auf molekularer Ebene | 49 |
| 3.4 Vergleichende phänotypische Charakterisierung der MWF-6 ^{SHR} 8 ^{SHR} -Weibchen | 50 |
| 3.4.1 Entwicklung der U _{Alb} im Altersverlauf bei weiblichen Tieren | 51 |
| 3.4.2 Erweiterte Altersverlaufsstudie zur U _{Alb} in der 32. bis 52. Woche..... | 53 |
| 3.4.3 Vergleichende Analyse der systolischen Blutdrücke | 53 |
| 3.4.4 Vergleichende histologische Auswertung | 54 |
| 4. Diskussion | 56 |
| 5. Zusammenfassung | 79 |
| 6. Abkürzungen | 82 |
| 7. Literaturverzeichnis | 84 |
| 8. Anhang | 92 |
| 8.1 Lebenslauf | 92 |
| 8.2 Publikationen und Abstracts..... | 93 |
| 8.3 Vortrag und Auszeichnungen..... | 94 |
| 8.3 Danksagung..... | 95 |
| 8.4 Eidesstattliche Erklärung..... | 96 |

1. Einleitung

1.1 Chronische Nierenerkrankungen (cNE)– epidemiologische Bedeutung

Die Niere ist sowohl in ihrem Aufbau, als auch in ihrer Funktion ein hochkomplexes Organ. In ihr wirkt eine Vielzahl spezifischer Zellarten. Als wichtigste Funktionseinheit bewerkstelligen etwa $1,4 \times 10^6$ Nephrone pro Niere die Produktion von zirka 1,5 l Endharn pro Tag. Die Niere dient neben der Ausscheidung von Stoffwechselmetaboliten der Bilanzierung des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts. Darüber hinaus nimmt sie als endokrines Organ Einfluss auf die Hämodynamik, Erythropoese und den Knochenstoffwechsel. Bei einer eingeschränkten Nierenfunktion führt diese Multifunktionalität zu einer komplexen Dysregulation des Organismus.

In Europa wurden 2007 mehr als 175.000 Patienten aufgrund einer Niereninsuffizienz mit einer Nierenersatztherapie behandelt. Weltweit leiden über eine Million Menschen an einer terminalen Niereninsuffizienz. Die Prävalenz für eine chronische Nierenerkrankung (cNE) als wichtiger Risikofaktor für ein terminales Nierenversagen wird 50 bis 100fach höher geschätzt (Satko et al., 2007; Holubarsch, 2007). Epidemiologische Daten deuten zudem darauf hin, dass die Anzahl chronisch Nierenkranker weiter ansteigen wird und ihre Relevanz für das weltweite Gesundheitssystem noch zunimmt. In der US-Bevölkerung stieg die Prävalenz von 10,3% zwischen 1988 und 1994 auf 13% in den Jahren 1999 bis 2004 an (Coresh et al., 2007). Die Zunahme wird zudem reflektiert in einem Anstieg terminal niereninsuffizienter Patienten. In Deutschland stieg deren Prävalenz von 1999 mit 724/1 Mio. Einwohner auf 1.114/1 Mio. Einwohner im Jahr 2006 (USRDS - <http://www.usrds.org/adr.htm>). In Anbetracht der demografischen Entwicklung hin zu einer alternden Bevölkerung und der Zunahme nierenrelevanter Volkskrankheiten wie Bluthochdruck und Diabetes mellitus (DM) Typ II, ist von einem weiteren Anstieg auszugehen. Daher ist die Erforschung pathogenetischer Ursachen von entscheidender Bedeutung. Ziel ist es, Risikopatienten schneller zu identifizieren, sowie neue und verbesserte Therapieoptionen zu schaffen.

Die chronische Niereninsuffizienz (cNI), definiert als struktureller oder funktioneller Nierenschaden über drei Monate mit oder ohne Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR), führt langfristig nicht nur zu einer terminalen Niereninsuffizienz, sondern ist mit einer deutlich erhöhten kardiovaskulären Mortalität assoziiert (National Kidney Foundation, 2002; de Jong et al., 2008). Betrachtet man die Ursachen der cNI, findet sich die höchste Inzidenz für diabetische, gefolgt von hypertensiven

Nephropathien. Das Patientenkollektiv von Diabetikern und Bluthochdruckkranken stellt somit die Hauptrisikogruppe für renale Erkrankungen dar (Broeckel et al., 1998, Holubarsch, 2007). Doch bei weitem nicht alle dieser Patienten erleiden im Krankheitsverlauf eine cNI. Dies deutet darauf hin, dass weitere Faktoren Einfluss auf die Entwicklung chronischer Nierenschäden nehmen. Neben klinischen Suszeptibilitätsfaktoren wie etwa einer reduzierten funktionalen Nierenmasse, Autoimmunerkrankungen oder rezidivierende Harnwegsinfektionen finden sich ebenso soziodemografische Risikofaktoren wie ein hohes Lebensalter oder ein geringes Einkommen (Levey et al., 2003). Zudem belegen Studien, dass eine cNI familiär gehäuft auftritt und bspw. eine positive Familienanamnese den wichtigsten Risikofaktor für eine diabetische Nephropathie darstellt (Satko et al., 2007). Zusätzlich findet sich ein erhöhtes Risiko für eine cNI in bestimmten ethnischen Bevölkerungsgruppen wie bspw. den Afroamerikanern und den Ureinwohnern Australiens (Bowden et al., 2004; van Dijk, 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass genetische Suszeptibilitätsfaktoren pathogenetisch von entscheidender Bedeutung sind.

1.2 Albuminurie – Kennzeichen einer cNE und Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen

Neben Nierenfunktionsparametern wie der GFR, stellt die Protein- und im Besonderen die Albuminausscheidung im Urin den wichtigsten Marker einer funktionellen und/oder strukturellen Nierenschädigung dar (National Kidney Foundation, 2002). Die Albuminurie (U_{Alb}) gilt hierbei v.a. als Marker einer glomerulären Schädigung und hat sich als Assessmentfaktor für Inzidenz und Schweregrad in der cNE-Forschung etabliert.

Täglich produziert der Mensch ca. 180 Liter nahezu eiweißfreien Primärharn. Dies erfordert eine Retention von etwa 40 g Albumin pro Liter. Bewerkstelligt wird dies durch den glomerulären Filter, bestehend aus dem glomerulären Endothel, der Basalmembran und den Podozytenfortsätzen. Ist dieser Filter in seiner Struktur oder Funktion beeinträchtigt, gelangt Albumin in den Urin (Huber, Benzing, 2005). Bei einem Proteinverlust $>3,5$ g/24h führt dies zu einem nephrotischen Syndrom mit Hypoalbuminämie, Ödemen und Hyperlipidämie. Jedoch stellen geringere U_{Alb} -Mengen ebenfalls eine relevante pathologische Größe dar. Bereits Anfang der 80er Jahre konnte die Mikroalbuminurie (MA), eine Albuminausscheidung von 30-140 $\mu\text{g}/\text{min}$, als Prädiktor für eine diabetische Nephropathie bei DM Typ I-Patienten ermittelt werden. Sie ging mit einem 24fach höheren Risiko für die Betroffenen einher (Viberti et al., 1982).

Definiert wird die Mikroalbuminurie heute als eine Albuminausscheidung von 30-300 mg/24h und gilt als Marker chronischer Nierenschäden und prädiktiver Wert für eine diabetische bzw. hypertensive Nephropathie (Leitlinien DHL, 2008). Höhere Werte werden als Makroalbuminurie bezeichnet. Neben der prognostischen Bedeutung für Nephropathien geht die MA darüber hinaus mit einem deutlich erhöhten kardiovaskulären Risiko einher (Bigazzi et al., 1998; Jensen et al., 2000; Gerstein et al., 2001). Eine Assoziation der MA konnte außerdem für Schlaganfälle, die peripher arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und die Gesamtmortalität belegt werden (Jager et al., 1999). Des Weiteren scheint das Risiko für die Entwicklung von Malignomen erhöht zu sein (Agewall et al., 1997, Hillege et al., 2002).

Bedeutsam ist dies vor dem Hintergrund, dass die Prävalenz der MA bei Diabetikern ca. 16% und bei Hypertonie-Patienten ca. 12% beträgt (Hillege et al., 2001). Ebenso tritt die MA unabhängig von Bluthochdruck oder Diabetes mit einer Prävalenz von 5,1-6,6% in der Allgemeinbevölkerung auf (Hillege et al., 2001; Jones et al., 2002; Atkins, 2005). Die MA ist demnach anders als lange vermutet nicht nur auf spezielle Risikogruppen limitiert. Studien belegen, dass die MA in einer augenscheinlich gesunden Kohorte mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert ist (Hillege et al., 2002; Romundstad et al., 2003; Arnlöv et al., 2005). Dabei scheint eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Höhe der U_{Alb} und dem assoziierten Risiko zu bestehen (Hillege et al., 2002).

Das Auftreten einer pathologisch erhöhten Albuminausscheidung stellt somit einen relevanten prognostischen Marker sowohl für renale, als auch für kardio- und cerebrovaskuläre Erkrankungen dar und zwar unabhängig von zusätzlichen klassischen Risikofaktoren. Dieses Risiko ist umso höher, wenn gleichzeitig eine Bluthochdruckerkrankung und/oder ein DM vorliegen.

Der Zusammenhang zwischen der U_{Alb} und vaskulären Erkrankungen ist bisher nicht geklärt. Möglicherweise ist der glomeruläre Albuminverlust Ausdruck einer allgemeinen Vaskulopathie, die gleichfalls andere Organe wie Herz und Gehirn involviert. Aufgrund einer erhöhten Permeabilität für Proteine wie Albumin, Lipoproteine und weitere Plasmaproteine wird in der Gefäßwand eine Entzündung induziert und ein artherosklerotischer Prozess initiiert (Deckert et al., 1989; Jager et al., 1999).

Kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität stellen nach wie vor eines der wichtigsten Probleme des Gesundheitssystems der westlichen Industrieländer dar. Neben den

klassischen Risikofaktoren, wie beispielsweise Hypertonie, Diabetes, Übergewicht und ein hohes Lebensalter, hat sich die cNE als ein entscheidender Faktor herausgestellt. Die Erforschung pathogenetischer Grundlagen der U_{Alb} , als cNE-Marker, birgt daher diagnostische und therapeutische Möglichkeiten in der Bewältigung kardiovaskulärer, als auch renaler Erkrankungen.

1.3 Albuminurie - ein quantitatives, komplexes Merkmal

Die Entschlüsselung des humanen Genoms sowie das anderer Säugetiere ermöglicht die gezielte Analyse von genetischen Einflüssen auf die Pathogenese des Menschen. In der Humangenetik konnten bereits zahlreiche Ursachen für monogenetische Erkrankungen identifiziert werden. Dies führte u. a. zur Identifizierung verschiedener Genmutationen in der Pathogenese monogenetischer Nierenerkrankungen. Mutationen im Coll4A5-Gen konnten als Ursache für das X-chromosomal erbliche Alportsyndrom (Barker et al., 1990) und PKD1 und PKD2 als kausale Gene für die autosomal dominante Form der polyzystischen Nierenerkrankung identifiziert werden (Mochizuki et al., 1996).

Doch wesentlich zahlreicher und verbreiteter sind Erkrankungen, welche durch viele Gene und deren komplexe Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen beeinflusst werden. Sie werden als multifaktorielle bzw. komplexe Erkrankungen bezeichnet. Der Pathomechanismus wesentlicher Erkrankungen, welche den Großteil der adulten Bevölkerung betreffen, so z. B. Herz-Kreislaufkrankungen, DM und ebenso die cNE weisen eine solche komplexgenetische Komponente auf. Durch mehrere genetische Loci (polygenetisch) wird die Suszeptibilität eines Individuums für diese Erkrankungen definiert und von Umweltfaktoren, welche diese triggern oder vor ihnen schützen können, beeinflusst (Ecogenetik). Die genetischen Loci interagieren hierbei z. T. additiv, aber ebenso auf wesentlich kompliziertere Weise (Epigenetik). Neben speziellen Krankheitsbildern werden ferner bestimmte phänotypische Merkmale wie zum Beispiel der Blutdruck und die U_{Alb} komplex vererbt.

Anhand von Familienuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die U_{Alb} eine deutliche genetische Komponente aufweist und durch mehrere Gene beeinflusst wird (Fogarty et al., 2000a, Fogarty et al., 2000b). Mit Hilfe von Kopplungsanalysen konnten gezielt chromosomale Regionen identifiziert werden, die auf das quantitative Merkmal U_{Alb} wirken. Diese werden als Quantitative Trait Loci (QTL) bezeichnet. Sie konnten u. a. auf den langen Armen der Chromosomen 2, 5, 7, 8, 15, 20 und 22 detektiert werden

(Fox et al., 2005; Krolewski et al., 2006; Arar et al., 2007, Iyengar et al., 2007). Bei Familien mit Bluthochdruck ist eine erbliche Komponente für das Auftreten einer U_{A1b} auf Chromosom 19 und 12 nachgewiesen worden (Freedman et al., 2003; Leon et al. 2007). Genetisch determiniert ist die U_{A1b} ebenso in der Allgemeinbevölkerung ohne Begleiterkrankungen (Fox et al., 2005; Arar et al., 2007). Diese verschiedenen Suszeptibilitätsloci beeinflussen abhängig von Diabetes und Hypertonie, sowie Umweltfaktoren, das Risiko eines Individuums für die Ausprägung einer U_{A1b} . Dabei variieren die kausalen Gene zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen und folgen überwiegend einem rezessiven Vererbungsmodus (Leon et al, 2007).

1.4 Tierversuche bei der Untersuchung komplexer Erkrankungen

Die Analyse von komplexen Erkrankungen beim Menschen birgt die Schwierigkeit der genetischen Heterogenität. Der genetische Hintergrund nimmt als Störfaktor entscheidenden Einfluss auf die Wirkung einzelner Gene eines komplexen Phänotyps (Cowley et al., 2004). Dies senkt die statistische Aussagekraft von Assoziationsstudien beim Menschen, welche daher häufig keine signifikanten bzw. reproduzierbaren Ergebnisse liefern. Große Studiengruppen, verbunden mit einem hohen Kostenaufwand sind erforderlich, um repräsentative Ergebnisse zu gewährleisten (Kreutz et al., 1992; Stoll et al., 2001). Hinzu kommt, dass die Variabilität an Umweltbedingungen Aussagen über genetische Einflüsse erschwert. Eine verminderte Penetranz, variable Expressivität und Pleiotropie, Faktoren, welche multifaktorielle Merkmale kennzeichnen, gestalten die Analyse zusätzlich schwierig (Glazier et al, 2002). Daher haben sich in der experimentellen Forschung verschiedene Modellorganismen etabliert, zu denen u. a. die Ratte gehört.

Die Wanderratte, *Rattus norvegicus*, fand bereits im 19. Jahrhundert Einzug in die Laboratorien und damit in die wissenschaftliche Forschung. Mittlerweile zählt sie neben der Maus zu den am häufigsten verwendeten Säugetiermodellen der medizinischen Forschung (Hedrich, 2000). Die Ratte findet Anwendung in zahlreichen Untersuchungen zu Erkrankungen des kardiovaskulären, renalen und metabolischen Systems und stellt das wichtigste Tiermodell in der Untersuchung chronischer Nierenerkrankungen dar (Hedrich, 2000). Sie eignet sich durch ihre Größe verglichen mit dem zweitwichtigsten Versuchsmodell, der Maus, hervorragend für manipulative Experimente der Physiologie. Vorteile stellen insbesondere eine einfache, gut kontrollierbare Zucht und Haltung, sowie eine relativ kurze Generationsdauer bei Tragzeiten von 20 Tagen dar. Vor allem

Inzuchtstämme haben sich in den letzten 20 Jahren als wichtige wissenschaftliche Ressource bewährt. Der vermutlich erste Albinoinzuchtrattenstamm wurde 1909 von Helen Dean am Wistar-Institut in Philadelphia etabliert (Hedrich, 2000). Die heutigen Stämme gehen v.a. auf die Wistar- und die Sprague-Dawley-Ratte zurück. Inzuchtratten weisen durch eine strikte Bruder-Schwester-Verpaarung über mindestens 20 Generationen eine bis zu ca. 99%ige genetische Homogenität der Nachkommen auf (Rapp, 2000). Sie umgehen damit eines der größten Probleme humangenetischer Studien, die genetische Heterogenität (Cowley et al., 2004). Durch selektive Verpaarung von Tieren eines speziellen Phänotyps können Merkmale genetisch fixiert werden. Mittlerweile existieren zahlreiche Inzuchtrattenstämme, welche spontan Erkrankungen wie die essentielle Hypertonie und eine cNE entwickeln und daher ideale Modellorganismen für die Analyse ihrer genetischen Grundlagen darstellen (Hedrich, 2000; James, Lindpaintner, 1997).

Durch eine Entschlüsselung des Rattengenoms 2004 steht der Wissenschaft zusätzlich eine Fülle an genetischen Informationen zur Verfügung. Das Genom der Ratte umfasst ca. 2,75 Gb und rund 20.973 Gene. Das Rat Genome Sequence Project Consortium schätzt, dass ca. 90% der Rattengene Orthologe beim Menschen besitzen (Gibbs et al., 2004). Beinahe alle bekannten krankheitsrelevanten Gene des Menschen sind bei der Ratte vorhanden (Gibbs et al., 2004). Dies bestärkt die Relevanz der Ratte als Organismus für die Erforschung von genetischen Erkrankungen des Menschen.

1.5 Strategien zur Identifizierung von Genen komplexer Merkmale

Bei der U_{Alb} handelt es sich um ein quantitatives Merkmal. Ihre Ausprägung kann auf einer kontinuierlichen metrischen Skala abgebildet werden (kontinuierliche Variation). Sie schwankt zwischen verschiedenen Individuen, stellt eine wichtige Größe im Hinblick auf Krankheitsrisiko und Mortalität dar und wird multifaktoriell beeinflusst.

Die Identifizierung genetischer Faktoren, die quantitative Merkmale beeinflussen, gestaltet sich aufgrund ihrer Komplexität sehr schwierig. Da sie jedoch die Möglichkeit der Entwicklung spezifischer therapeutischer oder präventiv-therapeutischer Maßnahmen, sowie eines individuellen Risikomanagements birgt, ist sie Schwerpunkt zahlreicher Forschungsarbeiten.

Die Quantifizierung des genetischen Einflusses auf ein Merkmal erfolgt nach dem Konzept der Heritabilität. Sie gibt jedoch keinen Aufschluss über spezifische chromosomale Regionen. Ein gängiges Verfahren hierzu ist die Kandidatengenanalyse,

bei der bereits bekannte Gene, welche Einfluss auf die Krankheitspathogenese nehmen könnten, untersucht werden. Diese Annahme beruht auf der Funktion des Genprodukts bzw. seiner Relevanz für andere Nierenerkrankungen. Beispiele für Kandidatengene von Nierenerkrankungen stammen aus der Gruppe der Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stickstoffmonoxid(NO)-Synthetasen. Meist in Form von Fall-Kontrollstudien werden Sequenzunterschiede (Allelfrequenzen, RFLPs) im Kandidatengenloкус untersucht. Studien basierend auf der Kandidatengenanalyse haben beispielsweise einen ACE-Polymorphismus bei Patienten mit DM-Typ I- und -II-Nephropathie nachweisen können (Bowden, 2003).

Eine wesentlich aufwendigere Methode stellen sogenannte trait-driven oder phenotype-driven Methoden dar, welche ausgehend vom Phänotyp nach zugrundeliegenden Genen fanden. In ihre Domäne fallen Genomanalysen und QTL-Kartierungen (Phillips, Belknap, 2002). Sie haben den Vorteil, dass sie neue, noch unbekannte Gene identifizieren können und somit nicht auf das derzeitig limitierte Wissen über Erkrankungen begrenzt sind (Kreutz et al., 1992; Bowden, 2003; McBride et al., 2004). Ein solches Verfahren stellen Kosegregations- und Kopplungsanalysen dar, mittels derer chromosomale Regionen identifiziert werden, welche ein oder mehrere Gene enthalten, die Einfluss auf ein Merkmal nehmen. Ihre wichtigste Grundlage stellen Mikrosatellitenmarker dar. Dabei handelt es sich um repetitive Nukleotidsequenzen. Sie treten überwiegend in den nichtkodierenden DNA-Abschnitten auf, können hinsichtlich ihrer Länge zwischen verschiedenen Individuen hoch polymorph sein und dienen als topografische Chromosomenmarker (Kreutz et al., 1992; Rapp, 2000).

Marker, die räumlich nahe zu einem das Merkmal beeinflussenden Gen liegen, werden mit diesem gekoppelt vererbt. Die Wahrscheinlichkeit einer genetischen Rekombination (Crossing over) ist aufgrund ihrer räumlichen Nähe geringer, als für weiter entfernt liegende Marker, die dementsprechend unabhängig vom Phänotyp vererbt werden (Rapp, 2000). Daher kosegregieren bestimmte Marker mit dem untersuchten Merkmal innerhalb einer Population. In einer Kopplungsanalyse werden anschließend mithilfe einer Computersoftware wie MAPMAKER Chromosomenkarten der verwendeten Mikrosatellitenmarker erstellt und jeder Marker hinsichtlich einer Merkmalskopplung analysiert (Lander, Green, 1987). Auf diese Weise konnten bereits zahlreiche QTL bei verschiedenen Inzuchtrattenstämmen identifiziert werden.

Da jedoch abhängig von der Markerdichte die detektierten QTL-Regionen meist 10-30 cM, also ca. 400-600 Gene umspannen, sind diese zu groß, um über

Positionsklonierungen oder Sequenzierungen Kandidatengene zu identifizieren (Glazier, Nadeau, Aitman, 2002). Um den Einfluss eines QTL auf den Phänotyp zu prüfen und seinen komplexen Pathway in der Krankheitsgenese genauer untersuchen zu können, hat sich die Zucht von konsomen Stämmen etabliert (Cowley, Roman, Jacob, 2004). Dabei wird durch gezielte Verpaarung das QTL-tragende Chromosom eines Donorstamms in das Hintergrundgenom des bezüglich des Merkmals kontrastierenden Rezipientenstamms verbracht oder vice versa.

Weil die Heterogenität des genetischen Hintergrunds in Kopplungs- und Segregationsstudien QTL modifizieren oder sogar maskieren kann, ist eine Validierung der identifizierten QTL durch einen konsomen Stamm essentiell. Ebenso wichtig ist die Tatsache, dass sie im Gegensatz zu den parental Kontraststämmen eine wesentlich geringere genetische Variabilität zum Empfängerstamm aufweisen, gleichzeitig jedoch ebenfalls bezüglich des Merkmals kontrastieren. Damit stellen konsome Stämme wichtige Vergleichsstämme dar. Sie sind aufgrund ihrer genetischen Homogenität zum kranken Stamm beispielsweise bei differentiellen Expressionsanalysen aussagekräftigere Modelle als der parentale Kontraststamm. Die Variabilität in der Expression eines Gens basiert bei konsomen Stämmen ausschließlich auf dem Austausch einzelner Chromosomen und deren Einfluss auf verschiedene physiologische Pathways (Cowley, Roman, Jacob, 2004). In einem weiteren Schritt können über die Zucht kongener Linien, ausgehend von den konsomen Stämmen, die detektierten QTL-Regionen auf bis zu 0,5 cM, entspricht ca. 20 Genen bei der Ratte (Rapp, 2000), eingegrenzt werden. Über z. B. Positionsklonierungen, differenzielle Genexpressionsanalysen und Sequenzierungen wird die Identifizierung relevanter Gene ermöglicht (McBride et al., 2004). Diese können anschließend über vergleichende Genomanalysen beim Menschen detektiert und in kontrollierten klinischen Studien hinsichtlich ihrer Relevanz für den Menschen geprüft werden (Cowley et al., 2004; McBride et al., 2004).

Bis heute sind etwa 1.500 QTLs verschiedenster physiologischer und pathophysiologischer Merkmale bei der Ratte publiziert worden (<http://rgd.mcw.edu/>). Lazar et al. verwiesen auf 95 QTLs allein im Zusammenhang zur Nierenphysiologie und Urinchemie, weitere 38 standen in Zusammenhang mit der Nierenmorphologie. Mindestens 118 QTLs konnten durch kongene Linien verifiziert und viele davon auf wenige Kandidatengene eingegrenzt werden (Lazar et al., 2005).

1.6 Die kontrastierenden Inzuchtrattenstämme MWF und SHR

Die Munich Wistar Frömter-Ratte (MWF) wurde ursprünglich für Mikropunktionsstudien selektiv auf eine möglichst hohe Anzahl oberflächlicher Glomeruli gezüchtet. Sie entstammt dem Munich Wistar-Stamm und wurde im Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover etabliert. Bei MWF findet sich daher eine relativ hohe Anzahl Glomeruli im sonst glomerulifreien Cortex corticis mit und ohne direkten Kontakt zur Nierenkapsel (Hackbarth et al., 1983). Zusätzliche Merkmale machen den Inzuchtstamm MWF zu einem hochinteressanten genetischen Modell chronischer Nierenerkrankungen. Es zeigte sich, dass MWF-Ratten eine erhöhte Protein- und Albuminausscheidung, sowie einen mäßigen spontanen arteriellen Bluthochdruck entwickeln (Kreutz et al., 2000; Hackbarth et al., 1991). Altersverlaufsstudien ergaben eine ausgeprägte Proteinurie bzw. Albuminurie bei bereits jungen Tieren, die im Alter progredient verläuft. (Kreutz et al., 2000; Schulz et al., 2002; Schulz et al. 2003). Dabei wird als Ausdruck einer zunehmenden Dysfunktion der glomerulären Filtration hauptsächlich Albumin ausgeschieden (Kreutz et al., 2000; Remuzzi et al., 1988). Neben einer progressiven Glomerulosklerose weisen MWF-Ratten einen erhöhten Bowmankapsel-Durchmesser auf (Hackbarth et al., 1983). Eine glomeruläre Hypertrophie konnte bereits vor Manifestation der U_{Aib} und der fokal segmentalen Glomerulosklerose festgestellt werden (Ijpelaar et al., 2008).

Übereinstimmend mit der Hypothese, dass eine reduzierte Nephronanzahl über kompensatorische Mechanismen, wie einer glomerulären Hyperfiltration, zu einem progressiven Verlust der Nierenfunktion führe (Hostetter et al., 1981), wurde bei MWF eine 30-40% geringere Nephronanzahl im Vergleich zu nierengesunden SHR- und Lewis-Ratten festgestellt (Fassi et al., 1998; Schulz et al., 2007). Neuere Daten zeigen jedoch, dass der Nierenschaden bei MWF nicht ausschließlich durch die reduzierte Nephronanzahl bedingt ist (Schulz et al., 2008a).

Weiterführende qualitative Untersuchungen der glomerulären Schäden zeigten eine reduzierte Podozytenanzahl und glomeruläre Hypertrophie bei alten MWF Tieren mit progressiver Nephropathie (Macconi et al., 2006; Ijpelaar et al., 2008). Anhand von Kosegregations- und Kopplungsanalysen konnte gezeigt werden, dass die U_{Aib} bei MWF einen polygenetisch determinierten Phänotyp darstellt (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003).

Zur Detektion genetischer Faktoren in der Pathogenese von Nierenschäden bei MWF fungiert als kontrastierender Inzuchtstamm die spontan hypertensive SHR-Ratte

(spontaneously hypertensive rat). Sie eignet sich aufgrund einer physiologischen U_{Alb} bei mäßig erhöhtem systolischem Blutdruck (Karlsen et al., 1997; Poyan Mehr et al., 2003; Schulz et al. 2003) hervorragend als Referenzstamm.

Erstmals beschrieben wurde SHR 1963 von Okamoto und Aoki. Sie generierten über die Kreuzung hypertensiver Tiere eines Wistarauszuchtstamms und anschließend wiederholt selektive Verpaarung der Nachkommen mit den höchsten Blutdrücken über sechs Generationen eine Population, die zu 100% einen spontanen Bluthochdruck von systolisch bis zu 200 mmHg aufwies (Okamoto, Aoki, 1963).

1.7 Kopplungsanalysen und weiterführende Studien bei der MWF-Ratte

Über Kosegregations- und Kopplungsanalysen mit dem kontrastierenden Inzuchtstamm Lewis (Lew) wurden bei MWF vier U_{Alb} -QTL auf den Rattenchromosomen (RNO)1, 6, 12 und 17 detektiert.

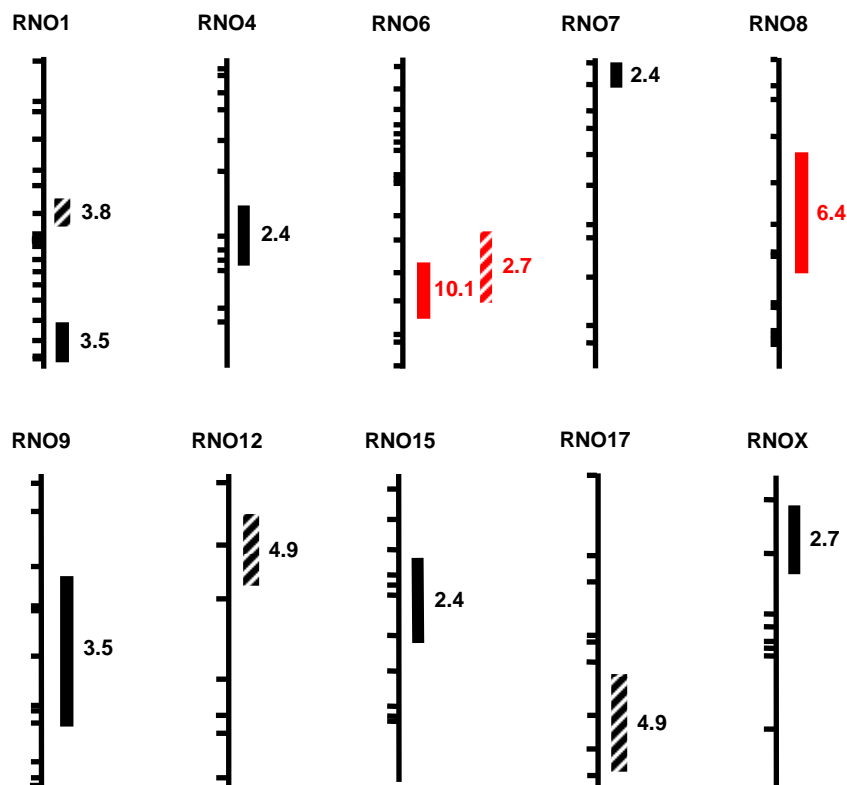


Abb. 1: Darstellung der detektierten Albuminurie-QTL bei MWF.

Die abgebildeten QTL resultierten aus einer BC-Analyse mit dem Kontraststamm SHR bzw. Lew (quergestreift). Es sind die einzelnen Chromosomen der Ratte mit den verwendeten Mikrosatellitenmarkern dargestellt. Der vertikale Balken kennzeichnet das QTL (1-Lod-Intervall). Angegeben ist der jeweilige LOD-Score als Maß der Kopplungswahrscheinlichkeit. Bei einem $\text{LOD} \geq 3,3$ liegt eine signifikante Kopplung und bei einem $\text{LOD} \geq 1,9$ eine wahrscheinliche Kopplung vor.

Bei Analysen mit dem kontrastierenden Inzuchtstamm SHR waren es acht U_{Alb} -QTL auf RNO1, 4, 6, 7, 8, 9, 15 und X (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003).

Der QTL auf RNO6 konnte als einziger bei beiden Kopplungsanalysen identifiziert werden. Diese Befunde spiegeln den Einfluss des kontrastierenden Hintergrundgenoms wieder. Krankmachende genetische Faktoren können auf diese Weise durch das Einbringen oder den Wegfall protektiver Faktoren maskiert bzw. demaskiert werden. Der RNO6-QTL wies bei der Analyse von MWF und SHR eine signifikante Kopplung mit dem Auftreten einer frühzeitigen U_{Alb} bereits in der 8. Woche auf. Die Signifikanz der Kopplung nahm über die 14. und 24. Woche weiter deutlich zu. Zudem fand sich eine Kopplung zur renalen interstitiellen Fibrose, sowie zur Anzahl oberflächlicher Glomeruli auf RNO6 (Schulz et al., 2003). Um die QTL-Relevanz zu eruieren, erfolgte die Zucht der konsomen Linie MWF-6^{SHR}. Dazu wurde RNO6 des Referenzstamms SHR mithilfe eines markergestützten Zuchtprogramms in den genetischen Hintergrund von MWF verbracht. Die Befunde zeigten, dass durch den Austausch von RNO6 die U_{Alb} in der 8. Woche im Vergleich zum MWF-Stamm komplett eliminiert werden konnte. Im weiteren Altersverlauf konnte der progressive Anstieg der U_{Alb} der MWF-Ratte durch den Transfer von SHR-RNO6 im konsomen MWF-6^{SHR} ebenfalls hoch signifikant reduziert werden (Schulz et al., 2007).

Ein zweiter sehr bedeutender QTL für die Entwicklung einer späten Albuminurie bei adulten Tieren befindet sich auf RNO8, das eine signifikante Kopplung zur U_{Alb} bei älteren Tieren ab der 14. Woche aufwies. Zur Verifizierung dieses zweiten wichtigen QTLs wurde mit MWF-8^{SHR} ein weiterer konsomer Stamm gezüchtet und etabliert. Bei diesem wurde analog zum MWF-6^{SHR} SHR-RNO8 nach MWF transferiert. Interessanterweise konnte bei MWF-8^{SHR} die U_{Alb} bei acht Wochen alten Tieren ebenfalls hoch signifikant verringert werden. Im Altersverlauf bis zur 32. Woche zeigte sich eine ähnliche signifikante Reduktion der U_{Alb} wie beim konsomen Stamm MWF-6^{SHR} (Schulz et al., 2008a).

1.8 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den doppelkonsomen Stamm MWF-6^{SHR}8^{SHR}, welcher RNO6 und RNO8 von SHR im isogenetischen Hintergrund von MWF trägt, sowohl genotypisch, als auch im Altersverlauf über 52 Wochen phänotypisch hinsichtlich der Nierenfunktion, -struktur und verschiedener renaler Expressionsmarker zu charakterisieren. Dies erfolgte nach einem definierten Protokoll und ermöglichte

vergleichende Analysen zu den einzelkonsomen Stämmen MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} sowie zu den Parentaltierstämmen SHR und MWF. Obwohl weitere zehn U_{Alb} -QTL im MWF-Hintergrund erhalten blieben, war die U_{Alb} in beiden einzelkonsomen Stämmen beinahe vollständig aufgehoben. Darüber hinaus waren sowohl die Proteinausscheidung und histologische Nierenschäden z. T. fast vollständig eliminiert. Vor diesem Hintergrund sollte der gemeinsame Einfluss zweier protektiver SHR-Chromosomen auf den Phänotyp im kranken MWF-Hintergrund untersucht werden. Insbesondere mögliche additive oder komplexe QTL-Interaktionen sollten hierüber ermittelt werden.

Zusätzlich wurde der systolische Blutdruck und dessen Bedeutung für den albuminurischen Phänotyp von MWF-Tieren untersucht. Ein weiterer Schwerpunkt galt der vergleichenden Analyse renaler Parameter von weiblichen und männlichen doppelkonsomen Ratten bei einem für MWF bekannten sexuellen Dimorphismus der Nierenfunktion.

Die vorliegende Arbeit soll eine wichtige Grundlage für weiterführende Studien sein, welche der Identifizierung von Kandidatengenomen der U_{Alb} beim MWF-Stamm dienen. Durch vergleichende Genomanalysen könnten die bei der MWF-Ratte identifizierten Gene anschließend den syntänen humanen Chromosomen zugeordnet werden. In weiterführenden Studien ließe sich ihre Relevanz bei Menschen mit albuminurischen Nierenerkrankungen prüfen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Radionukleotide und Antikörper

| Substanz | Firma |
|---|------------|
| [γ - ³² P]dATP (10 mCi/ml, 300 Ci/mmol, wässrige Lösung) | Amersham |
| 10x PCR-Puffer | Promega |
| 10x TBE (Tris-Borat-EDTA-Lösung) | Gibco BRL |
| Aceton | Baker |
| Acrylease | Stratagene |
| Agarose | Roth |
| Ammoniumpersulfat | Sigma |
| Bromphenolblau, Natriumsalz | Merck |
| Chloroform | Sigma |

| | |
|--|-------------------------|
| DEPC (Diethylpyrocarbonat) | Sigma |
| Diethylmalonsäure (98%) | Aldrich 24 |
| Di-Natrium-EDTA-Dihydrat (Titrierkomplex II, MG 372,24) | Roth |
| dNTPs (2mM) | Promega |
| EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) | Roth |
| Esketaminhydrochlorid (Ketanest®S) 25 mg/ml | Pfizer |
| Essigsäure (100%) | Roth |
| Ethanol (100%) | J.T. Baker |
| Ethidiumbromid (10mg/ml) | Merck |
| First Strand cDNA Synthesis Kit | Fermentas Life Sciences |
| Formaldehyd (37%) | J.T. Baker |
| Formamid | Merck |
| Gelatine (75 bloom) | Sigma |
| Glycerin | Roth |
| Harnstoff | Roth |
| Hydrogenperoxide (30%) | Sigma |
| Isopropanol | Sigma |
| Kaliumchlorid | Merck |
| Kaliumhydroxid (1 N) | Aldrich 31 |
| Kinase-10x-Puffer | Promega |
| Magnesiumchlorid (50 mM) | Promega |
| Methanol | J.T. Baker |
| Natriumchlorid | Merck |
| Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat | Merck |
| Natriumhydrogencarbonat (0,1 M, ACS 99%) | Aldrich 23 |
| Peroxidase konjugiertes Rattenalbumin-IgG | ICN |
| Primer und Sonden | Tib Molbiol, Genset |
| Ratten-Albumin | Sigma |
| Rotiphorese (40% Acrylamid, 2% Bisacrylamid) | Roth |
| Salzsäure (37%) | Merck |
| Schwefelsäure (96%) | Merck |
| SDS (Lauryl-Sulfate) | Sigma |
| SYBR Green PCR MasterMix | Applied Biosystems |
| TaqMan 2x Universal PCR MasterMix | Applied Biosystems |
| Temed (N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin) | Sigma |
| 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid (TMB-) Tabletten | Sigma |
| Trizma Base (MG 121,1) | Sigma |
| Trizol | Gibco BRL |

| | |
|----------------------------------|---------|
| Tween 20 | Bio Rad |
| Wasserstoffperoxid (30%) | Sigma |
| Xylazinhydrochlorid (Rompun®) 2% | Bayer |
| Xylen Cyanol FF | Sigma |

2.1.2 Enzyme

| | Enzym | Aktivität | Firma |
|-----------------------|--|-----------|-----------|
| Kinase | T4-Polynukleotidkinase | 5 U/μl | Promega |
| Polymerase | TaqPolymerase | 5 U/μl | Promega |
| Endoprotease | Proteinase K | 34 U/mg | Sigma |
| Reverse Transkriptase | M-MuLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus-RT) | 20 U/μl | Fermentas |

2.1.3 Puffer und Lösungen

| Puffer/ Lösung | Bestandteile | Konzentration |
|---------------------|--|----------------|
| Agarosegel 1%ig | Agarose | 0,4 g |
| | TBE | 40 ml |
| | Ethidiumbromid | 4 μl |
| Coating-Lösung | Ratten-Albumin-Stocklösung (1 g/l) | 0,1 ml |
| | Natriumhydrogencarbonat (0,1 M) | 500 ml |
| Formamid-Laufpuffer | Bromphenolblau | 1% |
| | Xylen Cyanol FF | 1% |
| | Formamid | 10% |
| | Di-Natrium-EDTA-Dihydrat | 0,5 M |
| Konjugatlösung | Peroxidase-markiertes Anti-rat-albumin-IgG | 100 μl |
| | Puffer A | 8,9 ml |
| 10x Laufpuffer | Glycerin | 50% |
| | Natriumhydrogenphosphat-1-hydrat | 10 mM, pH 7,0 |
| | Bromphenolblau | 0,25% |
| | Xylen Cyanol FF | 0,25% |
| Lysis-Puffer | Trizma Base | 50 mM, pH 8,0 |
| | Di-Natrium-EDTA-Dihydrat | 100 mM, pH 8,0 |
| | Natriumchlorid | 100 mM |
| | SDS | 1% |
| Mastermix, cDNA-Kit | 5xReaktionspuffer | 4 μl |
| | RNase-Inhibitor (20 U/μl) | 1 μl |
| | M-MuLV-RT | 2 μl |
| | dNTP (10mM) | 2 μl |
| Methacarn | Methanol | 60% |
| | Chloroform | 30% |
| | Essigsäure | 10% |
| PCR-Mastermix | 10xPCR Puffer | 1,30 μl |
| | MgCl ₂ (25 nM) | 0,78 μl |

| | | |
|----------------------------|---------------------------------|----------------|
| | dNTPs (2,5 mM) | 1,1 µl |
| | Aqua bidest, autoklaviert | 2,92 µl |
| Polyacrylamidgel-Lösung | Harnstoff | 31,5 g |
| | 10xTBE | 7,0 ml |
| | Rotiphorese (40% Acrylamid) | 10,5 ml |
| | Aqua bidest | 27,0 ml |
| Puffer-A | Diethylmalonsäure | 20 mM |
| | NaCl | 150 mM |
| | Di-Natrium-EDTA-Dihydrat | 0,1 mM, pH 8,0 |
| | Tween 20 | 0,1% |
| | Gelatine | 5 g |
| | Kaliumhydroxid | 1 M, pH 7,4 |
| | Aqua bidest | ad 1 l |
| Ratten-Albumin-Stocklösung | Rattenserum-Albumin | 2 mg |
| | Natriumhydrogencarbonat (0,1 M) | 2 ml |
| Substrat | 3,3',5,5'TMB | 2 Tabletten |
| | Puffer A | 10,2 ml |
| | Aqua bidest | 10,2 ml |
| | Schwefelsäure 30% | 4µl |
| 50x TAE | Trizma Base | 2 M |
| | Essigsäure 100% | 5,71% |
| | Di-Natrium-EDTA-Dihydrat | 50 mM |

2.1.4 Primer und Sonden

| Gen | Primer- und Sondensequenz |
|---------|---|
| 18S RNA | F: GGAGCCTGCGGCTTAATTT R: CAACTAAGAACGGCCATGCA |
| Aadat | F: CATTGCAAAAAGGGCTCCTGAATAC R: TGATAGGGGATGTCTTTTTGGCCA |
| Col3 | F: TGAAATTCTGCCACCCTGAACT R: CATCTTGCAGCCTTGGTTAGG S: FAM – AAGAGTGGAGAATACTGGGT – TAMRA |
| NGAL | F: GGCCGACACTGACTACGACC R: GCCCCTTGGTTCTTCCGTAC |
| PBGD | F: TGAAAACCTTGTACCCTGGCATA R: TCCAATCTTAGAGAGTGACAGTATCAAGA S: FAM – TTGAAATCATTGCTATGTCCACCACAGG - TAMRA |

Aadat, Aminoacidat Aminotransferase; Col3, Kollagen 3; NGAL, neutrophiles Gelatinase-assoziiertes Lipocalin; PBGD, Porphobilinogendeaminase; F, Forward-Primer; R, Reverse-Primer; S, Sonde.

2.1.5 Sonstige Materialien

| Artikel | Firma |
|---------------------------------------|--------------------|
| 96-well Optical Reaction Plates | Applied Biosystems |
| Bildanalyseprogramm Scion Image 1.62a | Scion Co. |

| | |
|--|----------------------|
| BioMax MR-1-Röntgenfilme (35x43) | Kodak |
| Edelstahlklemmen | Peq Lab |
| Gel-Blotting-Papier GB 002 | Schleicher & Schuell |
| Glasplatten für Polyacrylamidgele | Peq Lab |
| Greiner-Röhrchen 12 ml | Sarstedt |
| Haltungsfutter für Ratten und Mäuse (Normalfutter) | Altromin |
| Haifischzahnkamm Mikrotiterformat für Polyacrylamidgele | Peq Lab |
| Lochzange für Labortiere | Esculap |
| Makrolonkäfige Typ III und IV | Ebeco |
| Mehrkanalspritze (8-Kanal, 0-10 µl) | Hamilton |
| Multipipette Plus | Eppendorf |
| Objektträger | Menzel-Gläser |
| Optical Adhesive Cover | Applied Biosystems |
| Optical Cover Compression Pads | Applied Biosystems |
| Paketklebeband | Tesa |
| PCR-Tubes 0,2 ml | Biozym |
| Polystyrene Immulon microplates, flat bottomed, Immunosorp Maxisorp, F96 | Nunc |
| Rekationsgefäße Safe-Lock 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml | Eppendorf, Sarstedt |
| Restrainer | Werkstatt UKBF |
| Röntgenkassette Typ G (35x43) | Peq Lab |
| Schweißfolie | GENETIX |
| Spacer für Polyacrylamidgele | Peq Lab |
| Standardpipetten | Eppendorf |
| Standardtips 20 µl, 100 µl, 1000 µl | Eppendorf |
| Sterifilter Tips 0,5-10ul ART20E | Fisher Scientific |
| Sterifilter Tips 10-100ul ART100E | Fisher Scientific |
| Sterifilter Tips 100-1000ul ART20E | Fisher Scientific |
| Stoffwechsellkäfige für Ratten bis 300 g | Ehret |
| Szintillationsgefäße aus Glas | Packard |
| Szintillationsgefäße aus Kunststoff | Packard |
| Thermo-Fast 96-Mikrotiterplatten ohne Rand | ABgene |
| Tube 50 ml | Sarstedt |
| Verpackungsfolie | Saran |

2.1.6 Geräte

| Gerät | Firma |
|--|------------------------|
| ABI Prism 7000 Sequence Detection System | Applied Biosystems |
| Agarosegelkammer | Bio-Rad |
| Analysen-Waage BP 610 | Sartorius |
| Automat für Filmentwicklung X-OMAT 5000 RA | Kodak |
| Blutdruckmessgerät | TSM |
| Färbeautomat Robot-Stainer HM 760 | Microm |
| Folienschweißgerät | MDC |
| Kühlzentrifuge Vagifuge 3.0R | Heraeus Sepatech |
| Magnetrührer mit Heizfunktion MR 2002 | Heidolph |
| Mikrotiterplattenschüttler | Roth |
| Oszillationsdetektor | TSE Systems |
| PCR-Cycler | MJ Research |
| pH-Meter | Knick |
| Photomikroskop Axiophot | Carl-Zeiss, Oberkochen |
| Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer | Peq Lab |
| Rotationsmikrotom HM 355 | Microm |
| Spektralphotometer Nano Drop 1000 | Thermo Scientific |
| Stromversorgungsgerät für die Elektrophoresekammer | Biometra |
| Tischzentrifuge 5415 R | Eppendorf |
| Trockenschrank | Heraeus Instruments |
| Ultra-Turrax T25 | Janke & Kunkel |

2.2 Charakterisierung des Stamms MWF-6^{SHR}8^{SHR}

2.2.1 Haltung

Die im Rahmen der Dissertation durchgeführten tierexperimentellen Arbeiten wurden mit Genehmigung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo, G 0089/04) unter Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Die verwendeten Rattenstämme wurden in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM, Charité - Universitätsmedizin Berlin, CBF) sowie in den Tierställen im Institut der Klinischen Pharmakologie und Toxikologie (Charité, CBF) gehalten und etabliert. Die Haltung erfolgte getrennt nach Geschlechtern mit bis zu vier Tieren in Typ IV Makrolonkäfigen bei einer konstanten Raumtemperatur von 22°C. Die Tiere hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Wasser und einer üblichen Nagerkost mit 0,2% Natriumchlorid. Über eine automatisierte Lichtanlage wurde ein 12ständiger Tag-

Nachrhythmus simuliert. Die Kennzeichnung der Tiere erfolgte über ein Ohrlochmarkierungssystem in fortlaufender Nummerierung.

2.2.2 Zucht

2.2.2.1 Die Parentaltierstämme MWF und SHR

Die Parentaltierstämme MWF und SHR stammen aus den Kolonien der ingezüchteten Stämme MWF/_{Rkb} und SHR/_{Rkb} der FEM der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Der MWF/_{Rkb}-Stamm wurde 1996 aus Tieren der ursprünglichen Kolonie MWF/_{Ztm} aus dem Zentralen Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover am Universitätsklinikum (UKBF) der Freien Universität (FU) Berlin als MWF/_{Fub} eingeführt. Später erhielt er den Namen MWF/_{Rkb}. Der Stamm SHR/_{Rkb} ging 1997 an der FU Berlin aus Tieren der Zucht von M&B, Bomholtvej in Dänemark hervor. Bei beiden Stämmen handelt es sich um so genannte Inzuchtstämme, welche aufgrund einer strikten Bruder-Schwester-Verpaarung zu >99% genetisch homogen sind.

2.2.2.2 Die Zucht der konsomen Stämme MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR}

In der Detektion relevanter Genloci im Rahmen komplex-genetischer Erkrankungen hat sich die Zucht konsomer und kongener Inzuchtstämme als ein geeignetes Verfahren etabliert. Mithilfe genetischer Marker kann über ein definiertes Zuchtprotokoll ein ganzes Chromosom bzw. ein Chromosomenabschnitt in ein Empfängerstammgenom transferiert werden.

Die Zucht erfolgt über ein markergestütztes Selektionsprotokoll, welches es erlaubt, Tiere mit dem gewünschten Allelstatus gezielt zu verpaaren. Grundlage sind stammspezifische Mikrosatellitenmarker, welche die Differenzierung chromosomaler Abschnitte von Spender- und Empfängerstamm erlauben. Die markergestützte Genotypisierung aller Zuchttiere ermöglicht die Verpaarung der Tiere mit dem höchsten Anteil genetischer Homozygotie im gewünschten Genomabschnitt jeder Generation (Kreutz, Hübner, 2002; Cowley, Roman, Jacob, 2004).

Die einzelkonsomen Stämme MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhold Kreutz etabliert. Über ein spezielles Zuchtprotokoll wurde jeweils RNO6 bzw. RNO8 von SHR in den isogenetischen MWF-Hintergrund transferiert. Hierbei diente SHR als Donor- und MWF als Rezipientenstamm. Verpaart wurden SHR-Weibchen mit männlichen MWF-Tieren, um das Y-Chromosom von MWF zu konservieren. Es resultierte eine F1-Generation, welche gemäß den Mendelschen

Gesetzen, im gesamten Genom heterozygote Allele für MWF und SHR aufwies. Ausgehend von der F1-Generation wurde über eine Abfolge von Rückkreuzungen mit dem Empfängerstamm MWF der genetische Hintergrund zunehmend homozygot für die MWF-Allele (siehe Abb. 2), während die Zielchromosomen 6 bzw. 8 Heterozygotie aufwiesen. Schließlich erfolgten mehrere Intercross von Tieren der letzten Rückkreuzungspopulation. Statistisch gesehen, weisen etwa 25% der Tiere der daraus hervorgehenden Generation einen homozygoten Allelstatus für das Zielchromosom auf.

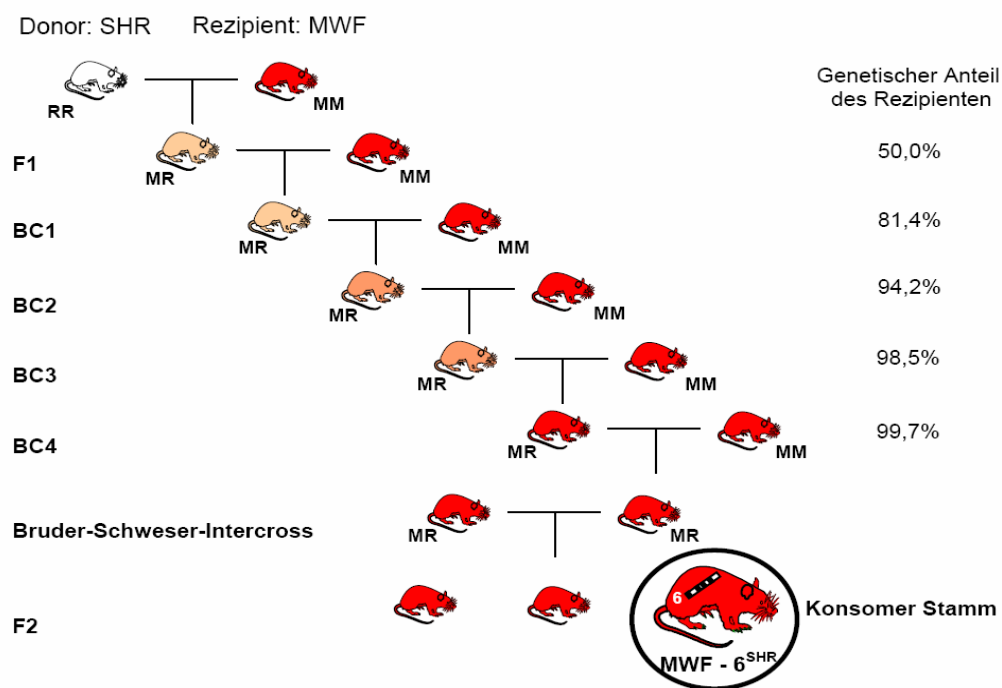


Abb. 2: Schematische Darstellung der Zucht eines konsomen Stamms am Beispiel von MWF-6^{SHR}.

M, MWF-Allel; R, SHR-Allel; F, Filialgeneration; BC, Backcrossgeneration.

2.2.2.3 Zucht des doppelkonsomen Stamms MWF-6^{SHR}8^{SHR}

Mittels der beiden einzelkonsomen Stämme MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} erfolgte die Zucht des doppelkonsomen Stamms MWF-6^{SHR}8^{SHR}. MWF-6^{SHR}8^{SHR} enthält sowohl RNO6 als auch RNO8 des Donorstamms SHR im ansonsten isogenetischen MWF-Hintergrund. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden MWF-8^{SHR}-Weibchen mit MWF-6^{SHR}-Männchen verpaart. Daraus resultierte eine F1-Generation, welche für RNO6 und RNO8 einen heterozygoten, auf allen anderen Chromosomen hingegen einen für MWF homozygoten Allelstatus aufwies. Ausgehend von dieser F1-Generation erfolgte die Etablierung über mehrere Intercrosse. Mithilfe des markerassistierten Selektionsprotokolls wurden jeweils diejenigen Tiere verpaart, welche den höchsten

Anteil homozygoter Allele für SHR auf den Zielchromosomen aufwiesen. Dabei erhöhte sich der genetische Anteil des Donors SHR in RNO6 und RNO8 mit jeder Generation, bis eine reine doppelkonsome Linie entstand (siehe Abb. 3). Die Erhaltungszucht erfolgte wieder durch eine strikte Inzucht der etablierten doppelkonsomen Tiere.

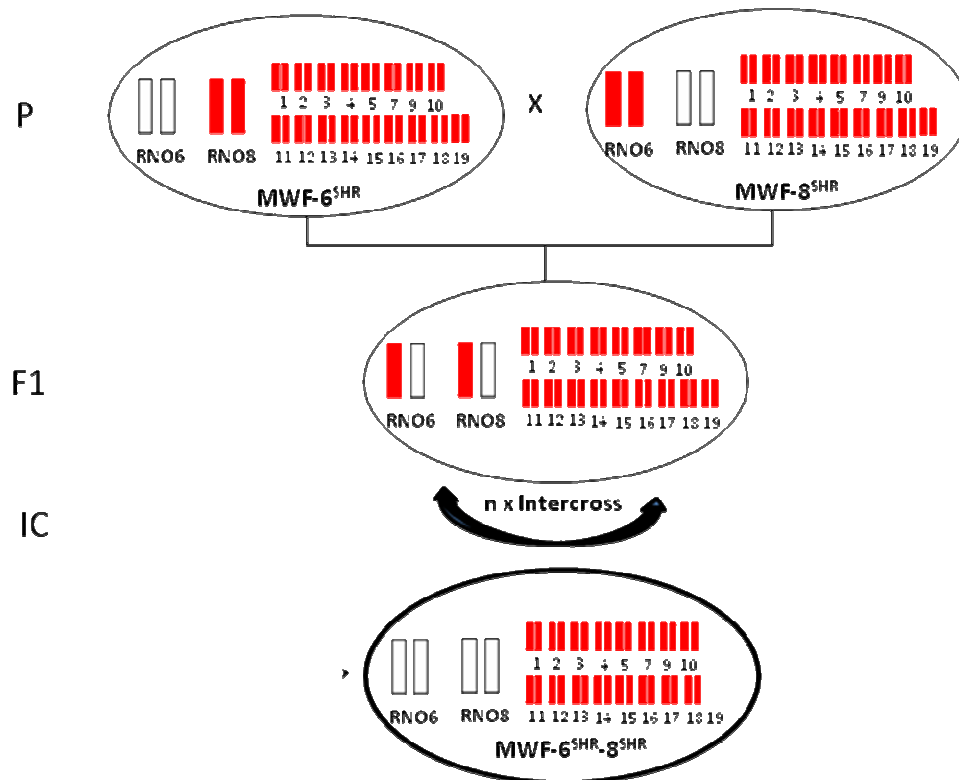


Abb. 3: Schematische Darstellung der Zucht des doppelkonsomen Stamms MWF-6^{SHR} x 8^{SHR} durch markergestütztes sequenzielles Rückkreuzen.

P, Parentalgeneration; F1, Filialgeneration; IC, Intercrossgenerationen (genetischer Anteil des Donors in RNO6/RNO8 steigt mit jeder Generation), **||** Homozygotie für MWF, **□□** Homozygotie für SHR weiß, **□||** Heterozygotie vereinfacht dargestellt.

2.2.3 Genotypisierung mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker

Um den Erfolg der Zucht zu kontrollieren und darauf aufbauend eine Erhaltungszucht betreiben zu können, erfolgte im Anschluss an die Etablierung noch einmal ein komplettes Genomscreening von 8 Böcken und 14 Weibchen der doppelkonsomen Zucht. Verwendet wurde eine repräsentative Auswahl von 76 heterozygoten Markern. Dabei war die Markerdichte in den QTL-Bereichen auf RNO6 und RNO8 zusätzlich höher gewählt worden. Als Marker fanden sogenannte Mikrosatelliten oder simple tandem repeats Anwendung (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003).

Die Genotypisierung erfolgte in drei Teilschritten. Zunächst wurde einer der flankierenden Primer des jeweiligen DNA-Repeats in einer Kinasereaktion mit dem

Isotop $[^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{ATP}$ radioaktiv markiert, welcher anschließend in einer üblichen Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) an die spezifische DNA-Region im Genom band. Die Amplifikate wurden mithilfe einer Polyacrylamidgelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und konnten aufgrund der radioaktiven Markierungen auf einem Röntgenfilm abgebildet werden. Es resultierte ein spezifisches und zwischen den Stämmen verschiedenes Bandenmuster für die gewählten Marker.

2.2.3.1 DNA-Isolierung

Zur DNA-Isolierung diente Gewebe der Rattenschwanzspitze (Tailcut). Diese wurde unter CO_2 -Narkose bei 4 Wochen alten Tieren reseziert und bei -20°C aufbewahrt. Im Labor erfolgte der schonende Zellaufschluss mittels $700\ \mu\text{l}$ Lysispuffer und $40\ \mu\text{l}$ der Serinprotease Proteinase K ($10\ \text{mg/ml}$) bei 55°C im Brutschrank. Die freigesetzte DNA wurde im Folgenden von den übrigen Zellbestandteilen isoliert und konzentriert. Hierzu wurden die Proben 10 min auf Eis gestellt und die Proteine anschließend über eine Salzfällung mit $300\ \mu\text{l}$ gesättigter Natriumchlorid-Lösung ($6\ \text{M}$) ausgefällt. Nach einer Einwirkzeit von 5 min auf Eis erfolgte die Zentrifugation bei $14.000\ \text{U/min}$ für 15 min bei 4°C . Der Überstand wurde jeweils in frische Eppendorfggefäße dekantiert und mit $1\ \text{ml}$ Isopropanol zur DNA-Fällung sowie zur Entfernung von Salzresten versetzt und für 30 min auf Eis gestellt. Es erfolgte noch einmal die Zentrifugation nach genanntem Schema. Diesmal wurde der Überstand verworfen und das verbliebene DNA-Pellet mit $500\ \mu\text{l}$ 70%igem eisgekühlten Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur für ca. 15 min getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in jeweils $200\ \mu\text{l}$ Aqua bidest über Nacht bei 4°C gelöst. Die Mengen- und Reinheitsbestimmung erfolgte photometrisch mittels Nanodrop bei 260-280 nm.

Für die Genotypisierung erfolgte die Ausplattierung zu je $5\ \mu\text{l}$ DNA-Lösung ($10\ \text{ng}/\mu\text{l}$) mithilfe einer 8-Kanalpipette in 96-Well-Mikrotiterplatten, welche für 2 Stunden bei 55°C im Brutschrank getrocknet und anschließend bei -20°C gelagert wurden. Die Platten wurden nach festgelegtem Pipettierschema bestückt, welches Tierverwechslungen vorbeugte und eine effiziente Genotypisierung ermöglichte. Zudem wurde in jeder Charge jeweils eine MWF- und heterozygote MWF/SHR(1:1)-Probe als Kontrolle mitgeführt.

2.2.3.2 Kinasereaktion

Für die Darstellung der repetitiven Dinukleotidsequenzen wurde jeweils der flankierende sense-Primer an seinem 5'-Ende mit radioaktivem [³²P]-γATP markiert. Hierzu wurden pro Primer und Probe 0,04 μl Kinase-10x Puffer mit 0,017 μl T4-Polynukleotidkinase gemischt. Im Radioaktivlabor erfolgte die Zugabe von 0,0583 μl [³²P]-γATP. Für jede Probe wurden 0,11 μl dieser Lösung zu 0,22 μl des 6 μM sense-Primers gegeben. Der Gesamtansatz wurde in einem Thermocycler für 45 min auf 37°C und anschließend 10 min auf 65°C erhitzt.

2.2.3.3 PCR-Amplifikation

Im Anschluss erfolgte die Amplifikation der Mikrosatellitenmarker mithilfe einer PCR. Hierzu wurden je Probe 0,22 μl unmarkierter antisense-Primer und 5 μl PCR-Mastermix in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Um Verdunstungswasser aus der DNA-Plattierung auszugleichen, wurde der Gesamtansatz mit dem Faktor 1,12 multipliziert und diese Menge an autoklaviertem Aqua bidest ergänzt. Es wurden 0,07 μl Taq-Polymerase je Probe hinzupipettiert, der ganze Ansatz vorsichtig vermischt und anzentrifugiert. Im Radioaktivlabor erfolgte die Zugabe des kinasierten Sense-Primer-Ansatzes.

Auf die zuvor ausplattierten DNA-Stockplatten wurden jeweils 10 μl der Lösung mithilfe einer Multipipette in jedes Well pipettiert und die Platte mit Folie verschweißt. Anschließend erfolgte die PCR-Reaktion in einem Thermocycler. Die initiale Denaturierung dauerte drei min bei 95°C, jede weitere sowie das Annealing bei primerspezifischer Temperatur und die Elongation eine Minute bei 72°C. Es folgte eine finale Synthesephase von sieben min. Insgesamt wurden 30 Zyklen durchlaufen.

2.2.3.4 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte mittels einer Polyacrylamidgelelektrophorese. Hierzu wurden zwei 42 cm lange und 35 cm breite Glasplatten zuvor mit 70%igem Ethanol gründlich gereinigt und eine der Platten, welche am oberen Rand über eine Aussparung verfügte, zusätzlich mit Acrylease beschichtet. Die andere Platte wurde zusätzlich mit Aceton gereinigt. Zwei 1,0 cm breite und 0,4 mm dicke Spacer wurde an den Längsseiten der Platten platziert und definierten die Geldicke. Die Platten wurden mit Edelstahlklemmen und Paketklebeband aufeinander fixiert. Zu 70 ml eines PAA-Gelansatzes wurden 40 μl Temed, welches die Auspolymerisierung des Gels bewirkte, und 400 μl initialisierende Ammoniumpersulfat-Lösung gegeben. Der Ansatz wurde

zünftig geschwenkt und blasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Anschließend wurde zur Erzeugung einer glatten Gellinie ein Kamm mit seiner glatten Seite zwischen die Platten geführt. Das Gel polymerisierte bei Raumtemperatur innerhalb von zwei Stunden aus. Klemmen und Gelreste wurden entfernt und mithilfe des Kamms Geltaschen erzeugt. Die Platten wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt. Die Proben wurden jeweils mit 10 µl Formamid-Laufpuffer versetzt. Es erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen Amplifikate im Thermocycler für 5 min bei 94°C und anschließend das Auftragen mithilfe einer 8-Kanal-Hamilton-Pipette. Bei 70 Watt wurden die Amplifikate im elektrischen Feld innerhalb von 2,5 Stunden aufgetrennt. Die kleinere Platte wurde vorsichtig vom Gel abgehoben und das Gel auf Blottingpapier aufgebracht. Frei von Blasen wurde das Gel in Saran-Folie verpackt und in eine Filmkassette gelegt. In der Dunkelkammer erfolgte die Auflage eines Kodak-Films, der über Nacht bei -20°C exponiert wurde. Nach der Filmentwicklung konnten die CA-Repeats am Lichtkasten abgelesen und anhand ihrer Laufweite der Allelstatus der untersuchten Tiere bestimmt werden.

2.2.4 Altersverlaufsstudie - Phänotypisierung

In einer Altersverlaufsstudie erfolgte nach definiertem Protokoll die phänotypische Charakterisierung von 22 Männchen und 19 Weibchen des doppelkonsomen Stamms von der 4. bis zur 24. Woche, sowie einer Subpopulation bis zur 52. Woche. Dazu gehörten die Bestimmung der Albuminurie, die systolische Blutdruckmessung sowie weitere biochemische Analysen von Urin und Plasma. Die Daten wurden jeweils mit den Ergebnissen der Parentaltierstämme und konsomen Linien verglichen, welche in vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhold Kreutz ermittelt wurden (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003; Schulz et al., 2007; Schulz et al., 2008b; Schulz et al., 2008a). In der 24. und 32. Woche wurden jeweils 6-8 Männchen und 5-8 Weibchen präpariert. Die gewonnenen Organe dienten der histologischen und molekularen Diagnostik.

2.2.4.1 Systolische Blutdruckmessung nach der Tailcuff-Methode

Die Messung des systolischen Blutdrucks erfolgte in der 14. und 24. Woche nicht-invasiv mittels Tailcuff-Methode. Die Messungen fanden am wachen Tier mithilfe eines computerassistierten Oszillationsdetektors statt. Die Tailcuff-Blutdruckmessung ist eine etablierte Methode zur nichtinvasiven Blutdruckmessung bei der Ratte. Sie stellt im

Vergleich zu invasiven Messverfahren eine weniger manipulative und zur telemetrischen Messung eine kostengünstigere Alternative dar und eignet sich vor allem für wiederholte Messungen im Rahmen von Altersverlaufsstudien.

Für die Messungen wurden die Tiere in Plexiglasröhren (Restrainer) und zur Dilatation der Schwanzgefäße in eine Wärmebox von 37°C verbracht. Anschließend wurde eine Blutdruckmanschette und ein Oszillationssensor nahe der Schwanzwurzel platziert. Dieser registrierte die Pulskurve und konvertiert sie in ein elektrisches Signal. Mittels Manschette wurde ein definierter Druck erzeugt. Wurde der Blutfluss unterbrochen (arterielle Okklusion), registrierte der Sensor keine Pulswelle mehr und der korrespondierende Druckwert wurde als SAP1 (systolic arterial pressure 1) aufgezeichnet. Der Druckwert des ersten Pulsschlags (SAP2) beim Ablassen des Manschettendrucks wurde erneut in der Oszillationskurve registriert (SAP2) und beide Werte (SAP1 und SAP2) gemittelt.

Die Blutdruckmessungen wurden an drei aufeinander folgenden Tagen unter Berücksichtigung zirkadianer Rhythmen zu ähnlichen Zeiten vorgenommen. Vorangestellt wurden Trainingsmessungen an zwei Tagen. Sie dienten der Adaptation der Tiere, um Stressartefakte zu minimieren. Anschließend wurden mindestens drei Messungen pro Tier und Tag durchgeführt und deren Werte gemittelt.

2.2.4.2 Gewinnung des 24h-Urins

Jeweils in der 4., 8., 12., 14., 18. und 24. Woche wurde 24h-Urin zur Untersuchung der U_{Aib} mithilfe von Stoffwechsellkäfigen gewonnen. Bei einer Subpopulation der Tiere erfolgte die Gewinnung zusätzlich in der 32. (14 Weibchen, 16 Männchen) sowie 40., 48. und 52. Woche (9 Weibchen, 10 Männchen).

Hierzu wurden die Tiere getrennt in spezielle Stoffwechsellkäfige gesetzt. Diese verfügen über einen Gitterboden und leiten Urin über ein Trichtersystem in Auffangbehälter ab. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und unterlagen dem üblichen Tag-Nacht-Zyklus. Nach einem Tag der Adaptation wurde der Urin von 24 h gesammelt, in Szintillationsgefäße aus Kunststoff abgefüllt und die Urinmengen ausgewogen (1g \approx 1ml). Etwa 1 ml wurde zur Albuminbestimmung in ein Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

Die Proben dienten zusätzlich zur Bestimmung der Proteinurie in der 24. und 32. Woche sowie zur Keatininmessung in der 24. Woche.

2.2.4.3 Albuminquantifizierung mittels ELISA

Die Bestimmung des Albumingehalts im 24h-Urin erfolgte mittels einer ELISA-Methode. Dabei konkurrierte fixiertes Rattenalbumin am Mikrotiterplattenboden (Kompetitor) mit dem Rattenalbumin (Analyt) im 24h-Urin um die Bindung Peroxidase-markierter Anti-Albumin-Antikörper. Die gebundene Peroxidase setzte nach Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) einen Farbumschlag in Gang und führte zu einem blauen Reaktionsprodukt. Abgestoppt wurde die Peroxidasereaktion mittels 2 M H₂SO₄. Die resultierende Farbintensität war indirekt proportional zur Albumin-Konzentration und konnte anhand einer Standardreihe definierter Albuminkonzentrationen photometrisch quantifiziert werden.

In einem ersten Schritt wurde eine Coating-Lösung hergestellt, welche zu jeweils 0,1 ml in jedes Loch einer 96-Mikrotiterplatte pipettiert, für drei Stunden bei 37°C in Frischhaltefolie eingewickelt inkubiert und anschließend weitere 12 Stunden bei 4°C gelagert wurde. Die Coating-Lösung wurde verworfen und die Platte dreimal für vier min mit Puffer A gewaschen.

Die Herstellung der Standardreihe erfolgte mit 0,1 ml RSA-Stocklösung in 100 ml Puffer in aufsteigender Verdünnung mit Puffer A in den Konzentrationen 1 mg/l, 0,8 mg/l, 0,6 mg/l, 0,4 mg/l, 0,3 mg/l, 0,2 mg/l, 0,1 mg/l, 0,07 mg/l, 0,05 mg/l, 0,03 mg/l, 0 mg/l. Die Urinproben wurden bei 800 U/min 10 min zentrifugiert und in frische Eppendorfgefäße dekantiert, um grobe Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend erfolgte mit Puffer A für jede Probe die Herstellung einer Verdünnungsreihe mit den Standardverdünnungen 1:50, 1:500, 1:5000, welche in Doppelbestimmung in die 96-Lochplatte pipettiert wurden. Je 50 µl Konjugatlösung wurden zu jeder Probe pipettiert und für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Platteninhalt verworfen, die Platte viermal vier min mit Puffer A gewaschen und kräftig ausgeklopft. Jeweils 200 µl einer Substratlösung wurden in jedes Loch gegeben. Auf einem Mikrotiterplattenschüttler fand anschließend die Peroxidasereaktion mit dem Farbindikator statt und wurde mit 50 µl 2 M H₂SO₄ nach 15 min gestoppt. Es erfolgte die photometrische Messung in einem ELISA-MRX-Platereader bei 450 nm.

Die Albuminkonzentrationen wurden über die lineare Regression des Logarithmus der Probenextinktion versus des Logarithmus der Standardalbuminkonzentrationen ermittelt. Hierzu diente das Computerprogramm Dynex Revelation G 3.04. Lagen die Werte nicht mittig auf der Eichgeraden wurde die jeweilige Urinprobe in angepasster Verdünnung noch einmal analysiert. Die Umrechnung der mg/l Werte erfolgte in mg/24h.

Eine Albuminausscheidung von weniger als 1 mg/24h im Sammelurin gilt bei der Ratte als normwertig.

2.2.4.4 Klinische Chemie

In der 24. und 32. Woche wurde zusätzlich zur Albuminkonzentration der Kreatininwert im 24h-Urin bestimmt. Das Plasma dieser Zeitpunkte wurde hinsichtlich des Kreatinin-, Harnstoff-, Triglyzerid-, sowie des Gesamtcholesteringehalts untersucht. Es erfolgte außerdem die Bestimmung von Cystatin C im Serum 24 Wochen alter Ratten.

Die Daten wurden im Labor 28 (Mecklenburgische Straße 28, 14197 Berlin) nach hauseigenen Standardmethoden ermittelt.

Die Berechnung der Kreatininclearance erfolgte nach der Formel:

$$\text{Kreatinin-Clearance [mg/min]} = \frac{\text{Krea}^{\text{Urin}} [\text{mg/dl}] \times V^{\text{Urin}} [\text{ml}]}{\text{Krea}^{\text{Plasma}} [\text{mg/dl}] \times 1440 [\text{min}]}$$

2.2.4.5 Präparation

Die Präparation der MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Tiere erfolgte zu einem Teil in der 24., zum anderen in der 32. Woche. Es wurden jeweils 8 Männchen und 8 Weibchen in der 24. Woche, sowie 6 Männchen und 5 Weibchen in der 32. Woche präpariert.

Entsprechend dem Versuchsprotokoll wurden die Tiere durch eine peritoneale Injektion von 87 mg/kg KG S-(+)-Ketamin und 13 mg/kg KG Xylazin in Narkose versetzt. Das Abdomen wurde mittels Medianschnitt eröffnet und über eine 20G-Kanüle Blut aus der Vena cava inferior entnommen und in ein Eppendorfgefäß mit 50 µl Plasmainhibitor überführt. Es wurden das Herz, beide Nieren, sowie die Aorta thoracica entnommen, vermessen bzw. gewogen und schockgefroren. Zusätzlich erfolgte die Präparation des rechten und linken Ventrikels. Beide Ventrikel wurden separat gewogen. Die Lagerung der Organe erfolgte bei -80°C. Jeweils die rechte Niere wurde durch einen transversalen Schnitt geteilt und eine Hälfte zur histologischen Aufarbeitung in einem Szintillationsgefäß aus Glas in Mathacarn-Lösung lichtgeschützt fixiert. Nach 24h wurde diese durch 80%igen Ethanol ersetzt und die Nieren bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.5 Histologie

2.2.5.1 Anfertigung der Nierenschnitte

Die Methacarn-fixierten Nierenpräparate der 24 Wochen alten Ratten wurden zur histologischen Analyse entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Mit einem

Rotationsmikrotom wurden standardisierte 3 µm dicke transversale Schnitte angefertigt und jeweils acht Schnitte in Serie auf drei Objektträger aufgebracht und bei 37°C getrocknet. Die Färbung mit Hämatoxylin Eosin (HE), Sirius-Rot und Periodic Acid Schiff (PAS) erfolgte standardisiert in einem Färbeautomaten und wurden für die Auswertung systematisch geblindet.

2.2.5.2 Auszählung der oberflächlichen Glomeruli

Die Zählung der für MWF typischen oberflächlichen Glomeruli im Cortex corticis mit und ohne Kapselkontakt bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} erfolgte lichtmikroskopisch. Subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt wiesen direkten Kontakt zur Nierenkapsel auf, während oberflächliche Glomeruli ohne Kapselkontakt definiert waren als Glomeruli innerhalb einer Zone eines durchschnittlichen Glomerulidurchmessers unterhalb der Kapsel. Beurteilt wurden jeweils drei Schnitte pro Niere in der 40er Vergrößerung, deren Ergebnisse anschließend gemittelt wurden.

2.2.5.3 Bestimmung des Glomeruloskleroseindex (GSI)

Die Beurteilung der Glomerulosklerose erfolgte mithilfe eines Photomikroskops semiquantitativ anhand der PAS-Färbung. Es wurden jeweils insgesamt 40 superfizielle und juxtamedulläre Glomeruli bei 200facher Vergrößerung nach einem Score von 0 bis 4 bewertet (Raij, Azar, Keane, 1984). Schädigungsparameter waren fokale Adhäsionen im Kapillarkonvolut, sowie diffuse oder segmentale Ablagerung PAS-positiven Materials im Mesangium und um die Kapillarschlingen. Abhängig vom prozentualen Anteil dieser Veränderungen zur Gesamtfläche des Glomerulums erfolgte die Zuteilung eines Scores. Lagten keine glomerulären Veränderungen im Sinne der Definition vor, entsprach dies dem Score 0, waren >90% des Glomerulums involviert, dem Score 4 (0,5 weniger als 12%, 1 weniger als 12-25%, 1,5 weniger als 25-37%, 2 weniger als 37-50%, 2,5 weniger als 50-62%, 3 weniger als 62-75%, 3,5 weniger als 75-90%). Die kumulativen Einzelwerte wurden anschließend gemittelt.

2.2.5.4 Bestimmung der renalen interstitiellen Fibrose

Sirius-Rot ist ein stark anionischer Farbstoff und zeichnet sich durch seine Interaktion mit Kollagenmolekülen aus. Durch die Bindung des Farbstoffs an Kollagenfasern erscheinen diese im Präparat rot. Die Quantifizierung von Kollagen und damit der Fibrosierung erfolgte mithilfe eines Photomikroskops halbautomatisiert. Es wurden 10

Bildausschnitte definierter Größe im Bereich des äußeren Nierenmarks bei 100facher Vergrößerung aufgenommen und digitalisiert. Diese konnten anschließend über das Softwareprogramm Scion Image 1.62a (Scion Co) ausgewertet werden. Ermittelt wurde das Verhältnis von Sirius-Rot-gefärbten interstitiellen Flächen zur Gesamtfläche. Die Ergebnisse von 10 Bildausschnitten pro Tier wurden jeweils gemittelt.

2.2.5.5 Bestimmung des tubulointerstitiellen Schädigungsindex (TDI)

Mit einem Photomikroskop wurde der tubulointerstitielle Schädigungsindex semiquantitativ nach einem Score-System (1-3) ermittelt. Hierfür wurden strukturelle Veränderungen wie tubuläre Atrophien und Dilatationen, interstitielle Inflammation, sowie Fibrosierungen im Rinden- und Markbereich der PAS-gefärbten Nierenschnitte bewertet. Die Nierenschnitte wurden in jeweils 20 Felder eingeteilt und bei 100facher Vergrößerung untersucht. Ein TDI Grad 0 ist hierbei definiert als unverändertes Tubulointerstitium. Bei einem Index von 1 sind unter 25%, bei einem Index von 2 25-50% und bei einem Index von 3 über 50% der Fläche strukturell geschädigt. Der Index eines jeden Tieres entspricht wiederum dem Mittelwert der 20 Einzelscores.

2.2.6 Differentielle Genexpressionsanalyse mittels Real-time quantitativer PCR

Die differentiellen Genexpressionsanalysen für Kollagen 3 (Col3) und neutrophiles Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) wurden mit Hilfe der Real-Time quantitativen PCR-Methode durchgeführt. Das Verfahren basiert auf einer üblichen PCR und ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der Nukleinsäuren einer Probe über die Messung eines proportional zur Amplifikatakkumulation entstehenden Fluoreszenzsignals. Die Quantifizierung der cDNA-Transkripte von Col3 erfolgte mittels TaqMan-Sonde, von NGAL mittels SYBRGreen.

Hierzu wurde vorab die RNA aus den schockgefrorenen Nieren von 24 Wochen alten Tieren mithilfe der Trizol-Methode isoliert und über eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben.

2.2.6.1 RNA-Isolierung nach der Trizol-Methode

Die RNA-Extraktion nach der Trizol-Methode erfolgte in fünf Teilschritten.

100 mg des gefrorenen Gewebes wurden in 1 ml eisgekühltes Trizol gegeben und auf Eis mit dem Polytronstab homogenisiert, wobei jeweils drei mal 30 sek auf höchster Stufe gearbeitet wurde. Zwischen den Proben wurde in einer Waschreihe mit Aqua

bideist., Diethylpyrocarbonat-(DEPC-)Wasser und Trizol der Polytronstab gründlich gereinigt. Die homogenisierte Probe wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und bei 500 U/min 10 min bei 4°C zentrifugiert um grobe Partikel zu entfernen. Der Überstand wurde in ein frisches Eppi überführt und bei Raumtemperatur 45 min belassen, um die komplette Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu erreichen. Daraufhin wurde eine Phasenseparation mit 200 µl Chloroform je Probe durchgeführt. Die Proben wurden 15 sek gevortext und für 2-3 min bei RT belassen. Anschließend erfolgt die Zentrifugation bei 12.000 U/min für 15 min bei 4°C, wonach die Proben erneut auf Eis gestellt wurden. Die Proben separierten sich in drei Phasen. Die obere klare Phase enthielt die RNA und wurde vorsichtig abpipettiert ohne Anteile der weißen DNA-Phase oder roten Phenol-Chloroform-Phase mit dem Proteinanteil aufzunehmen. In 500 µl Isopropanol je Probe präzipitierte die RNA bei Raumtemperatur in 10 min. Die Probe wurde erneut bei 12.000 U/min 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand dekantiert und verworfen.

Das gewonnene RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75%igem -20°C kaltem Ethanol gewaschen, ein weiteres Mal bei 4900 U/min 10 min zentrifugiert und der Überstand erneut dekantiert. Das aufgereinigte RNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet.

Es folgte die Lösung in 50 µl DEPC-Wasser über 30 min bei 60°C auf dem Wärmeblock. Anschließend erfolgten die Reinheits- und Konzentrationsbestimmung photometrisch am NanoDrop1000 bei 260 und 280 nm und die Lagerung bei -80°C.

Zur Qualitätskontrolle der RNA wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. In einem 1%igen Agarosegel wurden 0,1 µl RNA mit 1 µl Laufpuffer in 5 µl DEPC-Wasser gegeben und bei 60-70 Volt aufgetrennt. Unter dem UV-Licht zeigten sich bei erfolgreicher RNA-Isolation zwei distinkte Banden, entsprechend der 28s und 18s RNA.

2.2.6.2 Herstellung der cDNA

Die Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR) basiert auf einer DNA-Amplifikation durch die Taq-Polymerase. Da es sich bei diesem Enzym um eine DNA-abhängige DNA-Polymerase handelt, ist zunächst die Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (cDNA) mit dem first strand cDNA Synthesis Kit erforderlich gewesen.

Dieser enthält die klonierte reverse Transkriptase des moloney murine leukemia virus (M-MuLV-RT), welche nur geringe RNase-Aktivität aufweist und sich so für die Herstellung längerer cDNA-Moleküle aus RNA-Transkripten eignet.

Jeweils 2 µg der in Aqua bidest. gelösten RNA wurden mit 1 µl Random Hexamer Primer gemischt und zum Annealing der Primer in der PCR-Maschine 5 min auf 70°C erhitzt. Im Anschluss wurden auf Eis 4 µl 5xReaction-Buffer, 1µl RNase-Inhibitor, 2µl 10mM dNTP-Mix und zuletzt 2 µl reverse Transkriptase (M-MuIV) zu jeder Probe hinzupipettiert. Die reverse PCR im Thermocycler erfolgte nach folgendem Protokoll: 10 min 25°C, 60 min 37°C, 10 min 70°C, 10 min 4°C.

Zur Kontrolle der cDNA wurde im Anschluss eine PCR mit einem genspezifischen Primerpaar für Aminoacetyltransferase (Aadat) durchgeführt. Hierzu wurden 1 µl cDNA, 5 µl 10x PCR-Puffer, 4 µl dNTPs (2,5 mM), 1,5 µl MgCl₂ (50 mM), 2,5 µl 6 µM sense- und antisense Primer, 1 µl Taq-Polymerase und 32,5 µl Aqua bidest. gemischt und bei primerspezifischer Annealingtemperatur von 59°C die PCR nach drei min bei 94°C, 39x 30 sek bei 94°C, 45 min bei 59°C, 1 min 7 2°C und final 6 min bei 72°C und 10 min bei 4°C durchgeführt. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte in einem 2%igen mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel bei 70 Volt. 5 µl Probe wurden mit 1 µl Loading-Puffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Eine Positiv- und Negativ-Kontrolle wurden mitgeführt. Die cDNA konnte in einem 1:1-Verhältnis mit Wasser gemischt und bei -20°C gelagert werden.

2.2.6.3 TaqMan-PCR

Das TaqMan-Prinzip basiert auf der Verwendung eines zusätzlichen Oligonukleotids (Sonde), welches zwischen den Primern spezifisch an die cDNA-Sequenz bindet. Diese Taqman-Sonde besitzt an ihrem 5'-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende einen Quencher, welcher das Signal des Farbstoffs bei räumlicher Nähe unterdrückt. Während die Taq-Polymerase den DNA-Strang synthetisiert, baut sie gleichzeitig durch ihre 5'-3'-Exonuclease-Aktivität die Sonde am 5'-Ende ab. Dadurch wird der Reporter und mit ihm das Fluoreszenzsignal freigesetzt. Die Quantifizierung der Kopien erfolgte anhand einer Standardkurve. PCR-Fragmente bestehend aus der Sequenz des zu untersuchenden Amplikons Kollagen 3 und dem Housekeeper Porphobilinogendeaminase (PBGD) mit bekannter Templatmenge wurden in sieben seriellen 1:10-Verdünnungen bei jedem RTQ-PCR-Lauf mitgeführt. Es wurde ein Schwellenwert-Zyklus (C_T-Wert, threshold Cycle) ermittelt, in dem von einer exponentiellen Amplifikation ausgegangen werden konnte. Die ermittelten C_T-Werte der Standardverdünnungen wurden gegen den Logarithmus der eingesetzten DNA-

Konzentrationen aufgetragen und bildeten die Standardkurve, welche eine Templatequantifizierung der Proben ermöglichte (Schulz et al., 2007).

Um die Daten zu normieren, wurde PBGD als Housekeepinggen benutzt. Dieses tritt ubiquitär auf, wird in nahezu konstanter Menge transkribiert und stellt ein Maß der zellspezifischen Expression eines Gewebes dar. Globalmethodische Fehler können ausgeglichen werden, indem die Kopienanzahl des Zielgens durch die Kopienzahl der internen Referenz, PBGD, dividiert wird. PBGD ist an der Synthese des Häms beteiligt und hat sich als verlässliches Housekeepinggen bei der Ratte erwiesen (Fink et al., 1999; Schulz et al., 2007).

Für jede Reaktion wurde ein Mastermix aus 12,5 µl TaqMan 2x Universal PCR MasterMix, 0,1 µl sense- und antisense Primer, 0,0375 µl Sonde (PBGD 150 nM, Kollagen 3 100 nM) und 11,26 µl Aqua bidest. hergestellt. Zu 3 µl Probe wurden je 72 µl des Mastermixes gegeben und jeweils 23 µl davon als Dreifachansatz in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Die Platte wurde mit Folie verklebt und bei 3000 U/min kurz zentrifugiert. Nach Kalibrierung der Kamera über ein snapshot erfolgte in 1½ Stunden die RTQ-PCR nach folgendem Protokoll: 10 min 95°C, 40 Zyklen à 15 sek 95°C, 1 min 60°C.

Anschließend wurden die gewonnenen Daten über die ABI Prism 7000 SDS-Software ausgewertet. Anhand der Standardkurve konnte für jede Probe der Logarithmus der Templatemenge bestimmt werden. Anschließend erfolgte die relative Quantifizierung durch die Bildung des Quotienten aus der Anzahl der Kopien des Housekeeping- und des Zielgens. Zum Vergleich der relativen Expression wurde der Mittelwert der Kontrollgruppe SHR auf 100% festgelegt und die Mittelwerte der anderen Gruppen prozentual zur Kontrolle angegeben.

2.2.6.4 SYBRGreen-PCR

SYBRGreen ist ein Cyanin-Farbstoff, welcher an doppelsträngige DNA bindet, einen DNA-Fluoreszenzkomplex bildet und so eine Quantifizierung ermöglicht. Zur Normierung diente das Housekeepinggen 18S (18S rRNA). Zu 3 µl Probe wurden je 72 µl SYBRGreen-Mastermix pipettiert. Die Primer wurden in einer Konzentration von 100 nM den Proben zugefügt und wiederum jeweils als Triplet auf die Platten aufgetragen. Zur Prüfung der Spezifität wurde eine Negativkontrolle und Kontrollprobe mitgeführt. Die Zyklusbedingungen entsprachen dem Protokoll der TaqMan-PCR. Die Quantifizierung erfolgte erneut mittels Standardkurve.

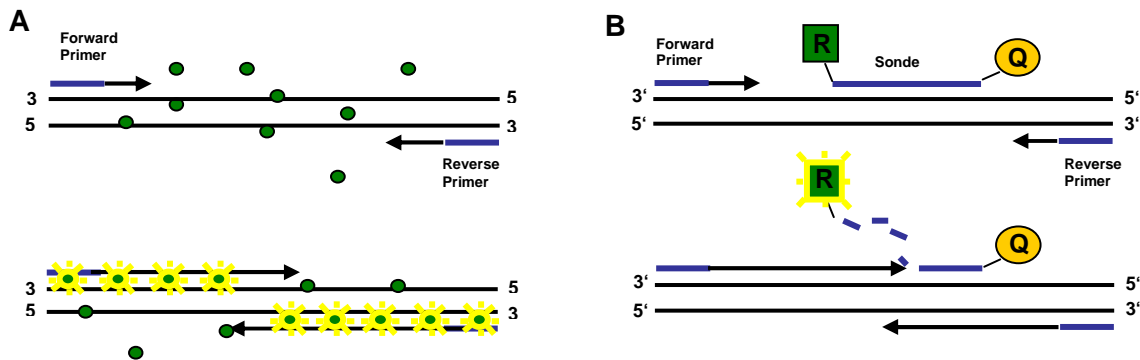


Abb. 4: Schematische Gegenüberstellung (A) SYBRGreen- und (B) TaqMan-Methode mit Sonde.

A: Wird in der PCR ein DNA-Doppelstrang synthetisiert, bindet SYBRGreen (●) und bildet mit der DNA einen Fluoreszenzkomplex (☀).

B: Die TaqMan-Sonde bindet spezifisch am cDNA-Strang. Das Fluoreszenzsignal wird durch die Interaktion zwischen Reporter (R) und Quencher (Q) unterdrückt. Baut die Taq-Polymerase bei der Strangsynthese die Sonde ab, entfernen sich R und Q voneinander und das Fluoreszenzsignal nimmt zu.

2.2.7 Statistische Auswertung

Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten statistischen Analysen erfolgten mit SPSS 15.0. Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurden die Werte auf Normalverteilung geprüft und ggf. nach logarithmischer Transformation analysiert. Die statistischen Analysen wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt und bei Drei- und Mehrgruppenvergleichen über einen anschließenden Bonferroni-POST-HOC-Test geprüft. Weiterhin wurde der U-Teste für nicht normalverteilte Daten eingesetzt. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert <0,05 angenommen. Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Genotypische Charakterisierung des Stamms MWF-6^{SHR}8^{SHR}

Um die genetische Reinheit des Stamms MWF-6^{SHR}8^{SHR} zu überprüfen, erfolgte eine Genotypisierung von weiblichen und männlichen Tieren mit einer repräsentativen Auswahl von 76 Markern, verteilt über das gesamte Genom. Diejenigen Tiere, welche genetisch homogen waren und an allen untersuchten Loci homozygote Allele aufwiesen, konnten in die Erhaltungszucht aufgenommen werden. Die Analysen zeigten, dass RNO6 und RNO8 das SHR-, die übrigen Chromosomen das MWF-spezifische

Allelmuster aufwiesen. Somit waren nachweislich RNO6 und RNO8 von SHR vollständig in das reine MWF-Hintergrundgenom integriert worden.

3.2 Phänotypische Charakterisierung männlicher MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Ratten

Um den Einfluss der auf RNO6 und RNO8 bei MWF detektierten U_{Alb} -QTL auf den Phänotyp des doppelkonsomen Stamms MWF-6^{SHR}8^{SHR} zu analysieren, wurde dieser in einer Altersverlaufsstudie nach einem standardisierten Versuchsprotokoll charakterisiert. Dieses Protokoll fand in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zur Charakterisierung der Parentaltierstämme SHR und MWF, sowie bei den einzelkonsomen Stämmen MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} Anwendung und erlaubte so den direkten Vergleich der ermittelten Parameter. Betrachtet wurde MWF-6^{SHR}8^{SHR} im Vergleich zu den Parentaltierstämmen MWF und SHR, sowie zu den einzelkonsomen Linien MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR}, um Veränderungen des Phänotyps differenziert bewerten zu können.

Alle dieser Arbeit zu entnehmenden Daten der Parentaltierstämme MWF und SHR sowie der einzelkonsomen MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} beruhen auf frühere bereits publizierte Untersuchungen der Arbeitsgruppe (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003; Schulz et al., 2007; Schulz et al., 2008a; Schulz et al., 2008b).

3.2.1 Altersverlauf der Albuminurie-Entwicklung in der 4. bis 32. Woche

Die ersten Analysen hinsichtlich der Albuminausscheidung im Urin erfolgten in der 4. Lebenswoche. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich eine U_{Alb} von weniger als 1 mg/24h im Sammelurin bei allen untersuchten Stämmen (SHR $0,09 \pm 0,03$ vs. MWF-6^{SHR}8^{SHR} $0,3 \pm 0,04$ vs. MWF $0,1 \pm 0,01$). Wie der Abbildung 5 zu entnehmen ist, stieg die U_{Alb} in der 8. Woche bei MWF auf Werte von $18,1 \pm 1,9$ mg/24h signifikant gegenüber SHR mit physiologischer Albuminurie ($0,3 \pm 0,07$ mg/24h, $p < 0,0001$) an, nahm im Altersverlauf weiterhin zu und erreichte in der 32. Woche mit $354,6 \pm 37,6$ mg/24h Werte im nephrotischen Bereich. Die Entwicklung der Albuminexkretion bei den einzelkonsomen Stämmen MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} war ab der 8. Woche zu jedem Zeitpunkt gegenüber MWF hoch signifikant gemindert ($p < 0,0001$). Die frühzeitige Ausbildung einer massiven Albuminausscheidung wie sie bei MWF bereits bei jungen Tieren auftritt, konnte bei beiden einzelkonsomen Stämmen vollständig aufgehoben werden.

Der doppelkonsome Stamm wies im Altersverlauf maximale U_{Alb} -Werte von $1,6 \pm 0,4$ mg/24h in der 32. Woche auf. Die progressive Entwicklung einer U_{Alb} im nephrotischen Bereich wie sie bei männlichen MWF-Ratten in der 32. Woche auftritt, konnte beim

doppelkonsomen Stamm komplett beseitigt werden ($354,6 \pm 37,6$ vs. $1,6 \pm 0,4$ mg/24h, $p < 0,0001$). Interessanterweise erzielte MWF-6^{SHR}8^{SHR} ab der 14. Woche ebenso signifikant niedrigere U_{Alb} -Werte im Vergleich zur U_{Alb} -resistenten SHR-Ratte ($1,9 \pm 0,3$ vs. $0,6 \pm 0,04$ mg/24h, $p < 0,0001$).

Die U_{Alb} differierte innerhalb der konsomen Gruppe erheblich. Ab der 8. Woche war die Albuminausscheidung bei MWF-8^{SHR} im Vergleich zu MWF-6^{SHR}8^{SHR} signifikant höher ($2,6 \pm 0,6$ vs. $0,5 \pm 0,02$ mg/24h, $p < 0,0001$) und nahm bis zur 32. Woche weiter zu. Ab der 12. Woche war die U_{Alb} bei MWF-6^{SHR} ebenfalls signifikant höher als bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} ($2,5 \pm 0,4$ vs. $0,7 \pm 0,04$ mg/24h, $p < 0,0001$). Bis zur 32. Woche entwickelten MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Männchen keine nennenswerte Albuminausscheidung und unterschieden sich somit in signifikantem Maße von den einzelkonsomen Stämmen, bei welchen die U_{Alb} nur bis zur 8. bzw. 12. Woche noch vollständig eliminiert werden konnte.

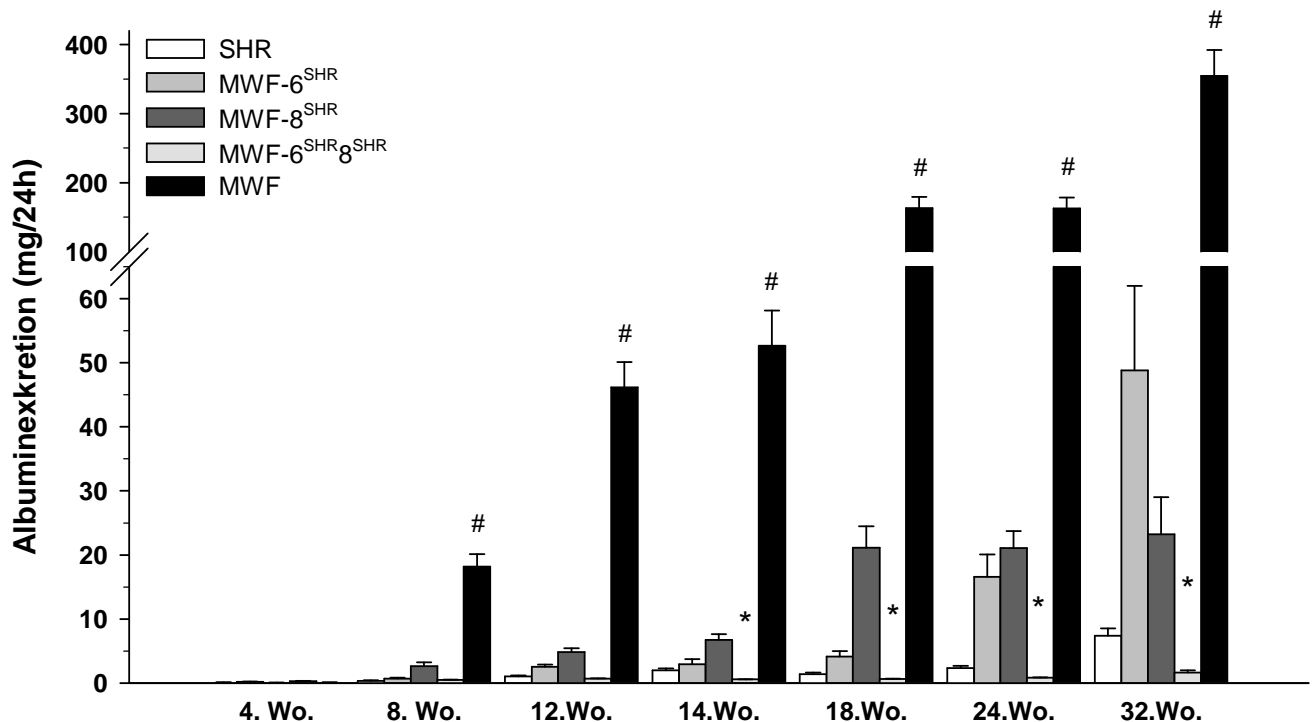


Abb. 5: Vergleich der Albuminausscheidung im Urin bei männlichen SHR-, MWF-6^{SHR}-, MWF-8^{SHR}- und MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Ratten von der 4. bis zur 32. Woche.

* $p < 0,0001$ vs. alle, gleiche Woche; # $p < 0,0001$ vs. alle, gleiche Woche.

3.2.2 Ausprägung der U_{Alb} bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} und SHR ab der 32. Woche

Die Verminderung der U_{Alb} bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} gegenüber SHR war bereits ab der 14. Woche signifikant ($p < 0,0001$). Um den Einfluss von RNO6 und RNO8 von SHR auf die U_{Alb} -Entwicklung im fortgeschrittenen Alter beurteilen zu können, wurde die Altersverlaufsstudie bis zur 52. Lebenswoche fortgesetzt. Es zeigte sich im Verlauf

weiterer 20 Wochen eine deutliche Divergenz der U_{Alb} -Verläufe beider Stämme (siehe Abb. 6). SHR entwickelte eine deutliche U_{Alb} von bis zu $21,5 \pm 3,1$ mg/24h. Im Gegensatz dazu war die U_{Alb} beim doppelkonsomen Stamm MWF-6^{SHR}8^{SHR} mit max. $6,3 \pm 1,1$ mg/24h in der 52. Woche mehr als dreifach geringer ($p < 0,003$).

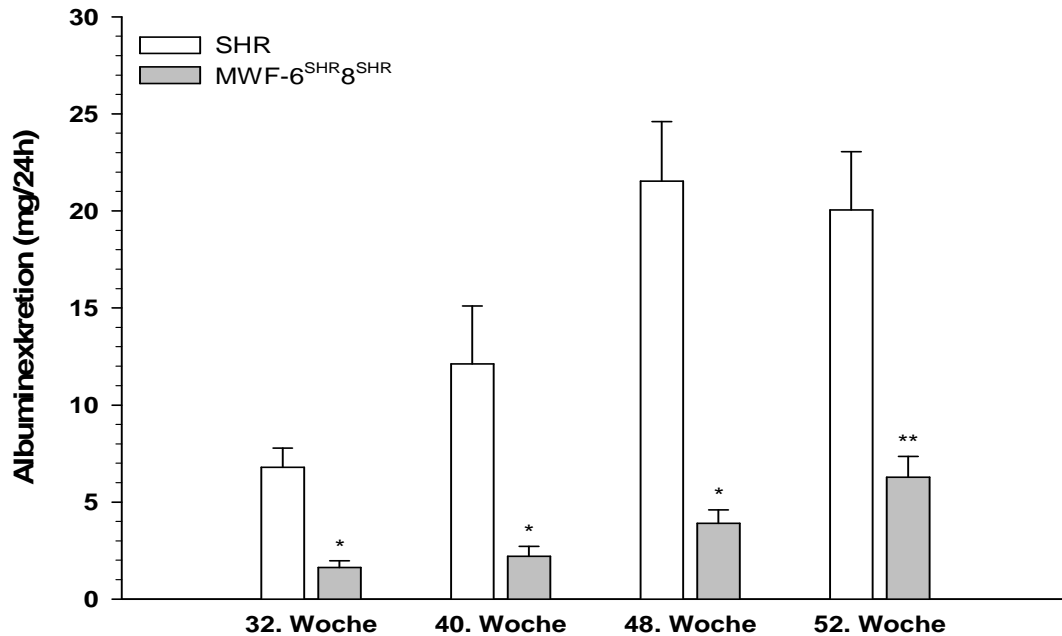


Abb. 6: Vergleich der Albuminausscheidung im Urin bei männlichen SHR- und MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Ratten in der 32. bis 52. Woche.

* $p < 0,0001$ vs. SHR, gleiche Woche, ** $p < 0,003$ vs. SHR, gleiche Woche.

3.2.3 Vergleich der systolischen Blutdrücke in der 14. und 24. Woche

Da eine chronische Nierenschädigung durch einen Bluthochdruck maßgeblich beeinflusst werden kann, erfolgte die vergleichende Analyse der systolischen Blutdrücke (SBD). Mittels der nicht-invasiven Tail-cuff-Methode wurden in der 14. und 24. Woche die SBD ermittelt. Zu beiden Zeitpunkten erzielten die Parentalstämme MWF und SHR hypertensive Blutdruckwerte. In der 14. Woche wiesen SHR-Männchen systolische Blutdruckwerte von $177,5 \pm 2,3$ mmHg auf. Der Mittelwert des SBD bei MWF war mit $146 \pm 1,1$ mmHg gegenüber SHR signifikant geringer ($p < 0,0001$). Die SBD-Werte der einzelkonsomen Stämme MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} hatten sich verglichen mit SHR als signifikant geringer erwiesen ($151,0 \pm 2,0$ bzw. $155,9 \pm 1,9$ mmHg, $p = 0,0001$). Gleichzeitig wies MWF-8^{SHR} jedoch signifikant höhere Werte als MWF auf ($p = 0,005$). MWF-6^{SHR}8^{SHR} erreichte mit $168,5 \pm 2,2$ mmHg in der 14. Woche einen zu beiden Parentalstämmen intermediären SBD (≈ -9 mmHg vs. SHR, $\approx +22,4$ mmHg vs. MWF). Der Unterschied verhielt sich sowohl zu MWF ($p < 0,0001$) als auch zu SHR ($p < 0,02$) signifikant.

Verglichen mit den beiden einzelkonsomen Stämmen hatte der doppelkonsome einen signifikant höheren SBD ($p < 0,0002$). Nach SHR verzeichnete er in der 14. Woche den höchsten systolischen Druck.

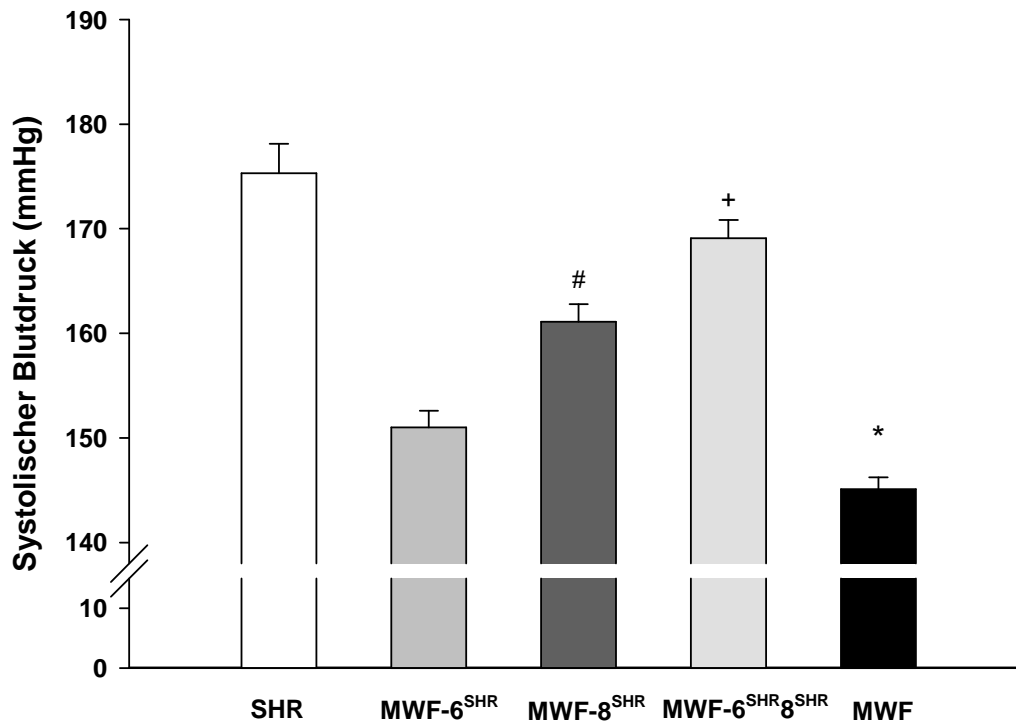


Abb. 7: Vergleich der systolischen Blutdrücke bei männlichen Ratten der 24. Woche.

* $p < 0,0001$ vs. SHR, MWF-8^{SHR} und MWF-6^{SHR}8^{SHR}; # $p < 0,007$ vs. alle Stämme; + $p < 0,007$ vs. MWF, MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR}.

Die Ergebnisse der 24. Woche sind in der Abbildung 7 grafisch dargestellt. Zu diesem Zeitpunkt war der Unterschied zwischen MWF und SHR mit einer Differenz von etwa 30 mmHg ebenfalls signifikant ($p < 0,0001$). MWF-6^{SHR}8^{SHR} wies mit $169,1 \pm 1,7$ mmHg ähnlich hohe Blutdruckwerte wie SHR ($175,3 \pm 2,8$ mmHg, $p = 0,09$) auf. Der SBD war damit gegenüber MWF ($145,1 \pm 1,1$ mmHg, $p < 0,0001$) und den beiden einzelkonsomen Stämmen ($151 \pm 1,6$ mmHg, $p < 0,0001$ bzw. $161,1 \pm 1,7$ mmHg, $p < 0,007$) signifikant höher.

3.2.4 Biochemische Parameter

Für die biochemische Diagnostik (u.a. Nierenretentionsparameter und Fettstoffwechsel), sowie die vergleichende Beurteilung der Organe wurde jeweils eine Subgruppe der MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Ratten in der 24. und 32. Woche präpariert. Die Organe wurden vermessen und Blutplasma gewonnen. Die Tabelle 1 zeigt die wesentlichen Befunde der biochemischen Analyse des doppelkonsomen Stamms im Vergleich zu den Parentalstämmen SHR und MWF in der 24. und 32. Woche.

Tab. 1: Vergleichende phänotypische Charakterisierung männlicher SHR, MWF und MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Ratten in der 24. und 32. Woche.

| | SHR | MWF-6 ^{SHR} 8 ^{SHR} | MWF | p-ANOVA | MWF vs. SHR | MWF vs. MWF-6 ^{SHR} 8 ^{SHR} | SHR vs. MWF-6 ^{SHR} 8 ^{SHR} |
|--|-----------|---------------------------------------|------------|---------|-------------|---|---|
| Serumharnstoff (mmol/l) | | | | | | | |
| 24. Woche | 7,07±0,12 | 8,91±0,28 | 9,36±0,26 | <0,0001 | <0,0005 | 1,00 | <0,002 |
| 32. Woche | 7,51±0,36 | 7,35±0,28 | 10,72±0,52 | <0,0001 | <0,0003 | <0,0002 | 1,00 |
| Serumkreatinin (µmol/l) | | | | | | | |
| 24. Woche | 35,7±1,1 | 48,8±1,1 | 37,6±1,1 | <0,0001 | 1,00 | <0,0006 | <0,0003 |
| 32. Woche | 38,3±5,7 | 38,9±2,4 | 41,2±0,8 | 0,76 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Kreatinin-Clearance (ml/min/100gKG) | | | | | | | |
| 24. Woche | 0,48±0,02 | 0,34±0,03 | 0,46±0,05 | <0,02 | 1,00 | 0,66 | 0,10 |
| 32. Woche | 0,40±0,06 | 0,48±0,02 | 0,46±0,02 | 0,3 | 0,64 | 1,00 | 0,41 |
| Cystatin C (mg/l) | | | | | | | |
| 24. Woche | 0,07±0,01 | 0,12±0,01 | 0,12±0,003 | <0,0001 | <0,0001 | 1,00 | <0,0001 |
| Triglyceride (mmol/l) | | | | | | | |
| 24. Woche | 0,71±0,04 | 0,65±0,05 | 1,08±0,13 | <0,002 | 0,15 | 0,13 | 1,00 |
| 32. Woche | 1,41±0,15 | 0,81±0,10 | 2,44±0,25 | <0,0001 | 0,006 | <0,0001 | 0,19 |
| Gesamtcholesterin (mmol/l) | | | | | | | |
| 24. Woche | 1,58±0,05 | 2,01±0,04 | 3,16±0,18 | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 | 0,07 |
| 32. Woche | 1,53±0,05 | 1,87±0,17 | 3,91±0,21 | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 | 0,64 |

KG, Körpergewicht

Aus Untersuchungen der Arbeitsgruppe war eine signifikant höhere Plasmaharnstoffkonzentration der MWF-Männchen im Vergleich zu SHR ($p < 0,0005$) bekannt, welche von der 24. zur 32. Woche hin weiter zunahm. Keine Unterschiede zwischen MWF und SHR konnten hingegen hinsichtlich der Plasmakreatininkonzentration und der Kreatinin-clearance festgestellt werden. Für MWF-6^{SHR}8^{SHR} ergab sich in der 24. Woche eine Harnstoffkonzentration von $8,91 \pm 0,28$ mmol/l, die verglichen mit SHR signifikant erhöht war ($7,07 \pm 0,12$ mmol/l, $p < 0,002$). Sie unterschied sich dabei nicht nennenswert von der Konzentration bei MWF ($9,36 \pm 0,26$ mmol/l). In Woche 32 war die Harnstoffkonzentration bei MWF allerdings signifikant höher als bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} ($10,72 \pm 0,52$ mmol/l vs. $7,35 \pm 0,28$ mmol/l, $p < 0,0001$). Gleichzeitig bestand im Vergleich zu SHR in der 32. Woche kein relevanter Unterschied.

Während sich die Plasmakreatininkonzentration zwischen SHR und MWF ($35,7 \pm 1,6$ vs. $36,7 \pm 1,7$ $\mu\text{mol/l}$) in etwa gleich darstellte, war diese bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} ($48,7 \pm 1,06$ $\mu\text{mol/l}$) in der 24. Woche signifikant gegenüber beiden Stämmen erhöht. In der 32. Woche lag kein Unterschied mehr vor. Hinsichtlich der Kreatininclearance bestand keine Differenz oberhalb des Signifikanzniveaus. Bezogen auf das Körpergewicht ergaben sich in der 24. Woche keine Abweichungen hinsichtlich der Clearance-Leistung zwischen den drei Stämmen.

Die Serumkonzentration von Cystatin C war bei MWF und MWF-6^{SHR}8^{SHR} mit einem Mittelwert um $0,12$ mg/l gleich hoch und im Vergleich zu SHR ($0,07 \pm 0,004$ mg/l) signifikant höher ($p < 0,0001$).

Die bei MWF gegenüber SHR in der 24. Woche erhöhte Gesamtcholesterinkonzentration, zeigte sich bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} verglichen mit MWF signifikant reduziert ($p < 0,0001$). Kein statistisch relevanter Unterschied ergab sich hingegen hinsichtlich der Triglyzeridkonzentrationen. Bis zur 32. Woche stiegen die Cholesterin- und Triglyzerid (TG)-Konzentrationen bei MWF weiter an und waren schließlich signifikant gegenüber SHR erhöht. Zu diesem Zeitpunkt waren Cholesterin und TG bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} gegenüber MWF signifikant reduziert ($p < 0,0001$). Im Vergleich zu SHR wies MWF-6^{SHR}8^{SHR} ebenfalls nicht signifikant geringere TG-Spiegel auf.

Die Studien der einzelkonsomen Stämme hatten eine signifikante Reduktion der Harnstoff- und Cholesterin-Konzentration in der 24. Woche sowie zusätzlich einer signifikanten Reduktion der TG in der 32. Woche bei MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} im Vergleich zum Parentalstamm MWF ergeben. Gegenüber den einzelkonsomen Stämmen MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} wies MWF-6^{SHR}8^{SHR} in der 24. Woche erhöhte Kreatininspiegel auf ($39,6 \pm 2,1$ vs. $38,7 \pm 1,3$ vs. $48,8 \pm 1,1$ $\mu\text{mol/l}$, $p < 0,002$). Dieser Unterschied bestand in der 32. Woche jedoch nicht fort. Hinsichtlich der Lipidspiegel lagen in der 32. Woche keine relevanten Unterschiede zwischen MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} und dem doppelkonsomen Stamm vor.

3.2.5 Makroskopische Organbefunde

Die Tabelle 2 bildet ausgewählte relative Organgewichte von MWF-6^{SHR}8^{SHR} im Vergleich zu MWF und SHR in der 24. und 32. Woche ab. Hinsichtlich des Körpergewichts zeigten alle drei Stämme zum Beobachtungszeitpunkt ähnliche Werte um 370 g. Das absolute ($p < 0,01$) und relative Nierengewicht ($p < 0,005$) hingegen war in

der 24. Woche bei MWF gegenüber SHR signifikant geringer. Das relative Herzgewicht von SHR war signifikant höher als beim Vergleichsstamm MWF ($p < 0,0001$). Keine Unterschiede bestanden zwischen MWF und SHR im relativen rechtsventrikulären Gewicht. Wohingegen das relative und absolute linksventrikuläre Gewicht von SHR im Vergleich zu MWF erhöht waren ($p < 0,0001$).

Die Studien der Einzelkonsomen ergaben ein signifikant erhöhtes linksventrikuläres Gewicht bezogen auf das Körpergewicht von MWF-8^{SHR} im Vergleich zu MWF ($p = 0,03$). MWF-6^{SHR}8^{SHR} wies in der 24. Woche ein ähnliches relatives Nierengewicht wie MWF auf und damit ebenfalls ein signifikant geringeres als SHR ($p < 0,04$). Das relative Herzgewicht von MWF-6^{SHR}8^{SHR} war gegenüber MWF hingegen signifikant erhöht ($p < 0,0001$). Der doppelkonsome Stamm erzielte ein zu SHR und MWF intermediäres linksventrikuläres Gewicht und verhielt sich zu SHR ($p < 0,0001$) und MWF ($p < 0,0004$) signifikant.

Im Vergleich zu den einzelkonsomen Stämmen ließen sich in der 24. Woche vergleichbare Körper- und Nierengewichte feststellen. MWF-6^{SHR}8^{SHR} wies unter den konsomen Stämmen das höchste relative linksventrikuläre Gewicht auf. Der Unterschied erwies sich im Vergleich zu MWF-6^{SHR} als signifikant ($p < 0,05$).

In der 32. Woche lagen ähnliche Verhältnisse der Organgewichte vor. Zu diesem Zeitpunkt hatten alle Stämme weiterhin ein vergleichbares Körpergewicht. Wie in der 24. Woche war das relative Nierengewicht von SHR gegenüber MWF signifikant erhöht ($p < 0,003$). Höhere Werte konnten in der 32. Woche für das relative Herzgewicht von SHR gegenüber MWF verzeichnet werden. In der 32. Woche war sowohl das links- ($p < 0,0001$) als auch das rechtsventrikuläre Gewicht bei SHR signifikant höher als bei MWF ($p < 0,001$). In der 32. Woche ergaben sich hinsichtlich des relativen Nieren- und linksventrikulären Gewichts keine signifikanten Unterschiede zwischen den Einzelkonsomen und MWF.

Gegenüber SHR war das relative LV-Gewicht beider Stämme geringer ($p < 0,0001$). Ebenso verhielt sich das relative Nierengewicht von MWF-8^{SHR} zu SHR signifikant geringer ($p < 0,002$). MWF-6^{SHR}8^{SHR} wies ein zu den Stämmen MWF und SHR intermediäres relatives Herzgewicht ohne Signifikanz auf. Das relative linksventrikuläre Gewicht war in der 32. Woche nach SHR im Vergleich aller fünf Stämme am höchsten und verhielt sich zu MWF ($p < 0,02$) und zu SHR ($p < 0,0001$) signifikant.

Tab. 2: Vergleichende phänotypische Charakterisierung männlicher SHR-, MWF- und MWF-6^{SHR}-8^{SHR}-Ratten in der 24. und 32. Woche.

| | SHR | MWF- 6 ^{SHR} 8 ^{SHR} | MWF | p- ANOVA | p-MWF vs. SHR | p-MWF vs. MWF- 6 ^{SHR} 8 ^{SHR} | p-SHR vs. MWF- 6 ^{SHR} 8 ^{SHR} |
|-------------------------------------|------------|---|------------|--------------------|--------------------|---|---|
| Körpergewicht (g) | | | | | | | |
| 24. Woche | 377,5±4,4 | 371,3±6,9 | 363,9±11,3 | 0,47 | 0,68 | 1,00 | 1,00 |
| 32. Woche | 367,4±2,8 | 400,8±8,6 | 390,0±9,4 | 0,07 | 0,27 | 1,00 | 0,08 |
| Nierengewicht (g) | | | | | | | |
| 24. Woche | 2,23±0,02 | 2,06±0,05 | 1,99±0,08 | 0,01 | <0,01 | 1,00 | 0,11 |
| 32. Woche | 2,33±0,06 | 2,23±0,10 | 2,15±0,06 | 0,25 | 0,30 | 1,00 | 1,00 |
| Nierengewicht/ KG (mg/g) | | | | | | | |
| 24. Woche | 5,90±0,05 | 5,56±0,14 | 5,44±0,06 | <0,005 | <0,005 | 1,00 | <0,04 |
| 32. Woche | 6,34±0,20 | 5,58±0,20 | 5,53±0,08 | <0,003 | <0,003 | 1,00 | <0,02 |
| Herzgewicht (mg) | | | | | | | |
| 24. Woche | 1,11±0,01 | 0,96±0,02 | 0,84±0,02 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0005 |
| 32. Woche | 1,16±0,02 | 1,16±0,13 | 0,86±0,01 | <0,003 | <0,009 | <0,01 | 1,00 |
| Herzgewicht/ KG (mg/g) | | | | | | | |
| 24. Woche | 2,94±0,03 | 2,58±0,02 | 2,29±0,04 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |
| 32. Woche | 3,23±0,07 | 2,93±0,42 | 2,21±0,06 | <0,008 | <0,009 | 0,08 | 1,00 |
| Gewicht LV (mg) | | | | | | | |
| 24. Woche | 945,3±12,1 | 779,8±15,4 | 676,8±18,5 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0005 | < 0,0001 |
| 32. Woche | 961,3±19,6 | 823,0±26,7 | 719,3±9,6 | <0,0001 | <0,0001 | <0,002 | <0,0003 |
| Rel. Gewicht LV (mg/g) | | | | | | | |
| 24. Woche | 2,51±0,03 | 2,10±0,01 | 1,86±0,02 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0002 | < 0,0001 |
| 32. Woche | 2,66±0,05 | 2,06±0,05 | 1,85±0,04 | <0,0001 | <0,0001 | <0,02 | <0,0001 |
| Gewicht RV (mg) | | | | | | | |
| 24. Woche | 162,1±6,8 | 177,3±3,3 | 156,8±5,2 | 0,05 | 1,00 | 0,06 | 0,21 |
| 32. Woche | 201,5±12,3 | 187,5±11,0 | 137,8±8,3 | <0,0006 | <0,001 | <0,008 | 1,00 |
| Rel. Gewicht RV (mg/g) | | | | | | | |
| 24. Woche | 0,43±0,06 | 0,48±0,04 | 0,44±0,06 | 0,14 | 1,00 | 0,32 | 0,20 |
| 32. Woche | 0,56±0,04 | 0,47±0,03 | 0,36±0,03 | <0,002 | <0,001 | 0,07 | 0,26 |

KG, Körpergewicht; LV, linker Ventrikel; RV, rechter Ventrikel

Keine Unterschiede konnten für das relative Aortengewicht ermittelt werden. Unterschiede oberhalb des Signifikanzniveaus lagen für MWF-6^{SHR}-8^{SHR} im Vergleich zu

den einzelkonsomen Stämmen in der 32. Woche nicht vor. Das links- und das rechtsventrikuläre Gewicht waren jedoch bei $MWF-6^{SHR}8^{SHR}$ höher als bei den beiden einzelkonsomen Stämmen $MWF-6^{SHR}$ und $MWF-8^{SHR}$.

3.2.6 Histologische Quantifizierung des Nierenschadens bei 24 Wochen alten Tieren

In der 24. Woche, dargestellt in Abbildung 8, wurde analog zu den Parentaltier- und einzelkonsomen Stämmen die Zahl der oberflächlichen Glomeruli bei $MWF-6^{SHR}8^{SHR}$ -Ratten bestimmt. Diese liegen im sonst glomerulifreien Cortex corticis und stellen ein charakteristisches Merkmal der MWF-Ratte dar. Zusätzlich haben einige dieser Glomeruli bei MWF direkten Kontakt zur Nierenkapsel. Aus der Substitution eines SHR-Chromosoms in $MWF-6^{SHR}$ und $MWF-8^{SHR}$ resultierte bei $MWF-6^{SHR}$ eine signifikante Reduktion der oberflächlichen Glomeruli mit Kapselkontakt, nicht jedoch der Gesamtzahl oberflächlicher Glomeruli. Bei $MWF-8^{SHR}$ konnte hingegen eine Reduktion der oberflächlichen Glomeruli ohne Kapselkontakt nachgewiesen werden.

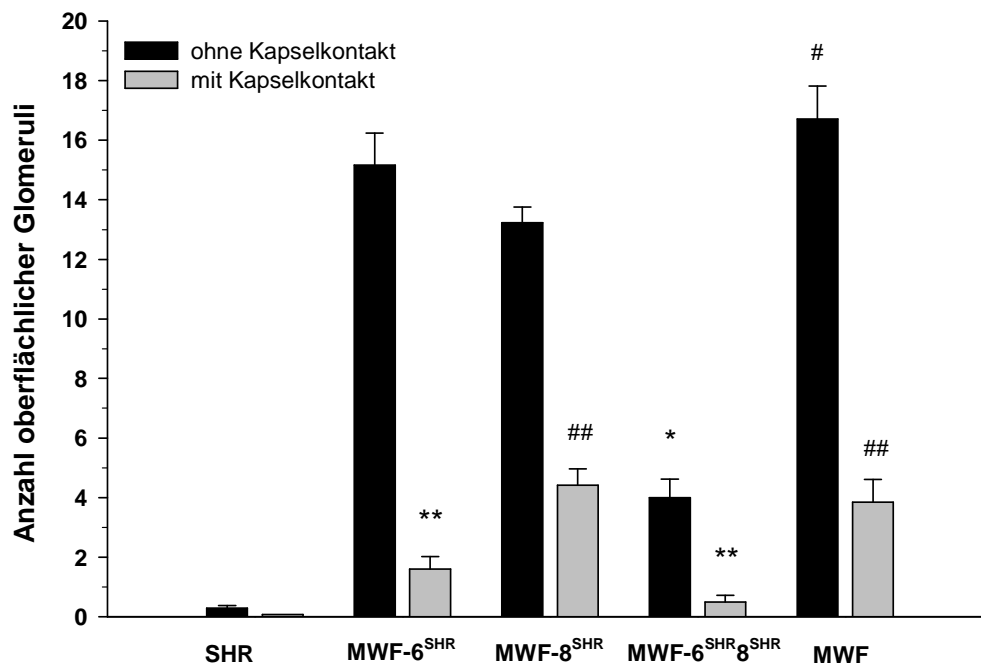


Abb. 8: Anzahl oberflächlicher Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt bei SHR, $MWF-6^{SHR}$, $MWF-8^{SHR}$, $MWF-6^{SHR}8^{SHR}$ und MWF in der 24. Woche.

$p < 0,02$ vs. SHR, $MWF-8^{SHR}$ und $MWF-6^{SHR}8^{SHR}$; ## $p < 0,04$ vs. SHR, $MWF-6^{SHR}$ und $MWF-6^{SHR}8^{SHR}$; * $p < 0,03$ vs. MWF, $MWF-6^{SHR}$, $MWF-8^{SHR}$ und SHR; ** $p < 0,04$ vs. MWF, $MWF-8^{SHR}$.

Die vergleichende Analyse mit dem doppelkonsomen Stamm zeigte, dass $MWF-6^{SHR}8^{SHR}$ sowohl hochsignifikant weniger oberflächliche Glomeruli mit als auch ohne

Kapselkontakt als MWF ($4,5 \pm 0,5$ vs. $20,6 \pm 1,7$, $p < 0,0001$) besitzt. Im Vergleich zu SHR ($0,3 \pm 0,3$) blieb die Anzahl von Glomeruli ohne Kapselkontakt jedoch signifikant höher ($p < 0,05$). Bezüglich der Anzahl oberflächlicher Glomeruli mit Kapselkontakt bestand kein signifikanter Unterschied zu SHR. Im Vergleich der konsomen Stämme war die Gesamtanzahl der oberflächlichen Glomeruli bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} gegenüber den Stämmen MWF-6^{SHR} ($16,8 \pm 1,2$) und MWF-8^{SHR} ($17,7 \pm 0,8$) geringer ($p < 0,0001$). Kein Unterschied oberhalb des Signifikanzniveaus bestand für die Anzahl an Glomeruli mit Kapselkontakt im Vergleich zu MWF-6^{SHR} ($1,6 \pm 0,4$). Somit wies der doppelkonsome Stamm signifikant weniger oberflächliche Glomeruli im Vergleich zu MWF sowie zu den Einzelkonsomen auf. Gleichzeitig war die Zahl gegenüber SHR jedoch erhöht ($p = 0,04$). In der 24. Woche wurde als wichtiger Parameter chronischer glomerulärer Nierenschäden histologisch der GSI mittels PAS-Färbung bestimmt. In Vorstudien zeigte sich, dass der GSI bei MWF im Vergleich zu SHR statistisch hochsignifikant erhöht war ($p < 0,0005$). Bei MWF-6^{SHR} konnte eine signifikante Reduktion des GSI im Vergleich zu MWF verzeichnet werden ($p = 0,006$). Vergleichbar mit MWF hingegen war der GSI bei MWF-8^{SHR}-Ratten. Beide einzelkonsomen Stämme wiesen einen signifikant höheren Score auf als SHR. Die vergleichenden Analysen, dargestellt in Tabelle 3, erbrachten einen hochsignifikant niedrigeren GSI bei doppelkonsomen im Vergleich zu MWF-Tieren ($p < 0,0001$). Gegenüber SHR war der GSI von MWF-6^{SHR}8^{SHR} ebenfalls nicht signifikant geringer.

Tab. 3: Vergleichende histologische Charakterisierung männlicher Ratten in der 24. Woche.

| | SHR | MWF- 6 ^{SHR} 8 ^{SHR} | MWF | p-ANOVA | p-MWF vs. SHR | p-MWF vs. MWF- 6 ^{SHR} 8 ^{SHR} | p-SHR vs. MWF- 6 ^{SHR} 8 ^{SHR} |
|--------------------|-----------------|---|-----------------|--------------------|--------------------|--|--|
| GSI | $0,9 \pm 0,1$ | $0,8 \pm 0,1$ | $1,7 \pm 0,1$ | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | 1,00 |
| RIF [%] | $3,1 \pm 0,2$ | $4,6 \pm 0,2$ | $7,5 \pm 0,5$ | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,03 |
| TDI | $0,04 \pm 0,01$ | $0,11 \pm 0,02$ | $0,38 \pm 0,05$ | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0003 | 0,94 |

Zusätzlich wurde als Marker struktureller Nierenschäden die RIF ermittelt, welche bei MWF ebenfalls signifikant gegenüber SHR erhöht war ($p < 0,0001$). Von den Einzelkonsomen erzielte nur MWF-6^{SHR} eine Reduktion der RIF auf signifikantem Niveau im Vergleich zu MWF ($p < 0,001$). Bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} war die RIF ebenfalls im Vergleich zu MWF in signifikantem Maße reduziert ($p < 0,03$). Zu SHR wies der Doppelkonsome jedoch einen höheren Anteil kollagener Narbenstrukturen auf.

Gegenüber MWF-8^{SHR} war der Anteil signifikant gemindert ($p < 0,0001$). Ein signifikanter Unterschied zu MWF-6^{SHR} konnte hingegen nicht festgestellt werden.

Histologisch hatte sich der TDI bei MWF und MWF-8^{SHR} als signifikant stärker ausgeprägt erwiesen als bei SHR. Bei MWF-6^{SHR} wurde dieser signifikant gemindert.

Bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} war der TDI im Vergleich zu MWF und MWF-8^{SHR} reduziert ($p < 0,0002$), zu SHR war er geringfügig, aber nicht signifikant erhöht.

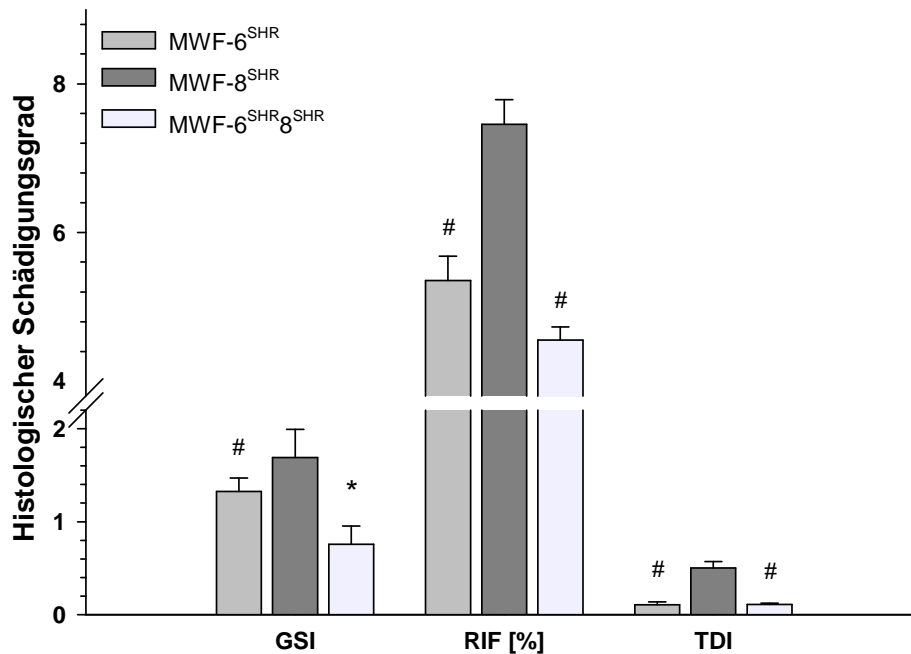


Abb. 9: Vergleich der histologischen renalen Schädigungsindices bei den männlichen konsomen Ratten MWF-6^{SHR}, MWF-8^{SHR} und MWF-6^{SHR}8^{SHR} in der 24. Woche.

$p < 0,007$ vs. MWF-8^{SHR}, * $p < 0,004$ vs. MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR}.

Insgesamt wies MWF-6^{SHR}8^{SHR} im Vergleich zu MWF-8^{SHR} für alle drei Parameter und zu MWF-6^{SHR} für den GSI signifikant niedrigere Werte auf (siehe Abb. 9).

In der Abbildung 10 sind exemplarisch histologische Ausschnitte (1:100) der PAS- bzw. Sirius-Rot-gefärbten Nierenschnitte von 24 Wochen alten MWF-, MWF-6^{SHR}8^{SHR}- und SHR-Männchen abgebildet. In den Nierenrindenausschnitten der PAS-Präparate A bis C ist die zwischen den Stämmen deutlich unterschiedliche Ausprägung der Glomerulosklerose zu sehen. Bei MWF zeigt sich eine degenerative Veränderung der Glomeruli mit Ablagerungen PAS-positiven Materials im Mesangium, sowie um die Kapillarschlingen. Als Ausdruck des fortgeschrittenen Nierenschadens sind einige dilatierte und atrophierte Tubuli mit PAS-positiven Zylindern im Sinne der TDI getroffen.

Weder bei SHR (C) noch MWF-6^{SHR}8^{SHR} (B) sind vergleichbare PAS-Ablagerungen zu sehen, die Tubuli sind unauffällig.

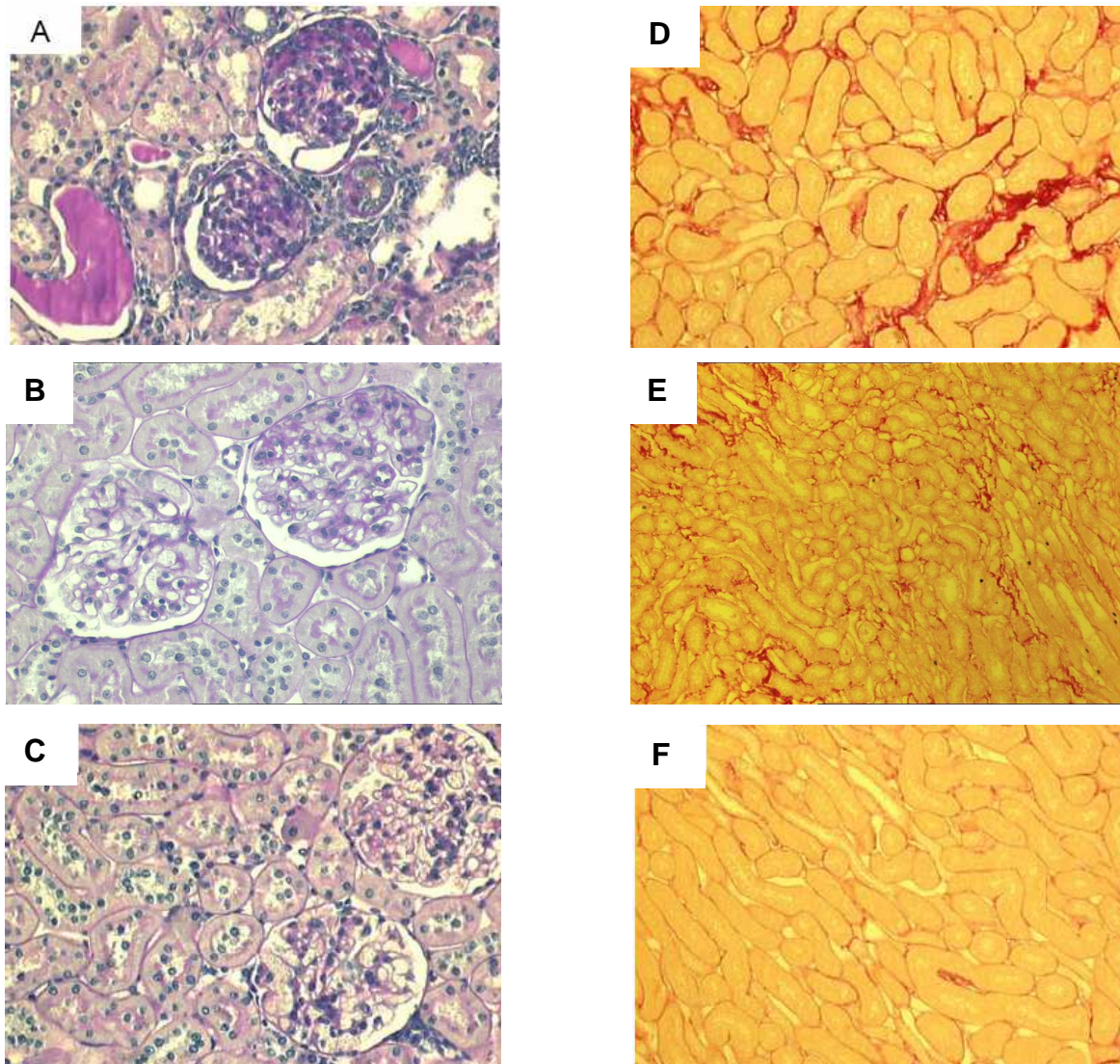


Abb. 10: Histologische Nierenschnitte von männlichen SHR-, MWF-6^{SHR}8^{SHR}- und MWF-Ratten in der 24. Woche.

PAS-Färbung: A-C; Sirius-Rot-Färbung: D-F; MWF: A, D; MWF-6^{SHR}8^{SHR}: B, E; SHR: C, F

Die Sirius-Rot-gefärbten Schnitte D bis F in Höhe des äußeren Markstreifens gewähren einen Eindruck über den Grad der interstitiellen Fibrosierung. Histomorphologisches Korrelat der Kollagenakkumulation sind die kräftig rot gefärbten Areale im Interstitium. Diese treten bei MWF-Tieren (D) deutlich häufiger als bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} (E) oder SHR (F) auf.

3.3 Quantifizierung des Nierenschadens auf molekularer Ebene

Zur Quantifizierung des chronischen Nierenschadens auf molekularer Ebene wurden zusätzlich Genexpressionsanalysen verschiedener im Rahmen chronischer Nierenschäden etablierter Markergene durchgeführt. Unter anderem wurde die Expression von Kollagen III als Fibroseparameter des Interstitiums untersucht.

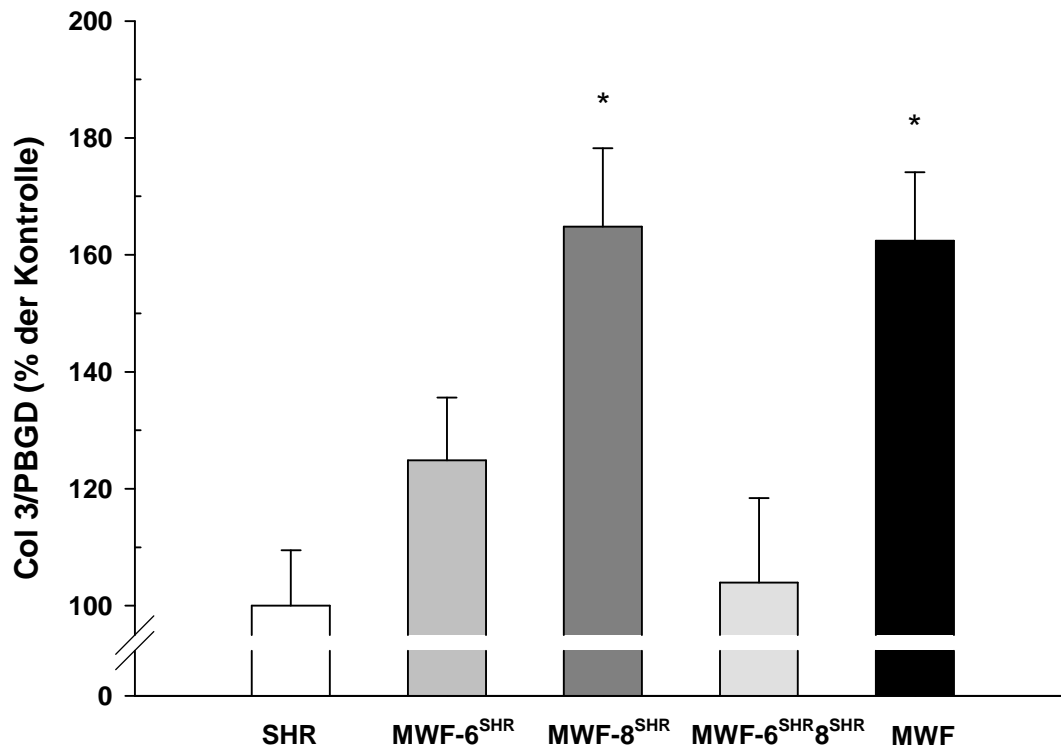


Abb. 11: Relative Kollagen III (Col3)-Expression, normiert auf PBGD, im Nierengewebe 24 Wochen alter männlicher Ratten (SHR 100%).

* $p < 0,03$ vs. SHR, MWF-6^{SHR} und MWF-6^{SHR}8^{SHR}.

Die Abbildung 11 stellt die Expression von Kollagen III im Verhältnis zur Expression des Houskeepinggens PBGD in der Niere 24 Wochen alter Tiere normiert auf SHR dar. Die Ergebnisse zeigen, dass die bei MWF signifikant gegenüber SHR erhöhte Kollagen III-Expression auf das 1,6fache ($p < 0,004$) bei dem einzelkonsomen Stamm MWF-6^{SHR} aufgehoben werden konnte. Dagegen wies MWF-8^{SHR} keine Reduktion der Expression des Fibrosemarkers auf. Die Untersuchung des Doppelkonsomen ergab mit einem p-Wert von 0,02 eine signifikant niedrigere Kollagen III-Expressionsrate als MWF. Ebenso verhielt es sich mit der Expression im Vergleich zum konsomen Stamm MWF-8^{SHR} ($p < 0,02$). Ein relevanter Unterschied zwischen MWF-6^{SHR}8^{SHR} und SHR bestand hingegen nicht. Bei beiden Stämmen fand eine Kollagen III-Expression auf ähnlichem Niveau statt. Obwohl die Expression verglichen mit MWF-6^{SHR} noch einmal geringer war, unterschieden sich diese beiden Stämme nicht signifikant.

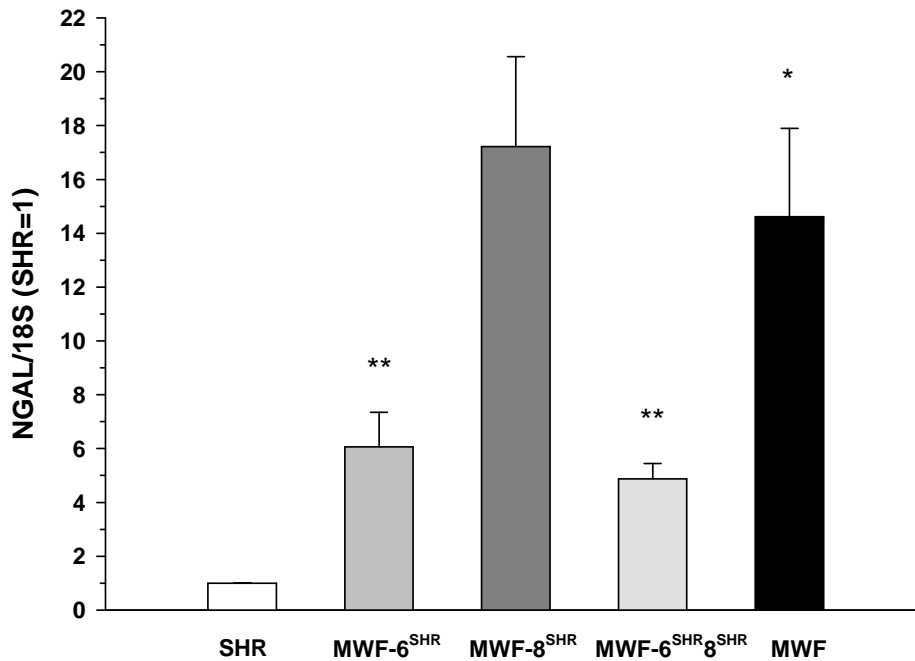


Abb. 12: Vergleich der relativen Expression des neutrophilen Gelatinase-assoziierten Lipocalin-Gens (NGAL), normiert auf 18S, bei männlichen Ratten in der 24. Woche.

* $p < 0,001$ vs. SHR, MWF-6^{SHR}, MWF-6^{SHR}8^{SHR}; ** $p < 0,01$ vs. MWF und MWF-8^{SHR} und SHR.

Zusätzlich untersucht wurde die renale Expression von NGAL v.a. als tubulärer Schädigungsmarker in der 24. Woche. Die Analyse der cDNA-Transkripte von NGAL mittels SYBR-Green Realtime-PCR, zu sehen in der Abbildung 12, zeigte eine statistisch signifikant stärkere Expression bei MWF-Tieren im Vergleich zur nierengesunden SHR-Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Der konsome MWF-8^{SHR} wies eine mit MWF vergleichbare erhöhte Marker-Expression auf. Im Gegensatz dazu war bei MWF-6^{SHR} und MWF-6^{SHR}8^{SHR} die NGAL-Expression signifikant gegenüber MWF reduziert ($p < 0,01$).

3.4 Vergleichende phänotypische Charakterisierung der MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Weibchen

Da hinsichtlich der Nierenfunktion für MWF ein sexueller Dimorphismus bekannt ist, war es zusätzlich von Interesse die Verläufe der verschiedenen nierenspezifischen Parameter bei weiblichen MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Tieren zu untersuchen.

3.4.1 Entwicklung der U_{Alb} im Altersverlauf bei weiblichen Tieren

Insgesamt zeigten sich bei den weiblichen Tieren ähnliche Verläufe auf signifikant niedrigerem Niveau wie bei männlichen Tieren. Vorstudien zeigten, dass bei MWF-Weibchen die U_{Alb} gegenüber SHR ab der 4. Woche signifikant erhöht ist ($0,1 \pm 0,01$ vs. $0,02 \pm 0,01$ mg/24h, $p < 0,0001$). Eine relevante Reduktion der U_{Alb} von MWF-6^{SHR}8^{SHR} gegenüber MWF war ab der 8. Woche zu verzeichnen ($0,45 \pm 0,05$ vs. $5,2 \pm 0,9$ mg/24h, $p < 0,0001$), welche im Verlauf weiter zunahm. Sowohl SHR- als auch MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Weibchen erreichten bis zur 32. Woche keine relevante Albuminausscheidung > 1 mg/24h (siehe Abb. 13).

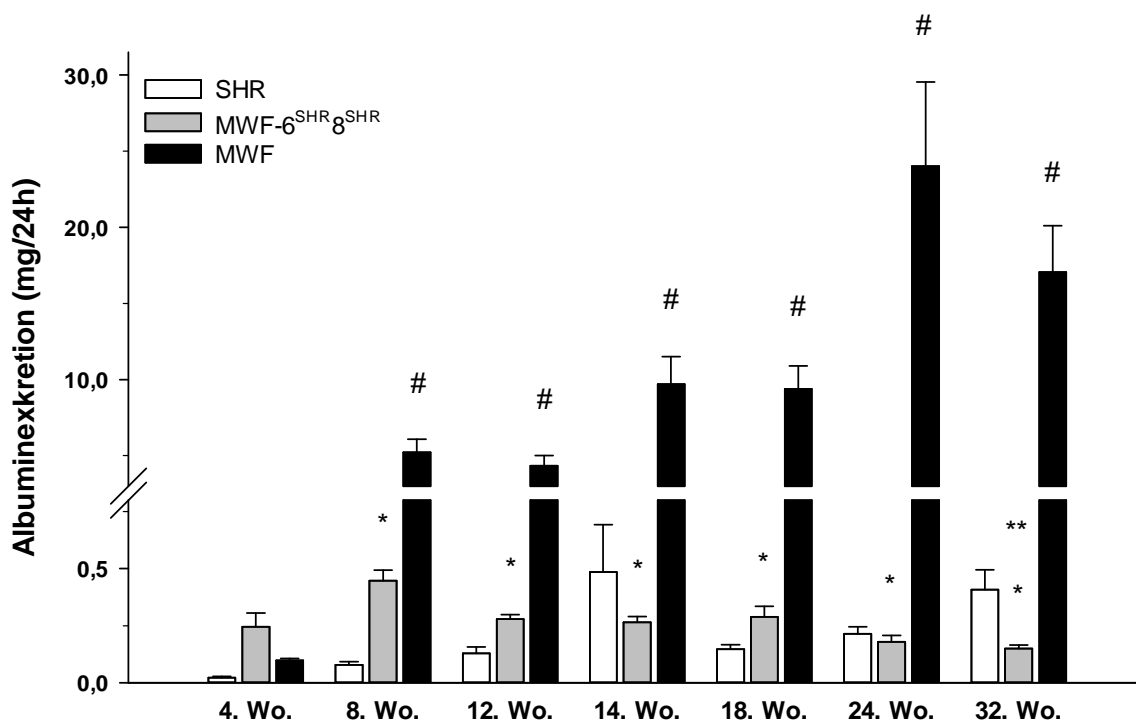


Abb. 13: Vergleich der Albuminexkretion im Urin bei weiblichen SHR-, MWF-6^{SHR}8^{SHR}- und MWF-Ratten von der 4. bis zur 32. Woche.

* $p < 0,0001$ vs. MWF; ** $p < 0,002$ vs. SHR; # $p < 0,0001$ vs. SHR und MWF-6^{SHR}8^{SHR}.

Die Untersuchungen von MWF-6^{SHR}- und MWF-8^{SHR}-Weibchen konnten eine signifikante Reduktion der U_{Alb} gegenüber MWF-Weibchen ab der 8. Woche nachweisen. In der 18. Woche zeigte sich verglichen mit ihnen bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} eine noch einmal signifikant geringere U_{Alb} ($0,28 \pm 0,05$ vs. $0,83 \pm 0,13$ vs. $1,59 \pm 0,45$ mg/24h, $p < 0,0001$). Bei beiden einzelkonsomen Stämmen lag die U_{Alb} jedoch im normalen bzw. hochnormalen Bereich (siehe Abb. 14).

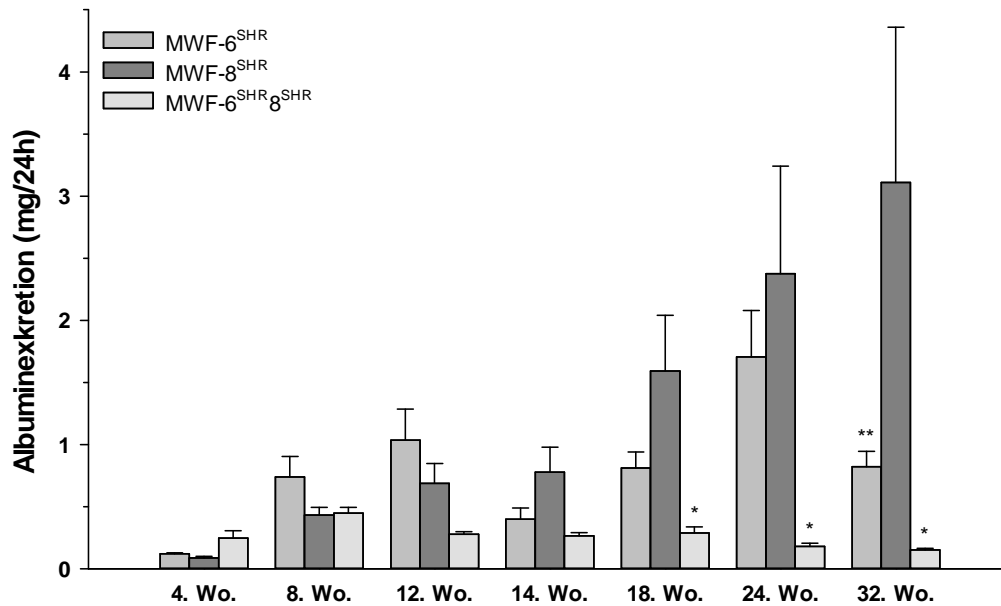


Abb. 14: Vergleich der Albuminexkretion im Urin bei weiblichen konsomen Ratten von der 4. bis zur 32. Woche.

* $p < 0,001$ vs. MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR}; ** $p < 0,05$ vs. MWF-8^{SHR}

Im Vergleich der U_{Alb} -Werte männlicher und weiblicher Tiere des jeweiligen Stamms fanden sich eindeutige intersexuelle Unterschiede.

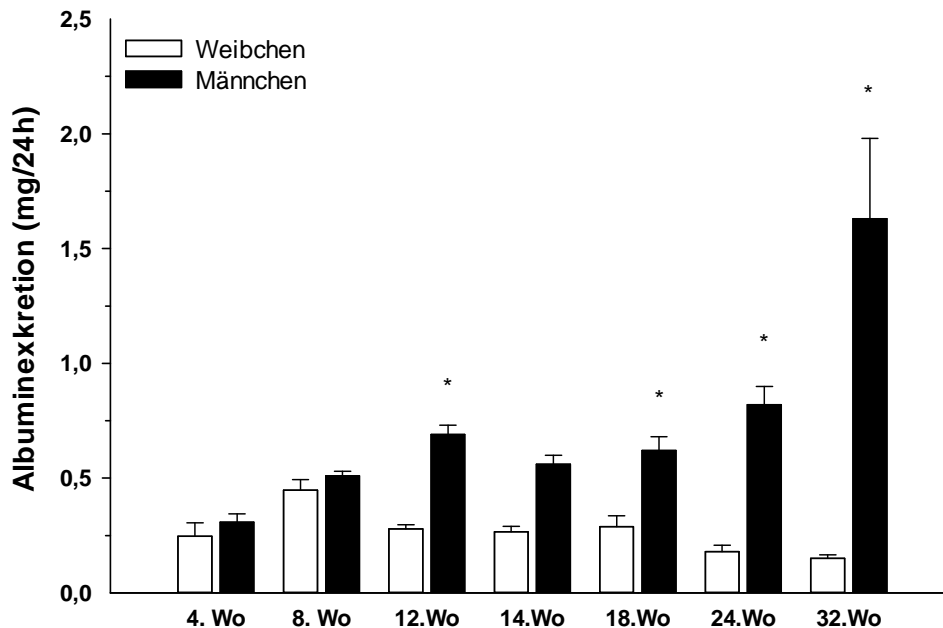


Abb. 15: Vergleich der Albuminausscheidung im Urin bei männlichen und weiblichen MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Ratten in der 4. bis 32. Woche.

* $p < 0,003$ vs. MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Weibchen.

Sowohl bei SHR, als auch MWF wiesen die Weibchen im Vergleich zu den Männchen deutlich niedrigere U_{Alb} -Werte auf. Ein signifikanter Unterschied bestand bei MWF ab der 8. Woche mit $18,1 \pm 1,98$ versus $5,2 \pm 0,9$ mg/24h. Im Altersverlauf nahm dieser Unterschied auf $354,6 \pm 37,6$ vs. $17,1 \pm 3,0$ mg/24h in der 32. Woche zu. Analog zeigte

sich eine signifikant geringere U_{Alb} bei doppelkonsomen Weibchen gegenüber doppelkonsomen Männchen anhaltend ab der 18. Woche ($0,29 \pm 0,08$ vs. $0,62 \pm 0,06$ mg/24h, $p < 0,005$, siehe Abb. 15). Im Vergleich zu MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} wurde dieser intersexuelle Unterschied bei insgesamt reduzierten U_{Alb} -Werten deutlich später manifest (MWF-8^{SHR} ab Woche 8 und MWF-6^{SHR} ab Woche 12, $p < 0,0005$).

3.4.2 Erweiterte Altersverlaufsstudie zur U_{Alb} in der 32. bis 52. Woche

Kongruent verhielten sich die Ergebnisse der weiblichen im Vergleich zu den männlichen Tieren jenseits der 32. Woche (siehe Abb. 16). Hier resultierte ein signifikanter Unterschied in der Albuminausscheidung ab der 48. Woche zwischen SHR- und MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Weibchen ($1,03 \pm 0,29$ mg/24h vs. $0,2 \pm 0,04$ mg/24h, $p < 0,0001$). Die Weibchen beider Stämme wiesen nur mäßig erhöhte U_{Alb} -Werte auf, welche zu jedem Zeitpunkt gegenüber den Männchen des jeweiligen Stamms signifikant geringer waren ($p < 0,0001$).

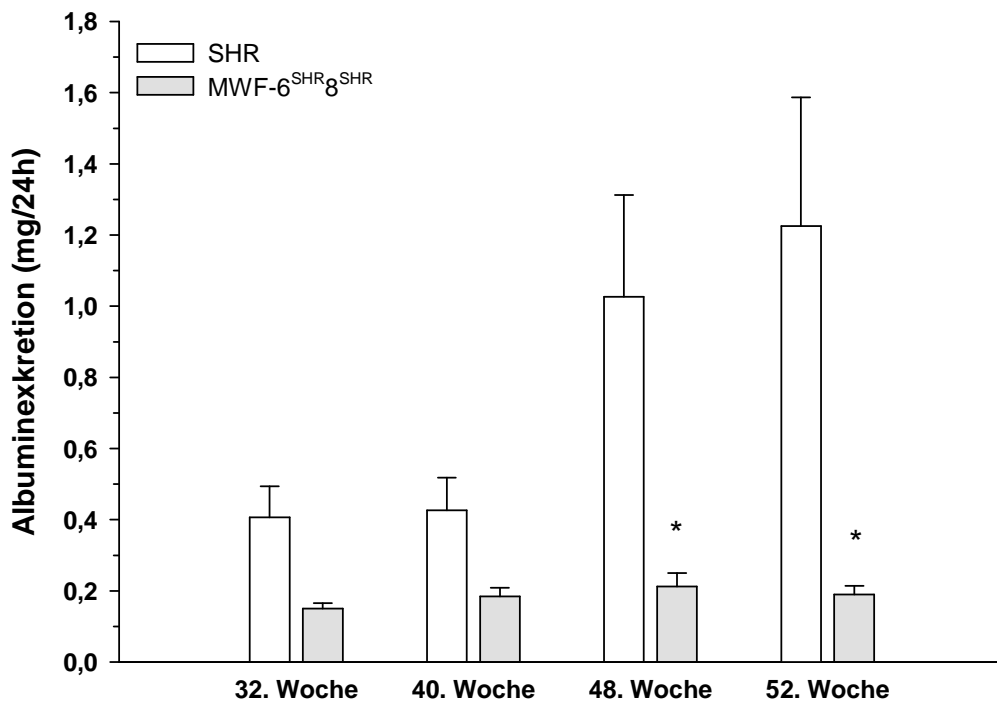


Abb. 16: Vergleich der Albuminexkretion im Urin bei weiblichen SHR- und MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Ratten von der 32. zur 52. Woche.

* $p < 0,0005$ vs. SHR.

3.4.3 Vergleichende Analyse der systolischen Blutdrücke

MWF-Weibchen wiesen in der 14. Woche mit $142,5 \pm 1,8$ mmHg einen signifikant niedrigeren systolischen Blutdruck als SHR-Weibchen auf ($157,6 \pm 2,2$ mmHg).

Der SBD von MWF-6^{SHR} (142,8±1,6 mmHg) zeigte keinen Unterschied im Vergleich zu MWF, während MWF-8^{SHR} (148,3±1,5 mmHg) nicht signifikant höhere Werte erzielte. Zu SHR war der SBD von MWF-8^{SHR} geringer ($p < 0,03$). In der vorliegenden Studie konnte festgestellt werden, dass der SBD der weiblichen MWF-6^{SHR}8^{SHR}- mit 163,3±2,2 mmHg nicht signifikant höher war als bei weiblichen SHR-Ratten ($p = 0,6$). Verglichen mit MWF und den einzelkonsomen Stämmen war der SBD bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} hingegen in signifikantem Maße erhöht ($p < 0,0001$). Interessanterweise fand sich in der 14. Woche nur bei den SHR-Tieren eine signifikante Blutdruckdifferenz zwischen männlichen und weiblichen Tieren von ca. 20 mmHg ($p < 0,0001$). Ein vergleichbares Bild zeichnete sich bei den SBD-Daten der 24. Woche ab. Signifikant geringere Drücke wiesen MWF-, MWF-6^{SHR}- und MWF-8^{SHR}- im Vergleich zu SHR-Weibchen auf. Die Weibchen dieser drei Stämme zeigten ein untereinander vergleichbares systolisches Blutdruckprofil. Die doppelkonsomen Weibchen hingegen erzielten wieder mit SHR-Weibchen vergleichbar hohe Drücke (151,5±1,1 vs. 157,1±2,9 mmHg). Sie waren gegenüber allen anderen Stämmen signifikant erhöht ($p < 0,0001$).

Anders als in der 14. lagen in der 24. Woche relevante Unterschiede des SBD zwischen männlichen und weiblichen Tieren bei beinahe allen Stämmen vor. Weibchen hatten einen signifikant geringeren SBD als männliche Tiere des jeweiligen Stamms ($p < 0,0001$). Eine Ausnahme stellte MWF dar, bei dem keine signifikante SBD-Differenz zwischen Männchen und Weibchen auftrat.

3.4.4 Vergleichende histologische Auswertung

Ebenfalls beurteilt wurde die Anzahl oberflächlicher Glomeruli im intra- und intersexuellen Vergleich (siehe Abb. 17). Die doppelkonsomen Weibchen wiesen signifikant weniger oberflächliche Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt auf als MWF-Weibchen (7,5±0,7 vs. 21,3±1,6, $p < 0,0001$). Gegenüber SHR-Weibchen (1,0±0,3) war die Anzahl hingegen, ausgenommen der Anzahl der Glomeruli mit Kapselkontakt, signifikant erhöht ($p < 0,005$). Analog zu den Männchen bestand zwischen den Weibchen der beiden konsomen Stämme MWF-6^{SHR} (17,6±1,2) bzw. MWF-8^{SHR} (16,9±0,9) und MWF keine signifikante Reduktion in der Gesamtzahl oberflächlichen Glomeruli. Glomeruli mit Kapselkontakt traten bei MWF-6^{SHR}-Weibchen seltener auf, als bei MWF-Weibchen ($p < 0,0001$). Wie bei allen vier Vergleichsstämmen konnte hinsichtlich der oberflächlichen Glomerulianzahl kein statistisch relevanter intersexueller Unterschied festgestellt werden.

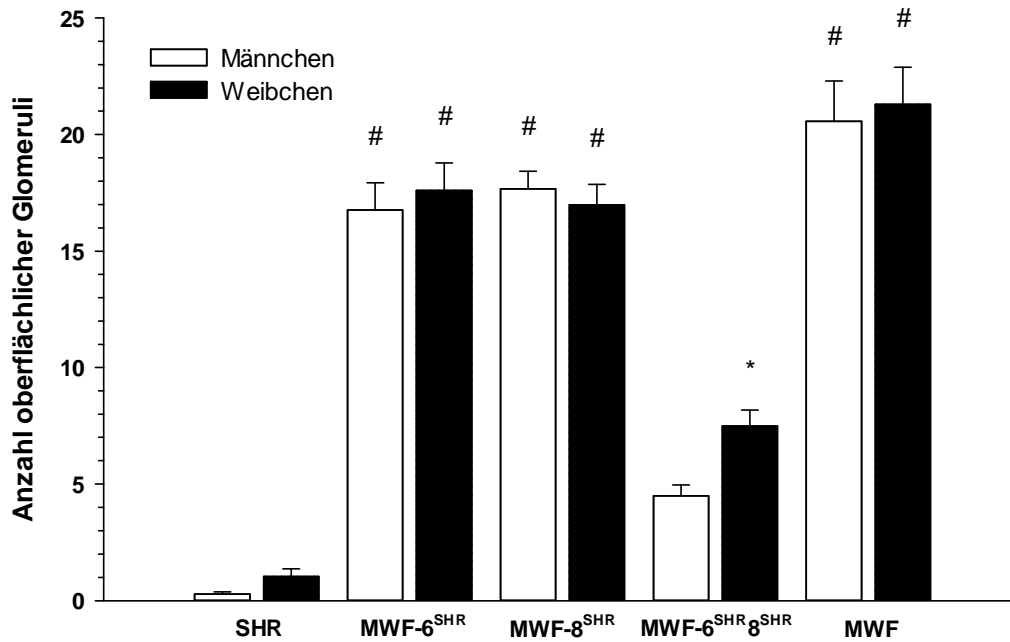


Abb. 17: Vergleich der Anzahl oberflächlicher Glomeruli bei männlichen und weiblichen SHR-, MWF-6^{SHR}-, MWF-8^{SHR}-, MWF-6^{SHR}8^{SHR}- und MWF- Ratten in der 24. Woche.

$p < 0,0001$ vs. SHR und MWF-6^{SHR}8^{SHR}; * $p < 0,005$ vs. SHR-Weibchen.

Die Ergebnisse der histologischen Parameter GSI, RIF und TDI sind in Abbildung 18 dargestellt. Während der GSI und die RIF bei den Weibchen keine Unterschiede zwischen SHR und MWF aufwiesen, war die TDI bei MWF- signifikant stärker ausgeprägt als bei SHR-Weibchen. Die MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Weibchen zeigten hinsichtlich der GSI und RIF ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zu den Parentaltierstämmen bei insgesamt niedrigen Schädigungsindizes. Mäßig geringer als bei MWF war die RIF bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} ausgebildet, unterschied sich jedoch statistisch nicht signifikant. Die tubulären Schäden waren hingegen wie bei SHR-Weibchen signifikant gegenüber MWF reduziert ($p < 0,01$). Durch Studien der Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass der Grad der Glomerulosklerose und interstitiellen Nierenfibrose analog zu den biochemischen Parametern einen signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen MWF-Ratten aufwies und weibliche Tiere dieses Stamms histologisch deutlich weniger Parenchymschäden als die Männchen zeigten. Ein histologischer Unterschied zwischen SHR-Männchen und -Weibchen bestand hingegen bei Tieren im Alter von 24 Wochen nicht. Aufgrund der geringen histologisch erfassbaren Nierenschäden bei weiblichen MWF-Tieren zeigte sich im Vergleich zu den SHR-Weibchen kein Unterschied in der RIF und dem GSI. Signifikant höher war hingegen trotzdem der TDI bei MWF- versus SHR-Weibchen ($p < 0,0001$).

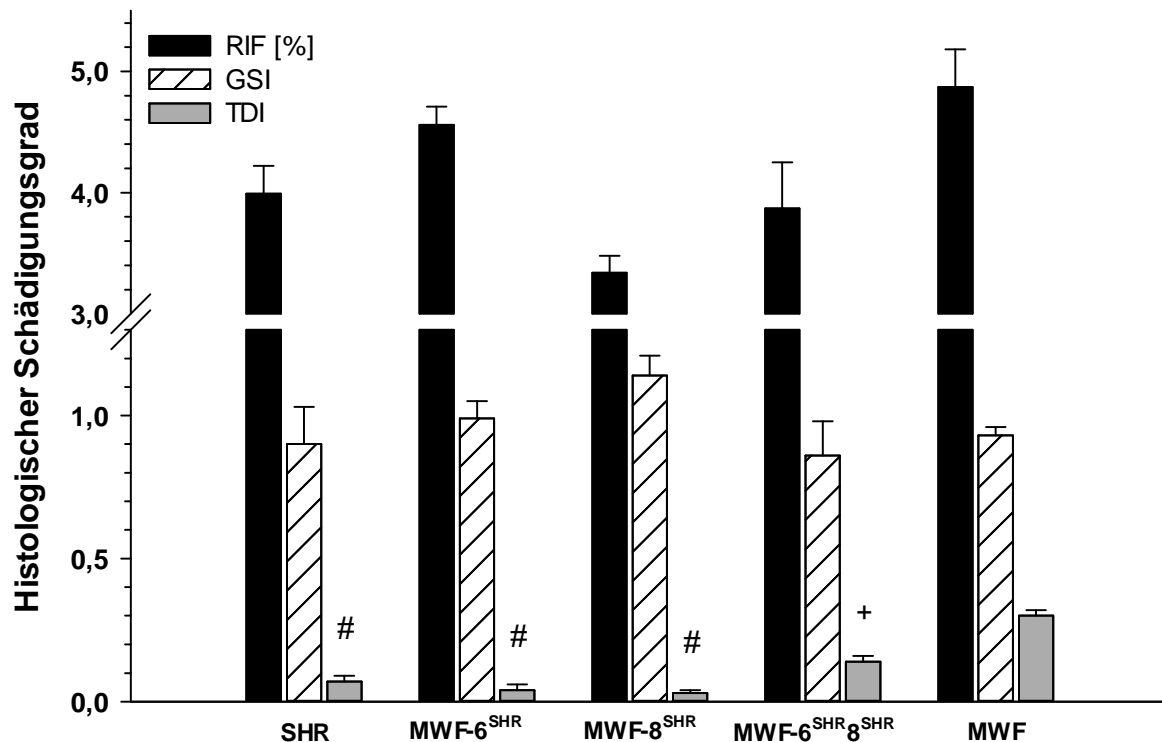


Abb. 18: Histologische Parameter bei weiblichen SHR-, MWF-6^{SHR}-, MWF-8^{SHR}-, MWF-6^{SHR}8^{SHR}- und MWF-Ratten.

$p < 0,0001$ vs. MWF-Weibchen; + $p = 0,009$ vs. MWF-Weibchen.

Analoge Ergebnisse fanden sich in der vorliegenden Studie für MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Weibchen. Eine signifikante Reduktion der renaler Schäden gegenüber MWF-Weibchen konnte für den TDI gemessen werden ($0,14 \pm 0,02$ vs. $0,3 \pm 0,05$, $p = 0,009$). Es lagen keine relevanten Abweichungen in Bezug auf die histologischen Schädigungsindizes zwischen MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Weibchen und -Männchen ($0,11 \pm 0,02$) vor. Beide Geschlechter wiesen eine vergleichsweise unauffällige Nierenhistologie auf.

4. Diskussion

Das Auftreten einer pathologisch erhöhten Albuminausscheidung stellt einen wichtigen Risikofaktor für renale, kardio- und cerebrovaskuläre Morbidität sowie die Mortalität dar und tritt mit einer Prävalenz von 5,1-6,6% in der Allgemeinbevölkerung auf (Hillege et al., 2001; Jones et al., 2002; Atkins, 2005). Das Risiko ist umso höher, wenn gleichzeitig eine Bluthochdruckerkrankung oder ein Diabetes mellitus vorliegen (Bigazzi et al., 1998; Jensen et al., 2000; Gerstein et al., 2001).

Die MWF-Ratte zeichnet sich durch die spontane Entwicklung einer U_{Aib} bereits bei acht Wochen alten Tieren aus. Diese steigt im Altersverlauf progredient an und führt schließlich zu einer massiven U_{Aib} jenseits nephrotischer Grenzwerte. In der Folge

entwickelt sie ausgeprägte strukturelle Nierenschäden im Sinne einer fokalsegmentalen Glomerulosklerose, RIF und tubulären Schädigung (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Analog zu humangenetischen Studien hat sich die U_{Alb} bei MWF als polygenetisch determiniert erwiesen (Schulz et al., 2002). Damit stellt MWF einen wertvollen Modellorganismus für die Untersuchung der genetischen Einflussfaktoren auf eine pathologische Albuminausscheidung dar.

In vorangegangenen Kosegregations- und Kopplungsanalysen der Arbeitsgruppe mit dem kontrastierenden Stamm SHR, sowie der normotensiven und nierengesunden Lewis-Ratte konnten insgesamt elf QTL identifiziert werden, die Einfluss auf die Ausprägung der U_{Alb} bei MWF nehmen (Schulz et al., 2002, Schulz et al. 2003). Interessanterweise konnte in beiden Studien ein U_{Alb} -QTL auf RNO6 (LOD 10,1) detektiert werden, welcher auf die U_{Alb} bei bereits jungen, acht Wochen alten Männchen Einfluss nimmt. Ein zweiter sehr wichtiger U_{Alb} -QTL befindet sich auf RNO8 (LOD 6,4) und zeigte eine signifikante Kopplung zur U_{Alb} bei älteren Tieren ab der 14. Lebenswoche (Schulz et al., 2003).

In der Backcross-(BC) Population aus SHR und MWF wurden allein durch die U_{Alb} -QTL auf RNO6 und RNO8 33,5% der Varianz der U_{Alb} begründet (Schulz et al., 2003). Interessant war zudem die Identifizierung eines signifikanten QTL für die Anzahl oberflächlicher Glomeruli auf RNO6, wie sie für MWF charakteristisch sind. Ebenfalls fand sich im QTL-Bereich eine wahrscheinliche Kopplung (LOD-Score 2,4) zur renalen interstitiellen Fibrose (Schulz et al., 2003). Da die beiden U_{Alb} -QTL auf RNO6 und RNO8 in der Kopplungsanalyse einen entscheidenden Einfluss auf den albuminurischen Phänotyp der MWF-Ratte zu nehmen schienen, erfolgte in der Arbeitsgruppe die Zucht der einzelkonsomen Stämme $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}$ und $\text{MWF-8}^{\text{SHR}}$. Über ein markergestütztes serielles Rückkreuzen wurde so jeweils RNO6 bzw. RNO8 von SHR in den genetischen Hintergrund von MWF transferiert.

Durch den konsomen Stamm $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}$ wurde die Bedeutung des QTL auf RNO6 für die U_{Alb} -Entwicklung bei MWF bestätigt. Interessanterweise konnte die frühzeitige Entwicklung der U_{Alb} durch den Austausch von RNO6 vollständig supprimiert werden. Bis zum Studienendpunkt in der 32. Woche zeigte sich eine signifikante Reduktion der U_{Alb} um etwa 86% im Vergleich zum MWF-Stamm (Schulz et al., 2007). Zusätzlich bestätigt wurde die Wirkung des QTL auf die Entwicklung der RIF und die Anzahl oberflächlicher Glomeruli (Schulz et al., 2007).

Die Studie der einzelkonsomen Linie MWF-8^{SHR} führte ferner zur Validierung des detektierten U_{Alb} -QTL auf RNO8. Überraschenderweise zeigte sich ebenfalls eine massive Reduktion der U_{Alb} im Altersverlauf um bis zu 93% (Schulz et al., 2008a).

Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Zucht eines doppelkonsomen Stamms, MWF-6^{SHR}8^{SHR}, bei dem beide Chromosomen von SHR in das Hintergrundgenom von MWF transferiert wurden. Ziel der Arbeit war die vergleichende Analyse hinsichtlich der U_{Alb} , histologischer, biochemischer Parameter und Expressionsmarker, um das Verständnis über diese beiden entscheidenden QTL zu erweitern und mögliche QTL-Interaktionen beurteilen zu können. Als Referenzstämme dienten die Parentalstämme MWF und SHR, sowie zusätzlich die beiden einzelkonsomen Stämme, MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR}, als Maß einer möglichen Chromosomeninteraktion.

Wegen des für MWF bekannten sexuellen Dimorphismus, welcher zu einer signifikant höheren U_{Alb} und ausgeprägten Nierenschäden vor allem bei männlichen Ratten führt, lag der Schwerpunkt der vergleichende Phänotypisierung bei den männlichen Tieren der jeweiligen Stämme.

Die vergleichenden Analysen zwischen den Parentalstämmen SHR und MWF und dem doppelkonsomen MWF-6^{SHR}8^{SHR} zeigten eindrücklich die hohe Relevanz der zwei auf RNO6 und RNO8 lokalisierten U_{Alb} -QTL auf den albuminurischen Phänotyp von MWF. Während SHR bis zur 12. Woche eine nur geringe Albuminausscheidung von <1 mg/24h aufweist, tritt bei MWF bereits ab der achten Woche eine relevante pathologische U_{Alb} auf, welche ab der 18. Woche mit >150 mg/24h einer U_{Alb} im nephrotischen Bereich entspricht (Schachter et al., 2005). Interessanterweise konnte bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} durch den Austausch der beiden QTL-tragenden Chromosomen RNO6 und RNO8 die U_{Alb} komplett eliminiert werden. Bis zur 24. Woche entwickelten MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Männchen keine pathologische Albuminausscheidung und waren damit im Gegensatz zu den beiden einzelkonsomen Stämmen MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} vollständig U_{Alb} -resistent. Erst in der 32. Woche überschreitet der doppelkonsome Stamm den Schwellenwert von 1 mg/24h. Überraschenderweise liegt zu diesem Zeitpunkt ebenso im Vergleich zum Referenzstamm SHR eine signifikant geringere U_{Alb} vor. Demnach ist durch den Effekt der U_{Alb} -QTL auf RNO6 und RNO8, die U_{Alb} im MWF-Hintergrund bis zur 32. Woche vollkommen aufgehoben worden, obwohl nach wie vor mindestens 9 signifikante U_{Alb} -QTL im MWF-Genom verblieben sind.

Dieser beachtliche Effekt steht in Einklang zu den Ergebnissen der einzelkonsomen Stämme MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR}. Bereits durch den Austausch von RNO6, resultierte eine Reduktion der U_{Alb} auf ein Zehntel in der 24. Woche bzw. ein Siebtel in der 32. Woche (Schulz et al., 2007). Ein ebenfalls beeindruckender Effekt auf die U_{Alb} zeigte sich bei MWF-8^{SHR}, bei dem die U_{Alb} ab der achten Woche mäßig anstieg und bis zur 32. Woche auf ein Fünfzehntel gegenüber MWF reduziert blieb (Schulz et al., 2008a).

Der ausgeprägte Einfluss bereits eines einzelnen U_{Alb} -QTL auf den Phänotyp wird bestätigt durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen. Die salzsensitive Dahl-Ratte stellt einen Inzuchtrattenstamm dar, welcher neben einem Hypertonus und kardiovaskulärer Schäden einen proteinurischen Nierenschaden aufweist und ebenfalls als genetisches Modell v. a. der hypertensiven Nephropathie dient. Garrett et al. identifizierten neun U_{Alb} -QTL bei der Dahl-Ratte (Garrett et al., 2003). Der Austausch eines einzelnen QTL auf RNO2 führte bei dem kongenen Stamm S.SHR zur Reduktion der U_{Alb} um zwei Drittel verglichen mit dem Parentaltierstamm SHR (Garrett et al., 2007). Dies belegt die hohe Relevanz bereits einzelner QTL für polygenetisch beeinflusste Merkmale. Ihre Wirkung variiert abhängig von der ermittelten Kopplungswahrscheinlichkeit und Interaktionsstärke mit anderen Einflussfaktoren.

Bisher einzigartig ist hingegen die komplette Eliminierung des polygenetisch determinierten Merkmals U_{Alb} durch die Substitution nur einzelner QTL, wie sie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Andere Arbeitsgruppen erzielten eine Reduktion der Albumin- bzw. Proteinausscheidung um 60%-75% (Rangel-Filho et al., 2005; Mattson et al., 2005; Liang et al., 2008; Packard et al., 2009). Durch die Substitution von RNO1 der BN-Ratte bei Dahl/SS konnte unter einer Hochsalzdiät die U_{Alb} ebenfalls abgeschaltet werden (Mattson et al., 2008). Dabei handelte es sich allerdings nicht um eine Altersverlaufsstudie. Die U_{Alb} wurde einmalig in der 11. Woche bestimmt. Ein Anstieg im Altersverlauf ist demnach nicht auszuschließen.

Überraschend war zudem der Befund, dass die Substitution beider Chromosomen ab der 14. Woche ebenfalls gegenüber SHR, dem nierengesunden Referenzstamm, zu einer signifikant geringeren U_{Alb} führte. Um eine U_{Alb} bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} im Alter ausschließen zu können, wurden die Untersuchungen bis zur 52. Lebenswoche fortgesetzt. Tatsächlich bestand der Unterschied zwischen beiden Stämmen im Verlauf weiter fort. Während die Albuminausscheidung bei dem Doppelkonsomen relativ konstant blieb, nahm die U_{Alb} bei SHR-Männchen altersbedingt weiter zu. Diese Ergebnisse stimmen mit Studien von Feld et al. überein, welche einen signifikanten

Anstieg der Gesamtproteinexkretion im Urin bei SHR-Ratten ab der 45. Woche belegen (Feld et al., 1977). Sie zeigte sich maßgeblich durch einen Anstieg des renalen Albuminverlusts bedingt. Feld et al. schlussfolgerten aufgrund einer lichtmikroskopisch sichtbaren Glomerulosklerose, dass zu diesem Zeitpunkt die Selektivität der glomerulären Filtrationsbarriere aufgrund struktureller Schäden abnimmt (Feld et al., 1977). Darüber hinaus konnten Bakoush et al. ab dem 14. Lebensmonat ebenfalls einen milden Anstieg der U_{Alb} bei SHR-Tieren feststellen (Bakoush et al., 2004).

Warum jedoch die U_{Alb} bei $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}\text{8}^{\text{SHR}}$ gegenüber dem nierengesunden Referenzstamm SHR trotz Persistenz von mindestens vier signifikanten U_{Alb} -QTL im Genom reduziert wurde, kann in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Bekannt ist, dass der genetische Hintergrund entscheidenden Einfluss auf die Wirkung eines QTL nimmt (Packard et al., 2009). Es wäre beispielsweise möglich, dass weitere renoprotektive Gene auf RNO6 und/oder RNO8 von SHR im MWF-Hintergrund wirken und die Penetranz der verbliebenen U_{Alb} -QTL bei MWF beeinflussen. Darüber hinaus könnte eine direkte Interaktion zwischen beiden QTL von Bedeutung sein. Moore stellte die Hypothese auf, dass Epistasie, die Interaktion zwischen Genen, neben Gen-Umweltinteraktionen ein ubiquitäres Merkmal komplexgenetischer Erkrankungen darstellt und der Effekt dieser Gen-Gen-Interaktion von größerer Bedeutung ist, als die Ausprägung der Einzelwirkungen aller Suszeptibilitätsgene zusammen (Moore, 2003). Die beiden Chromosomen könnten außerdem eine wichtige Schlüsselposition in einem U_{Alb} -relevanten Pathway haben, anders als die genetischen Faktoren der anderen QTL.

Da ein Bluthochdruck mit einem erhöhten Risiko für chronische Nierenschäden assoziiert ist, und ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des systolischen Blutdrucks zwischen MWF und SHR bekannt ist (Fassi et al., 1998; Kreutz et al., 2000; Levey et al., 2003; Schulz et al., 2007, Schulz et al., 2008), wurden die systolischen Blutdrücke der konsomen Stämme vergleichend untersucht. Es stellte sich heraus, dass der SBD von $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}\text{8}^{\text{SHR}}$ gegenüber MWF signifikant erhöht war. Der SBD des doppelkonsomen Stamms war zwar ca. 6 mmHg geringer als der von SHR, jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus. Die U_{Alb} konnte demnach bei $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}\text{8}^{\text{SHR}}$ vollständig aufgehoben werden, obwohl dieser eine mit SHR vergleichbare Hypertonie und somit einen wichtigen Risikofaktor für chronischen Nierenschäden aufwies. Vorbefunde legen die Vermutung nahe, dass der systolische Blutdruck für die U_{Alb} bei MWF von untergeordneter Bedeutung ist. Dies wird durch mindestens zwei Feststellungen

gestützt. Zum einen konnte in Kopplungs-Analysen bei MWF und Dahl/SS gezeigt werden, dass die meisten U_{Alb} -QTL keine Kolokalisation zu Hypertonie-QTL aufwiesen, sondern unabhängig voneinander vererbt wurden (Schulz et al., 2002; Brown et al., 1996; Poyan Mehr et al., 2003; Garrett et al., 2003; Siegel et al., 2004). Zum anderen konnte bereits bei $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}$ und $\text{MWF-8}^{\text{SHR}}$, welche beide einen signifikant höheren SBD aufwiesen als MWF, festgestellt werden, dass trotz des erhöhten Blutdrucks eine signifikante Besserung der U_{Alb} und Nierenparameter auftrat und damit die U_{Alb} bei MWF blutdruckunabhängig ist (Schulz et al., 2007; Schulz et al., 2008a). Ebenso besteht eine verbesserte Nierenfunktion gegenüber den einzelkonsomen Stämmen trotz eines signifikant höheren Blutdrucks.

Anders verhält es sich möglicherweise bei SHR. Bei SHR-Ratten besteht in der 14. Woche ein zu $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}\text{8}^{\text{SHR}}$ signifikant höherer SBD und obwohl nicht signifikant, lassen sich in der 24. Woche bei SHR etwa um 6 mmHg höhere Drücke als beim Doppelkonsomen feststellen. Es lässt sich also nicht ausschließen, dass höhere Blutdrücke bereits bei jungen SHR-Tieren im Alter zu signifikant erhöhten U_{Alb} -Werten im Vergleich zu $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}\text{8}^{\text{SHR}}$ beitragen. In lichtmikroskopischen Untersuchungen von über 46 Wochen alten SHR-Ratten konnte eine deutlich ausgeprägtere Glomerulosklerose tief kortikal liegender (juxtamedullärer) Glomeruli im Vergleich zu oberflächlicher liegenden nachgewiesen werden. Dieser Unterschied könnte auf eine v. a. hypertensive renale Schädigung hinweisen, da juxtamedulläre Glomeruli die höchsten Blutdrücke im Cortex aufweisen (Feld et al., 1977).

Fest steht, dass die Substitution von RNO6 und v. a. RNO8 zu einem signifikant höheren systolischen Blutdruck bei den konsomen Stämmen $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}\text{8}^{\text{SHR}}$ und $\text{MWF-8}^{\text{SHR}}$ führte. Für SHR konnten verschiedene QTL identifiziert werden, die Einfluss auf den Blutdruck nehmen. Sie liegen u. a. auf den Chromosomen 1, 2, 4, 8, 10, 13, 16, 19 und 20 (Křen et al., 1997; Křenová et al., 2000; Schork et al., 1995). Potentielle kausale Gene dieser QTL-Region auf RNO8 kodieren beispielsweise für das für glatte Muskelzellen spezifische Protein 22 (SM22) und den renalen epithelialen Kaliumkanal (Kcnj1) (Křen et al., 1997; Křenová et al., 2000). Beide Gene könnten über ihre Funktion im Rahmen der Kontraktion glatter Muskelzellen bzw. Elektrolythomöostase Einfluss auf die Blutdruckregulation nehmen. Endgültige Befunde stehen jedoch noch aus. Da der Blutdruck des Doppelkonsomen gegenüber $\text{MWF-8}^{\text{SHR}}$ noch einmal signifikant erhöht ist, lässt sich ein weiterer QTL auf RNO6 vermuten. Stimmig wäre dies zu dem Befund, dass bereits $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}$ einen im Vergleich zu MWF um etwa 6 mmHg erhöhten

systolischen Blutdruck aufwies (Schulz et al., 2007). In Kosegregationsanalysen zwischen MWF und SHR war jedoch kein SBD-QTL auf RNO6 detektiert worden (Schulz et al., 2003). Interessanterweise konnten jedoch Garrett et al. in Kosegregationsanalysen zwischen SHR und Dahl/SS einen Blutdruck-QTL unter Salzrestriktiver Kost auf RNO6 ($\text{LOD} > 2$) nachweisen (Garrett et al., 2003). Die Kopplungswahrscheinlichkeit lag hierbei allerdings unterhalb des Signifikanzniveaus und könnte neben Interaktionen mit dem Hintergrundgenom von MWF dafür verantwortlich sein, weshalb der SBD-QTL auf RNO6 in den Analysen zwischen MWF und SHR nicht reproduziert werden konnte, obwohl er möglicherweise für den SBD bei SHR von Relevanz ist. Interessanterweise zeigte sich eine nahezu additive Wirkung von RNO6 und RNO8 auf den SBD von $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}\text{8}^{\text{SHR}}$. Dieser ist im Vergleich zu MWF um 24 mmHg erhöht, bei $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}$ waren es 6, bei $\text{MWF-8}^{\text{SHR}}$ 16 mmHg.

Als Ausdruck der herabgesetzten Nierenfunktion weisen MWF- gegenüber den nierengesunden SHR-Männchen eine signifikant erhöhte Serumharnstoffkonzentration auf (Schulz et al., 2007). Ein Unterschied in der Kreatininkonzentration konnte hingegen zwischen den Parentalstämmen bisher nicht nachgewiesen werden (Schulz et al., 2003). Erstaunlicherweise war in der 24. Woche die Harnstoffkonzentration ebenfalls beim Doppelkonsomen gegenüber SHR erhöht. Den Goldstandard zur Beurteilung der Nierenfunktion und zum Monitoring chronisch Nierenkranker stellt die GFR dar. Um sich dieser in der klinischen Routine anzunähern wird das Kreatinin in Serum und Urin bestimmt und die Kreatininclearance berechnet. Die Kreatininkonzentrationen unterliegen jedoch bei der Ratte wie die des Menschen unterschiedlichen Einflüssen, wie Alter, Muskelmasse, Hydratation etc. (Nickolas et al., 2008). Zudem wird Kreatinin nicht vollständig glomerulär filtriert, sondern insbesondere bei Nierenfunktionseinschränkung tubulär sezerniert. Der Kreatininspiegel steigt daher erst bei einem fortgeschrittenen Nierenfunktionsverlust ($\text{GFR} < 50\%$) an. Die gegenüber allen Stämmen erhöhte Kreatininkonzentration bei $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}\text{8}^{\text{SHR}}$ in der 24. Woche ist aufgrund der Vielzahl an Confoundern mit Vorsicht zu bewerten. Dafür spricht eine deutliche Reduktion der Konzentration von der 24. zur 32. Woche, in der keine signifikanten Abweichungen mehr zu anderen Stämmen vorliegen.

Gegenüber Kreatinin hat sich daher in jüngster Zeit die Bestimmung von Cystatin C (CysC) im Serum als weniger störanfällig erwiesen. Insbesondere bei Kindern, unterernährten und alten Menschen hat sich die Abhängigkeit des Kreatininspiegels von

der Muskelmasse als nachteilig erwiesen. CysC ist ein niedermolekulares Protein von etwa 13 kDa. Als Inhibitor der Cystein Protease schützt es Bindegewebe vor der Degradation durch intrazelluläre Enzyme. Es wird von allen kernhaltigen Zellen in nahezu konstanter Stärke exprimiert und zählt zur Gruppe der Housekeepinggene. Aufgrund seiner Größe kann es vollständig glomerulär filtriert und anschließend tubulär reabsorbiert und katabolisiert werden (Filler et al., 2005; Salgado et al., 2010). Damit stellt CysC einen idealen endogenen Marker zur GFR-Bestimmung dar. Eine erhöhte Serumkonzentration könnte demzufolge eine beginnende Niereninsuffizienz mit höherer Sensitivität und Spezifität als die Kreatininkonzentration nachweisen (Dharnidharka et al., 2002). Mittlerweile konnten allerdings ebenfalls Einflussfaktoren auf CysC ermittelt werden. Es fanden sich bspw. höhere Serumspiegel bei Patienten mit DM, einer Leukozytose oder einer Hypalbuminämie. Das weibliche Geschlecht hingegen war mit geringeren Werten assoziiert (Stevens et al., 2009).

Da doppelkonsome Männchen eine gleich hohe Serumkonzentration an CysC aufwiesen wie MWF-Männchen, die signifikant höher war als bei SHR-Männchen, deutet dies darauf hin, dass diese nicht durch die U_{Alb} -QTL auf RNO6 und RNO8 beeinflusst wird, sondern von diesen unabhängig ist. Trotz Elimination der U_{Alb} bei $MWF6^{SHR}8^{SHR}$, bleibt die CysC-Konzentration auf gleichem Niveau wie bei MWF. Dies verhält sich stimmig zu den Befunden der Kreatininkonzentration, die ebenfalls unbeeinflusst blieb.

Der Parameter Gesamtcholesterin ist sowohl in der 24., als auch 32. Woche bei $MWF6^{SHR}8^{SHR}$ gegenüber MWF signifikant geringer. Analog zum nephrotischen Syndrom beim Menschen, ist eine Dyslipoproteinämie bei nephrotischen Ratten in der Literatur beschrieben worden (Calandra et al., 1983).

Bei Patienten mit IgA-Nephritis, als häufigste Form der Glomerulonephritis, welche gekennzeichnet ist durch mesangiale IgA-Ablagerungen, und Patienten mit adulter polyzystischer Nierenerkrankung konnte gezeigt werden, dass der Anstieg des Triglyzeridspiegels noch vor einer messbaren Reduktion der GFR auftritt (Fliser et al., 1998). Die Dyslipidämie stellt demnach eine integrale Komponente chronischer Nierenerkrankungen bereits in frühen Stadien dar (Tsimihodimos et al., 2008). Zurückzuführen sind diese Aberrationen u. a. auf einen veränderten Lipoproteinkatabolismus durch eine veränderte Expression und Aktivität verschiedener Enzyme und Rezeptoren. Beispielsweise zeigte sich eine Überexpression der HMG-

CoA-Reduktase bei proteinurischen Erkrankungen in Mensch und Tier (Vaziri et al., 2006). Als Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese führt dies zu einer Hypercholesterinämie. Im Versuch mit Toxin-induziertem sowie spontan nephrotischem Syndrom bei Ratten zeigte sich ebenfalls eine Hypercholesterinämie (Marsh et al., 1979; Tarugi et al., 1991). Diese Beobachtungen stimmen mit den erhobenen Daten bei MWF überein. Bei MWF trat eine signifikant höhere Cholesterin- und Triglyzerid-Konzentration bereits in der 24. Woche auf. Bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} waren alle drei Parameter gegenüber MWF signifikant reduziert.

Die Bedeutung dieser Veränderungen im Rahmen cNE liegt in der Assoziation mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko und einer beschleunigten Progression des Nierenschadens, wie beispielsweise der Glomerulosklerose (Vaziri, 2006). Erhöhte TG-Konzentrationen vergesellschaftet mit einem erhöhten VLDL (very low density lipoprotein)-Umsatz führen zur Akkumulation von IDL (intermediate density lipoprotein) Partikeln. Sowohl IDL als auch LDL weisen ein atherogenes und proinflammatorisches Potential auf (Vaziri, 2006). Sie stehen in Zusammenhang mit kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität bei niereninsuffizienten Patienten. Studien weisen daher auf einen Vorteil für cNI-Patienten durch eine konsequente Statin-Therapie hin, welche über eine HMG-CoA-Reduktase-Inhibition die Cholesterinsynthese hemmt (Tonelli et al., 2004; Tsimihodimos et al., 2008; Kaysen, 2009).

In den vergleichenden Untersuchungen der Organe fiel nicht nur in der 24., sondern auch in der 32. Woche ein bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} gegenüber MWF signifikant höheres Herzgewicht auf. Ein Unterschied zu SHR bestand hingegen nicht. Das linksventrikuläre Gewicht lag hierbei intermediär zwischen MWF und SHR und war signifikant niedriger als bei SHR-Tieren gleichen Alters. Diese Ergebnisse verhalten sich kongruent zu den ermittelten Blutdruckdifferenzen. Eine Zunahme v.a. des linksventrikulären Gewichts bei den doppelkonsomen und SHR-Männchen ist möglicherweise im Sinne einer kompensatorischen Hypertrophie des Herzmuskels im Rahmen eines arteriellen Bluthochdrucks zu interpretieren. Dabei ist die Hypertrophie bei den SHR-Tieren, mit den höchsten Blutdrücken am stärksten ausgeprägt.

Daneben können jedoch vom Blutdruck unabhängige Faktoren zu einem erhöhten Herzgewicht bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} führen. SHR-Ratten entwickeln eine ausgeprägte linksventrikuläre Hypertrophie, die bereits vor der Manifestation des arteriellen Hypertonus auftritt (Yamori et al., 1979). Eine genetische Prädisposition könnte daher in

die Entwicklung der kardialen Hypertrophie involviert sein. Kosegregationsanalysen zwischen der SHR- und der normotensiven WKY-Ratten konnten eine Heritabilität für das Herzgewicht von etwa 64% und für das linksventrikuläre Gewicht von 45% feststellen (Ye et al., 2003). In verschiedenen Kosegregationsstudien konnte die kardiale Hypertrophie bei SHR als ein polygenetisch beeinflusstes Merkmal identifiziert werden. Sie wird zum Teil durch blutdruckunabhängige QTL bedingt (Zhang et al., 1996; Tsujita et al., 2000; Inomata et al., 2005). Bisher wurden bei SHR auf RNO8 keine QTL identifiziert, die zu einem erhöhten Herzgewicht führen. Ein relevanter Locus auf diesem Chromosom im MWF-Hintergrund kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Eine mögliche Kopplung zum Herzgewicht für einen QTL auf RNO6 konnte hingegen bei SHRSP- in einer Kopplungsanalyse mit WKY-Ratten detektiert werden (Inomata et al., 2005). Zwar ist das Herzgewicht bei allen konsomen Stämmen gegenüber MWF erhöht, doch ist dieser Unterschied nur beim Doppelkonsomen signifikant. Gleiches gilt für das relative linksventrikuläre Gewicht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass genetische vom Blutdruck unabhängige Faktoren für das erhöhte ventrikuläre Gewicht bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} mitverantwortlich sind. Eine blutdruckassoziierte Hypertrophie wird jedoch ebenfalls von Bedeutung sein.

In der 24. Woche wurden als histologische Parameter des Nierenschadens der GSI, der TDI und die RIF lichtmikroskopisch bestimmt. Zum Untersuchungszeitpunkt zeigten sich alle Parameter bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} signifikant verbessert. Aufgrund der protektiven Allele auf den SHR-RNO6 und SHR-RNO8 konnte ein hochsignifikanter Rückgang des strukturellen Nierenschadens beim Doppelkonsomen erzielt werden. Ähnliche Auswirkungen wurden bei MWF-6^{SHR} beobachtet (Schulz et al., 2007). Die vergleichende Analyse der konsomen Stämme zeigte jedoch, dass der Doppelkonsome gegenüber MWF-6^{SHR} noch einmal eine reduzierte Glomerulosklerose aufwies ($p < 0,01$). Außerdem war die RIF nicht signifikant geringer. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der geminderten Albuminausscheidung gegenüber beiden einzelkonsomen Stämmen. Gegenüber MWF-8^{SHR}, welcher keine Abnahme des GSI und TDI zu MWF trotz deutlich reduzierter U_{Alb} zeigte (Schulz et al., 2008a), waren bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} alle drei histologischen Parameter signifikant gebessert. Dies deutet darauf hin, dass vor allem der Transfer von RNO6 einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung histologisch fassbarer Nierenschäden hat und stimmt mit der Detektion eines QTL für renale interstitielle Fibrose auf RNO6 in der Kosegregationsanalyse zwischen MWF und SHR

überein (Schulz et al., 2003). Keine Kopplung konnte jedoch für den GSI detektiert werden. Dies schließt jedoch einen relevanten Genloкус auf RNO6 nicht zwangsläufig aus, da in der Kopplungsanalyse genetische Faktoren mit einem geringen Effekt auf den Phänotyp statistisch nicht oder nur sehr schwer zu erfassen sind.

Da die Parameter bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} trotzdem gegenüber MWF-6^{SHR} deutlich gebessert und der GSI reduziert waren, könnte von zusätzlichen protektiven Allelen auf RNO8 ausgegangen werden. In der Kosegregationsanalyse zwischen SHR und MWF wurden allerdings keine QTL für den GSI detektiert (Schulz et al., 2003). Für einen relevanten QTL auf RNO8 spricht die Detektion eines QTL für renale Läsionen auf RNO8 bei Dahl/SS, welcher möglicherweise ebenfalls bei MWF vorhanden ist (Garrett et al., 2006). Viel wahrscheinlicher ist jedoch, dass die gebesserte Histomorphologie direkt in der U_{Alb} -Reduktion begründet liegt, da eine Proteinurie über die Induktion proinflammatorischer Cytokine und zytotoxischer Metabolite ebenfalls nephrotoxisch wirkt (Burton et al., 1996). Eine proteinurisch bedingte chronische Entzündung könnte somit mitverantwortlich für die sklerotischen Veränderungen bei MWF und den Einzelkonsomen sein.

Da der Doppelkonsome höhere systolische Blutdruckwerte als die Einzelkonsomen Stämme aufwies, ist die gebesserte Nierenmorphologie nicht auf den Blutdruck zurückzuführen.

Neben der spontanen U_{Alb} weist MWF als besonderes Merkmal oberflächliche Glomeruli im normalerweise glomerulifreien Cortex corticis auf. Beide Charakteristika zeigten eine positive Korrelation. Je oberflächlicher die Glomeruli, umso höher war die Proteinexkretion, v. a. von Albumin bei MWF-Ratten (Hackbarth et al., 1991).

Die gegenüber MWF-6^{SHR} noch einmal reduzierte Anzahl oberflächlicher Glomeruli beim Doppelkonsomen, einhergehend mit einer Abnahme der U_{Alb} sowie der verbesserten Histomorphologie, verhalten sich zu dem oben beschriebenen Befund stimmig. In den Kosegregationsanalysen der Arbeitsgruppe konnten auf RNO6 QTL für die Anzahl oberflächlicher Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt identifiziert werden. Weitere QTL für Glomeruli ohne Kapselkontakt fanden sich auf RNO2, RNO7 und RNO9, nicht jedoch auf RNO8. Desgleichen fand sich in der Kosegregationsstudie zwischen Lewis und MWF kein QTL für diesen Phänotyp auf RNO8 (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Kohärent zeigte sich bei MWF-6^{SHR} im Vergleich zu MWF eine Reduktion der Glomeruli

mit Kapselkontakt. Trotz QTL-Identifizierung war die Anzahl oberflächlicher Glomeruli ohne Kapselkontakt jedoch nicht reduziert (Schulz et al., 2007).

Unerwarteterweise war die Anzahl oberflächlichen Glomeruli ohne Kapselkontakt hingegen bei MWF-8^{SHR} und bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} gegenüber MWF reduziert. Möglicherweise basiert diese Abnahme auf Gen-Gen-Interaktionen zwischen QTL auf RNO6 und RNO8, wodurch der auf RNO6 identifizierte QTL nur in Abwesenheit des MWF-Chromosoms 8 zum Tragen kommt. Eine kausale Relevanz der insgesamt geringeren Anzahl beider Glomerulitypen beim doppelkonsomen Stamm für die gebesserte Nierenfunktion und -morphologie gegenüber den einzelkonsomen Stämmen ist wahrscheinlich.

Da MWF eine deutlich reduzierte Nephronenanzahl im Vergleich zu nierengesunden Lewis- und SHR- Ratten aufweist, wurde diese phänotypische Besonderheit als eine Ursache der erhöhten Albuminausscheidung bei MWF diskutiert (Rovira-Halbach et al., 1986; Fassi et al., 1998; Kreutz et al., 2000; Schulz et al., 2008a). Die Annahme basiert auf der Nephron-underdosing-Hypothese, welche davon ausgeht, dass eine reduzierte Nephronenanzahl mit einer kompensatorischen Hyperfiltration der einzelnen Glomeruli einhergeht, dadurch zum frühzeitigen Verschleiß führt und einen Risikofaktor für die essentielle Hypertonie, kardiovaskuläre Erkrankungen und progressive Nierenschäden darstellt. Renale Kompensationsmechanismen gegenüber äußeren Einflussfaktoren seien aufgrund des Nephrondefizits deutlich eingeschränkt (Hostetter et al., 1981).

Analysen der Glomerulianzahl mit Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Nyengaard von der University of Aarhus in Dänemark führten jedoch zu einem überraschenden Ergebnis. MWF-8^{SHR} wies mit $23770,7 \pm 1352$ Glomeruli/Niere eine mit MWF ($27027,9 \pm 1322$) vergleichbare Glomerulianzahl auf. Die U_{Alb} war jedoch bis zur achten Woche völlig aufgehoben und im Altersverlauf gegenüber MWF signifikant gemindert. Dieser Befund belegte, dass die U_{Alb} bei MWF nicht allein einer reduzierten Nephronenzahl geschuldet sein kann (Schulz et al., 2008a). Daten der Arbeitsgruppe für MWF-6^{SHR}8^{SHR} zeigen mit $32142,8 \pm 1545$ Glomeruli je Niere, dass der Doppelkonsome hinsichtlich der Nephronenanzahl intermediär zwischen MWF und SHR ($36979,2 \pm 2233$) liegt. Trotzdem weist MWF-6^{SHR}8^{SHR} die geringste Albuminausscheidung auf. Die Ergebnisse bestätigen den Befund der MWF-8^{SHR}-Studie. Ein bei der Zucht von MWF-Ratten selektiertes Defizit an Nephronen ist nicht ausschließlich Ursache der chronisch progressiven U_{Alb} bei MWF. MWF-6^{SHR} ($34591,4 \pm 2165$) wies eine mit SHR

vergleichbare Anzahl auf und lässt damit Gene für die reduzierte Nephronanzahl bei MWF auf RNO6 vermuten (Schulz et al., 2007).

Da MWF-8^{SHR} gegenüber SHR und MWF-6^{SHR} eine analog zu MWF deutlich reduzierte Nephronenzahl aufwies, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass diese entsprechend der Underdosing-Hypothese zur kompensatorischen Hyperfiltration der Nephrone und deren frühzeitigem Verschleiß führt und somit eine mit MWF vergleichbar ausgeprägte Glomerulosklerose und RIF begründet. Die mit MWF-6^{SHR} vergleichbare U_{Alb} -Reduktion bei MWF-8^{SHR} kann daher nur durch einen von der Nephronanzahl unabhängigen Mechanismus des U_{Alb} -QTL auf RNO8 bedingt sein (Schulz et al., 2008a). Die noch einmal reduzierte U_{Alb} von MWF-6^{SHR}8^{SHR} gegenüber MWF-6^{SHR} basiert auf diesem Nephronzahl-unabhängigen Effekt durch Allele auf RNO8.

Da MWF-6^{SHR}8^{SHR} zu beiden Messzeitpunkten ein gegenüber SHR geringeres und mit MWF vergleichbares Nierengewicht aufwies, ist ein Zusammenhang zwischen Nierengewicht und Nephronanzahl nahe liegend.

In einem weiteren Studienansatz sollten auf molekularer Ebene verschiedene Parameter des Nierenschadens überprüft werden. Hierfür wurden Gene untersucht, welche nachweislich bei einem relevanten Nierenschaden in ihrer Expression verändert sind. Die wichtigsten Kollagentypen der Niere sind Typ I und III, sowie Typ IV als eine Hauptkomponente der glomerulären Basalmembran (GBM). Wie wichtig die korrekte Expression und Synthese dieser Proteine für die regelrechte Nierenfunktion ist, zeigen diverse hereditäre Nierenerkrankungen, welche auf Mutationen der Kollagengene basieren, zu denen u. a. das Alport-Syndrom gehört (Mutationen von Kollagen IV-Subtypen).

Kollagen III ist ein Vertreter der fibrillären Kollagene und wird in der gesunden Niere vor allem interstitiell und tubulointerstitiell exprimiert. Hingegen stellen die Glomeruli, die GBM und das Mesangium normalerweise Kollagen III-freie Areale dar. Kommt es im Rahmen von Nierenerkrankungen zur Glomerulosklerose und tubulointerstitiellen Fibrose, führt dies zu einer Akkumulation extrazellulärer Matrixkomponenten. Die Ursachen liegen in einem gestörten Gleichgewicht eines komplexen Systems der Synthese und Degradation von Extrazellulärmatrix, welches durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen beeinflusst wird. Zu diesem quantitativen Phänomen gesellt sich ein qualitatives und führt zur Expression von anderen Kollagentypen. Kollagen III zeigte sich bei Patienten mit verschiedenen renalen Krankheitsentitäten in

diese pathologische Matrixexpansion involviert. Im Glomerulum und Mesangium wird bei verschiedenen Nierenerkrankungen Kollagen III exprimiert (Yoshioka et al., 1989; Nerlich et al., 1991). Eine renale interstitielle Fibrose, welche häufig mit glomerulären Schäden vergesellschaftet ist und mit der Abnahme der Nierenfunktion korreliert, ist mit einer Zunahme der Kollagen III-Expression verbunden (Müller et al., 1992). Sowohl reaktive Prozesse im Interstitium, als auch im Glomerulum gehen demnach mit einer vermehrten Expression des fibrillären Kollagentyps III einher.

Die Ergebnisse der Kollagen III-Expressionsanalyse bei 24 Wochen alten Ratten belegt auf molekularer Ebene eindrücklich die Beseitigung chronischer Nierenschäden bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} durch die Substitution von RNO6 und RNO8. Die Kollagen III-Expression konnte auf ein mit SHR vergleichbar geringes Niveau reduziert werden. Gegenüber den Einzelkonsomen ist der Reparaturmarker ebenfalls reduziert. Die stärksten protektiven Effekte scheinen wieder auf RNO6 zurückzuführen zu sein, da MWF-6^{SHR} ebenfalls eine signifikante Reduktion der Kollagen III-Expression aufwies, während dies für MWF-8^{SHR} nicht nachgewiesen werden konnte. Der nicht signifikante Minderung bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} gegenüber MWF-6^{SHR} könnten ursächliche Effekte durch die Interaktion von Genen auf RNO6 und RNO8 zugrunde liegen. Gleichzeitig wird jedoch analog zu den histologischen Parametern die reduzierte U_{Alb} die Expressionsminderung zur Folge haben.

Als molekularer Marker tubulärer Nierenschäden wurde zusätzlich die Expression von NGAL untersucht. Studien weisen daraufhin, dass NGAL nicht nur bei akuten Nierenschäden einen relevanten Marker darstellt, sondern ebenso bei chronisch proteinurischen Nierenerkrankungen ansteigt und mit dem Progress der Erkrankung korreliert (Bolignano et al., 2009). NGAL gehört zur Gruppe der Lipocaline und wirkt in der Niere als Aktivator der Nephrogenese. Im Rahmen akuter Tubuluszellschäden wird die NGAL-Expression induziert und kann bereits nach 1-2 Stunden als ein zuverlässiger Indikator für den stattgehabten Nierenschaden nachgewiesen werden (Mori et al., 2007). Darüber hinaus scheint bei chronischen Parenchymschäden im Zuge einer fokalsegmentalen Glomerulosklerose oder diabetischen Nephropathie die Hochregulation der Expression von NGAL mit einer Verschlechterung der Nierenfunktion zu korrelieren (Nickolas et al., 2008).

Die Ergebnisse der Analyse belegen auf molekularer Ebene eine signifikante Reduktion des tubulären Nierenschadens bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} im Vergleich zu MWF und MWF-8^{SHR}. Sie stehen mit den histologischen Befunden in Einklang und belegen die gegenüber

MWF deutlich gebesserte Nierenmorphologie. Neben der interstitiellen Fibrosierung konnten tubuläre Destruktionen durch den Austausch von RNO6 und RNO8 entscheidend supprimiert werden. Die stärksten Effekte konnten bei beiden Parametern für RNO6 nachgewiesen werden. Obwohl RNO8 die U_{Alb} deutlich reduzierte, zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der molekularen Nierenmarker NGAL und Kollagen III bei MWF-8^{SHR}. Die Ursache für das Fehlen einer Minderung bei MWF-8^{SHR} wurde in der deutlich geringeren Nephronanzahl, sowie eines höheren systolischen Blutdrucks vermutet (Schulz et al., 2008a). Die vorliegende Arbeit konnte hingegen feststellen, dass doppelkonsome männliche Ratten trotz eines mit SHR vergleichbaren Bluthochdrucks deutlich weniger glomeruläre und tubuläre Nierenschäden aufweisen. Somit scheint der Blutdruck für die U_{Alb} als auch für strukturelle Schäden bei MWF von untergeordneter Bedeutung zu sein. Bei einer mit MWF-6^{SHR} und SHR vergleichbaren Nephronanzahl konnte allerdings die Hypothese eines kausalen Zusammenhangs zwischen einer reduzierten Glomerulizahl und strukturellen Nierenschäden bekräftigt werden. Eine bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} gegenüber SHR signifikant erhöhte Expression von NGAL war hingegen nicht unbedingt zu erwarten, entspricht jedoch den histologischen Daten. Hier war der TDI doppelkonsomer Männchen mäßig gegenüber SHR-Männchen erhöht. Möglicherweise sind zusätzliche Gene für vorwiegend tubuläre Nierenschäden bei MWF verantwortlich, welche jedoch von der U_{Alb} unabhängig vererbt werden.

Ähnlich wie bei anderen Erkrankungen des Herzkreislauf- oder Immunsystems bestehen bei Nierenerkrankungen hinsichtlich der Inzidenz und Progression Unterschiede zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht. Diese werden als sexuelle Dimorphismen bezeichnet und konnten im Tierversuch und beim Menschen nachgewiesen werden.

Chronische Nierenerkrankungen, insbesondere nicht-diabetischer Genese, scheinen bei Männern schneller als bei Frauen fortzuschreiten (Neugarten, 2002; Eriksen et al., 2006; Silbiger et al., 2008). Eine Studie, welche ein besseres Outcome für Männer zeigte, verweist auf einen hohen Anteil postmenopausaler Probanden und kann somit nicht ausschließen, dass zumindest prämenopausale Frauen ein gegenüber Männern günstigeres Risikoprofil für Nierenerkrankungen aufweisen (Jafar et al., 2003).

Die Ursachen für sexuelle Dimorphismen sind komplex und noch nicht endgültig geklärt. Das Phänomen ist tierexperimentell für verschiedene Entitäten von Nierenpathologien

wie z. B. die polyzystische Nierenerkrankung und hypertensive Nephropathie beschrieben worden (Silbiger et al., 2008).

Bei der MWF-Ratte liegt ebenfalls ein sexueller Dimorphismus hinsichtlich der Nierenfunktion vor. Männchen entwickeln eine spontane progressive U_{Alb} , die im Vergleich zu MWF-Weibchen siebenfach höher ist. Eine signifikante Glomerulosklerose und tubuläre Schäden zeigten sich nur bei männlichen Ratten des Stamms (Kreutz et al. 2000; Schulz et al., 2008b; Remuzzi et al., 1988). Dabei ist die GFR des einzelnen Nephrons bei weiblichen Tieren signifikant niedriger als bei ihren männlichen Artgenossen (Remuzzi et al., 1988).

Im Vergleich zu SHR-Weibchen liegt bereits in der 8. Woche eine pathologische und signifikant höhere U_{Alb} bei MWF-Weibchen vor. Einen relevanten GSI und tubulointerstitielle Schäden entwickeln hingegen nur MWF-Männchen. Die Altersverlaufsstudien der konsomen Stämme weisen darauf hin, dass die milde U_{Alb} weiblicher MWF-Tiere durch dieselben genetischen Faktoren beeinflusst wird wie bei männlichen MWF-Ratten (Schulz et al., 2008b). Um diesen Sachverhalt zu prüfen, galt ein Schwerpunkt dieser Arbeit der vergleichenden Analyse männlicher und weiblicher MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Ratten. Untersucht wurden neben der U_{Alb} die histologischen Parameter GSI, RIF und TDI. Es zeigte sich, dass die doppelkonsomen Weibchen ab der 8. Woche signifikant niedrigere U_{Alb} -Werte aufwiesen, als MWF-Weibchen gleichen Alters. Bis zur 32. Woche lag die Ausscheidung im Normbereich unter 1 mg/24h. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich ab der 18. Woche gegenüber MWF-6^{SHR}- und MWF-8^{SHR}-Weibchen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die U_{Alb} -QTL auf RNO6 und RNO8, welche bei männlichen MWF-Ratten detektiert wurden, ebenfalls auf die U_{Alb} bei weiblichen Tieren Einfluss nehmen. Durch die Eliminierung der beiden QTL reduzierte sich die U_{Alb} bei weiblichen doppelkonsomen Tieren noch einmal im Vergleich zu den einzelkonsomen Weibchen. Ab der 48. Woche ist die U_{Alb} bei MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Weibchen ebenso gegenüber SHR-Weibchen signifikant reduziert. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der signifikanten Reduktion der U_{Alb} bei MWF-6^{SHR}-Weibchen im Vergleich zu MWF-Weibchen (Schulz et al., 2007).

Mittels kongener Rattenstämme von Garrett et al., hervorgegangen aus Dahl/SS-Ratten und dem Referenzstamm SHR, konnten ebenfalls gleiche U_{Alb} -QTL für männliche und weibliche Ratten nachgewiesen werden (Garrett et al., 2006).

Trotz niedriger U_{Aib} bleibt ein intersexueller Unterschied hinsichtlich des Nierenschadens ab der 18. Woche bei MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Ratten bestehen.

Bei insgesamt ausgesprochen geringen Nierenschäden bei MWF-6^{SHR}8^{SHR} finden sich histologisch keine intersexuellen Unterschiede. Gegenüber MWF-Weibchen sind die Indizes bei doppelkonsomen Weibchen niedriger, jedoch ebenfalls unterhalb des Signifikanzniveaus. Dies ist wahrscheinlich den bei beiden Stämmen geringen morphologischen Schäden geschuldet. Da kein intersexueller Unterschied in Bezug auf die Anzahl oberflächlicher Glomeruli festgestellt werden konnte, scheidet diese als Ursache für die U_{Aib} -Diskrepanz zwischen männlichen und weiblichen MWF-Ratten aus. Studien belegen, dass darüber hinaus die Gesamtnephronanzahl zwischen MWF-Männchen und -Weibchen gleich ist und somit keinen Kausalitätsfaktor darstellt (Fassi et al., 1998).

Die Gründe des sexuellen Dimorphismus hinsichtlich Prävalenz und Progression chronischer Nierenerkrankungen sind bisher in weiten Zügen unklar. Studiendaten legen nahe, dass wahrscheinlich vor allem nicht-genetische Faktoren wie die Sexualhormone Einfluss auf die Nierenfunktion nehmen (Maric et al., 2008; Neugarten, 2002). Sie wirken als steroidale Hormone auf die Transkription verschiedener Gene und beeinflussen so unter anderem die Aktivität von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, vasoaktiven Substanzen und Matrixproteinen. Besondere Bedeutung im Rahmen von renalen Schäden scheint ihnen durch ihre Wirkung auf das RAA- und Stickstoffmonoxid(NO)-System zuzukommen. Studien weisen daraufhin, dass Östrogen die Synthese des Vasorelaxanz NO induziert, u. a. durch die erhöhte Expression von eNO-Synthetase (eNOS) (McGuire et al., 2007; Silbiger et al., 2008; Maric et al., 2008). Gleichzeitig scheint Östrogen über verschiedene Mechanismen die Wirkung des RAAS zu antagonisieren, welche bekanntlich Anteil an der Progression von Nierenschäden haben (McGuire et al., 2007; Silbiger et al., 2008; Sullivan, 2008). Nach wie vor ist jedoch unklar, welche weiteren Faktoren Einfluss auf den als Gender-Effekt bezeichneten Dimorphismus haben. Darüber hinaus könnten genetische Einflüsse relevant sein.

Ober et al. schlagen mit ihrer Hypothese der „geschlechtsspezifischen genetischen Architektur“ eine Brücke zwischen genetischen und nicht-genetischen Faktoren (Ober et al., 2008). Ursache einer geschlechtsabhängigen Suszeptibilität für verschiedene

Erkrankungen sei Ausdruck einer differentiellen Genexpression bei Männern und Frauen. Diese seien u. a. auf sexualhormonregulierte Gene zurückzuführen, welche gewebespezifisch verschieden sind. Diese Regulationsmechanismen sind komplex und schließen womöglich tausende autosomale Gene ein (Ober et al., 2008).

Zusätzlich könnte das X-Mosaik bei Frauen renoprotektiv wirken. Männer sind für X-chromosomale Gene hemizygot und entwickeln daher bei Mutationen der etwa 1100 X-chromosomalen Gene relevante Phänotypen (Migeon, 2008). Als Erklärung für einen Dimorphismus bei MWF scheidet diese Hypothese jedoch aus, da die X-Chromosomen eines Inzuchtstamms identisch sind und somit keine Mosaik auftreten können.

Da in den Backcrossgenerationen der Kosegregationsanalysen das von MWF stammende Y-Chromosom nicht untersucht wurde, kann über Y-chromosomale U_{Alb} -QTL keine Aussage getroffen werden. Daher stellt sich die Frage, ob möglicherweise Gene auf RNOY bei MWF von Bedeutung sind. Aufgrund der vergleichsweise geringen Genzahl, der v. a. testesspezifischen Gene und X-chromosomal homologer Gene scheint dies jedoch weniger wahrscheinlich. Es wäre jedoch trotzdem denkbar, dass diese durch Interaktionen mit autosomalen Genen Einfluss nehmen.

Da das Verständnis geschlechtsspezifischer Unterschiede möglicherweise von therapeutischer Relevanz ist, sollten sie in jedem Modellorganismus untersucht werden. Der Einfluss von Sexualhormonen auf den sexuellen Dimorphismus bei MWF bedarf weiterer Untersuchungen, beispielsweise durch Orchiektomie- oder Estradiol-supplementationsstudien.

Um den Einfluss des Blutdrucks auf die intersexuellen Unterschiede der Nierenschäden zu prüfen, wurden die SBD vergleichend untersucht. Es zeigte sich, dass nur die Konsomen und SHR-Männchen einen signifikant höheren Blutdruck gegenüber den Weibchen des jeweiligen Stamms aufwiesen, nicht jedoch bei MWF (Schulz et al., 2007). Mit der Zucht der Konsomen scheint ein sexueller Dimorphismus für den SBD selektioniert worden zu sein. Die höchsten Blutdrücke bei den Weibchen der Konsomen Stämme weist MWF-6^{SHR}8^{SHR} auf. Sie waren vergleichbar mit denen von SHR-Weibchen. Der Blutdruck scheint folglich nicht ausschlaggebend für die Varianz der U_{Alb} zwischen männlichen und weiblichen MWF-Ratten zu sein und bestätigt, dass die U_{Alb} bei MWF blutdruckunabhängig ist (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003; Schulz et al., 2007). Es kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass geringfügige Blutdruckdifferenzen mitverantwortlich sind. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden,

dass Messungenauigkeiten, der nicht-invasiven Blutdruckmessung über Tailcuff, relevante Blutdruckunterschiede maskieren.

Bei MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Weibchen war die U_{Alb} jedoch am niedrigsten, obwohl diese mit SHR-Weibchen die höchsten Blutdrücke aufwiesen. Im Stammvergleich scheint damit der Blutdruck wiederum von untergeordneter Bedeutung zu sein und stimmt mit Analysen zwischen MWF- und MWF-6^{SHR}-Weibchen überein, welche vergleichbare Blutdrücke, aber signifikante U_{Alb} -Unterschiede aufwiesen (Schulz et al., 2008b).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass der für MWF beschriebene sexuelle Dimorphismus des Nierenschadens auch bei dem doppelkonsomen Stamm auftritt. Gleichzeitig ist die U_{Alb} bei MWF-6^{SHR}8^{SHR}-Weibchen gegenüber MWF-Weibchen reduziert und wird somit analog zu den MWF-Männchen von den QTL auf RNO8 und RNO6 beeinflusst.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten eindrucksvoll die Wirkung zweier QTL auf einen polygenetischen Phänotyp verdeutlichen. Über den Austausch von nur zwei der elf detektieren U_{Alb} -QTL bei MWF durch die Zucht eines doppelkonsomen Stamms konnte die U_{Alb} vollständig eliminiert werden. Darüber hinaus ist die U_{Alb} im Vergleich zu den einzelkonsomen Stämmen MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} reduziert. Dies belegt die supplementäre Wirkung der beiden U_{Alb} -QTL. Überraschend ist zudem, dass im weiteren Altersverlauf jenseits der 32. Woche gegenüber SHR eine signifikant reduzierte Albuminausscheidung auftrat. Wie andere multifaktoriellen Merkmale wird die U_{Alb} durch die komplexe Interaktion verschiedener kausaler Gene beeinflusst. Dabei wird zwischen einfachen additiven und epistatischen Effekten unterschieden. Anders als bei der additiven Genwirkung, können bei der Epistasis QTL die Wirkung eines weiteren QTL entweder maskieren oder aber eine über die einfache Summation hinausgehende Wirkung erzielen. Diese vielfältigen Gen-Gen-Interaktionen erschweren die Detektion relevanter Kandidatengene (Frankel, Schork, 1996). Da sich die Untersuchung dieser Effekte besonders schwierig gestaltet, stehen bisher verhältnismäßig wenige Erkenntnisse im Rahmen renaler Erkrankungen zur Verfügung.

Mehrfach kongene und konsome Stämme stellen eine etablierte Methode der Geninteraktionsanalyse dar. Daten mehrerer doppel- und dreifach kongener Rattenstämme wurden bereits publiziert, u. a. zu cNE (Van Dijk et al., 2005; Van Dijk et al., 2006a; Van Dijk et al., 2006b; Monti et al., 2003; Rapp, Garrett, Deng, 1998; Seda et al., 2002; Seda et al., 2006; Strahorn et al., 2005). Die Introgression zweier SBD-QTL

von SHR auf RNO1 und RNO10 bewirkten im WKY-Hintergrund eine Erhöhung des systolischen Blutdrucks um 5,2 mmHg, zusätzlich zum additiven Effekt der einzelnen QTL (Monti et al., 2003). Ein epistatischer Effekt zeigte sich ferner bei einer 65 cM-Region auf RNO2 und RNOY bei SHRSP im WKY-Hintergrund auf die Glucose-Toleranz des doppelkongenen Stamms (Strahorn et al., 2005). Komplizierter scheint die Wirkung zweier SBD-QTL auf RNO2 von SHR, welche zusammen einen metabolischen Effekt im Sinne einer reduzierten Glukose-Toleranz bewirken (Seda et al., 2006). Rapp et al. erzielten, basierend auf einem interaktiven Effekt, durch die Substitution zweier Blutdruck-QTL auf RNO2 und RNO10 von Dahl-Ratten eine Reduktion sowohl des SBD als auch des Herzgewichts (Rapp, Garrett, Deng, 1998).

Im Unterschied zu MWF-6^{SHR}8^{SHR} handelt es sich bei den genannten Studien um mehrfach kongene Stämme. Beispiele für weitere doppelkonsome Stämme sind in der Literatur bisher nur für Mausmodelle beschrieben. Der Stamm B.A-6,11 diente der Untersuchung des akuten Lungenversagens. Die Wirkung der Introgression zweier Suszeptibilitäts-QTL in das Hintergrundgenom eines resistenten Referenzstamms wurde anhand der mittleren Überlebenszeit nach Ozonexposition ermittelt. Die Substitution eines Suszeptibilitäts-QTL-tragenden Chromosoms führte zu einer signifikanten Verkürzung der Überlebenszeit. Entgegen den Ergebnissen der Kopplungsanalyse, war dieser Effekt beim doppelkonsomen Stamm, also bei zwei Suszeptibilitäts-QTL tragenden Chromosomen im Referenzgenom, aufgehoben. Dies weist auf einen komplizierten interaktiven Effekt zwischen beiden QTL und oder deren Interaktion mit dem Hintergrundgenom hin (Prows et al., 2008). Ergebnisse einer Studie des doppelkonsomen Stamms C3H-11^{NSY}14^{NSY} deuten auf eine Interaktion zwischen zwei Suszeptibilitäts-QTL für DM Typ II im Mausmodell hin. Neben einer Hyperglykämie und Insulinresistenz entwickelten nur doppelkonsome Tiere eine Adipositas (Babaya et al., 2010). Insgesamt liegt bei allen genannten Beispielen ein epistatischer Effekt vor, welcher u. a. weitere phänotypische Merkmale tangiert.

Die Analyse von MWF-6^{SHR}8^{SHR} deutet auf einen epistatischen Effekt der U_{Alb}-QTL bei der MWF-Ratte hin, welcher weit über eine additive Wirkung hinausgeht. Diese Feststellung bedarf jedoch einer gezielten Prüfung. Ebenfalls unklar bleibt der Mechanismus der Interaktion. So wäre es möglich, dass beide QTL kausale Gene tragen, welche über einen gemeinsamen oder eventuell unabhängigen Pathway miteinander interagieren. Ebenso könnten Gene eines QTL regulatorischen Einfluss auf Gene eines zweiten nehmen. Die Zucht doppelkongener Stämme könnte einen

differenzierteren Einblick in den komplexen Wirkmechanismus der U_{Alb} -QTL bei MWF geben. Aufgrund von Zuchtdauer und -aufwand ist dies jedoch häufig nicht praktikabel.

Neben MWF finden vor allem die Inzuchtrattenstämme Fawn Hooded Hypertensive (FHH)-, Dahl/SS-, Buffalo (BUF)- und Spontaneously Hypertensive Stroke Prone (SHRSP) in der Untersuchung genetischer Suszeptibilitätsfaktoren renaler Erkrankungen Anwendung. Als nierenresistente Referenzstämme dienen neben SHR u. a. die Lewis-, Wistar Kyoto (WKY)- und Brown Norway (BN)-Ratte. In Kosegregations- und Kopplungsanalysen konnten zahlreiche QTL identifiziert werden, welche die Entwicklung renaler Schäden beeinflussen. Einige davon häufen sich, z. B. auf RNO1-3, RNO6, RNO8-11 und RNO17 und überlappen sich zum Teil. Auffällig ist, dass allein sieben von 37 U_{Alb} -QTL in verschiedenen Studien auf RNO6 und vier weitere auf RNO8 detektiert werden konnten (rat genome database, <http://rgd.mcw.edu/> 2009). Insgesamt belegen Studien die Komplexität der Suszeptibilitätsfaktoren von Nierenschäden, weisen aber darauf hin, dass einigen chromosomalen Regionen eine besondere Bedeutung zukommt. Die Detektion verschiedener QTL in unterschiedlichen Rattenmodellen deutet darauf hin, dass z. T. Gene stammspezifisch Einfluss nehmen (Van Dijk, 2005). Die Identifizierung relevanter QTL für Nierenpathologien auf RNO6 und RNO8 in Untersuchungen von Dahl-Ratten (Poyan Mehr et al., 2003; Garrett et al., 2003; Siegel et al., 2004) bestätigen relevante Loci auf diesen Chromosomen für andere Rattenstämme. Bei der salzsensitiven Dahl-Ratte konnte die Relevanz der QTL auf RNO6 und RNO8 anhand konsomer Stämme verifiziert werden (Mattson et al., 2008). Bisher wurden jedoch keine Kandidatengene innerhalb der QTL-Regionen identifiziert.

Nicht nur vor dem Hintergrund einer möglichen Stammspezifität einiger QTL stellt sich die Frage, ob die bei der Ratte detektierten QTL für den Menschen von Relevanz sind. Über vergleichende Genomanalysen können syntäne Genregionen bei anderen Spezies ermittelt werden. Für den QTL auf RNO6 befindet sich diese Region bei der Maus auf Chromosom (Mmu)12, für den QTL auf RNO8 auf Mmu9. Doorenbos et al. identifizierten in der albuminurischen A/J-Maus unter anderem einen U_{Alb} -QTL auf Mmu9, welcher konkordant zum QTL auf RNO8 ist. Insgesamt detektierten sie fünf U_{Alb} -Loci, vier davon zeigten Konkordanz zu QTL für Nierenschäden bei der Ratte, zwei von ihnen zu QTL beim Menschen, welche in Zusammenhang mit Nierenerkrankungen stehen (Doorenbos et al., 2008).

Die homologen Genregionen beim Menschen liegen für den detektierten RNO6-QTL auf Chromosom 14q23.1-14q31.3 und für RNO8 auf 15q22-15q25.

In der syntänen Genregion 14q24.2 konnte eine Kopplung zum steroidresistenten nephrotischen Syndrom mit assoziierter Taubheit bei einer konsanguinen palästinensischen Familie detektiert werden (Ruf et al., 2003). Im Rahmen der FIND-Studie zu Suszeptibilitätsfaktoren der diabetischen Nephropathie fand sich eine Kopplung zu 14q23.1, welche ungefähr dem Randbereich der homologen Genregion des QTL auf RNO6 entspricht (Iyengar et al., 2007). Ein QTL für U_{Aib} bei DM auf 15q26.3 liegt knapp außerhalb des QTL auf RNO8 (Iyengar et al., 2007). Ein QTL für das quantitative Merkmal GFR konnte auf 15q22.3 bei indianischen Familien ermittelt werden (Schelling et al., 2008). Gestützt wird der Befund durch GFR-QTL auf Chromosom 14 und 15 in einer amerikanischen Studie (Leon et al., 2007).

Andererseits zeigen mindestens ebenso viele humangenetische Studien zur U_{Aib} keine Konkordanz zu den bei MWF identifizierten U_{Aib} -QTL. Dies schließt jedoch die Relevanz dieser Loci für den Menschen keinesfalls aus. Wie bereits eingangs erläutert, birgt die QTL-Detektion in humangenetischen Studien besondere Schwierigkeiten (Polygenie, Epistasis, Heterogenität etc.). Hinzu kommt, dass relevante Loci z. T. für verschiedene Bevölkerungsgruppen spezifisch sind (Leon et al., 2007). Diese Feststellung deckt sich mit tierexperimentellen Daten (Schulz et al., 2003; Packard et al., 2009). Darüber hinaus beeinflussen äußere Einflussfaktoren wie beispielsweise eine Salzdiät im Tierversuch die Reproduzierbarkeit detektierter U_{Aib} -QTL. Es können somit salzsensitive und –insensitive Phänotypen unterschieden werden (Garrett et al., 2006). Um die Relevanz der bei MWF detektierten QTL auf RNO6 und RNO8 beurteilen zu können, erfordert es daher weiterer Untersuchungen.

Erfolgreiche Beispiele, welche die Relevanz von Ratten-QTL für Nierenerkrankungen beim Menschen belegen, wurden bereits publiziert. So konnte das Gen Rab38, detektiert im QTL Rf-2 (Renal failure), als kausales Gen für eine U_{Aib} und Proteinurie bei der FHH-Ratte identifiziert werden (Rangel-Filho et al., 2005). Die homologe Region beim Menschen auf Chromosom 11 wurde 1999 als relevant im Rahmen von Proteinurie und einer fokalsegmentalen Glomerulosklerose beim Menschen beschrieben (Winn et al., 1999). Bestätigt wird die evolutionär bedingte Konkordanz von komplex genetischen Erkrankungen bei Mensch und Ratte u. a. durch die Identifizierung eines Polymorphismus des Fcgr-3 Gens, kodierend für einen Fc-Rezeptortyp des IgG, welcher

assoziiert ist mit einer immunologisch getriggerten GN bei WKY-Ratten, als auch mit einer GN beim Systemischen Lupus Erythematoses beim Menschen (Aitman et al., 2006).

Garrett et al. identifizierten einen U_{Aib} -QTL auf RNO2 bei der Dahl/SS-Ratte, welcher einen kongruenten Lokus für Nierenschäden auf dem humanen Chromosom (HSA)1q21 zeigt (Garrett et al., 2007).

Aufgrund der Fülle möglicher Kandidatengene innerhalb der QTL-Region auf RNO6 und RNO8 bei MWF, ist es nicht möglich, alle auf ihre Relevanz zu prüfen. Potentiell von Bedeutung ist bspw. ein Polymorphismus im Kinin B1-Rezeptor-Gen, der signifikant seltener bei Familien mit terminaler Niereninsuffizienz auftritt und wahrscheinlich über Polymorphismus-induzierte Überexpression nephroprotektiv wirkt (Bachvarov et al., 1998). Das B1R-Gen ist bei der Ratte auf Chromosom 6q32 lokalisiert. Liegt jedoch außerhalb des detektierten QTL-Intervalls bei MWF.

Innerhalb des QTL-Bereichs (6q32) konnte hingegen das Dicer-Gen detektiert werden. Dicer ist ein Enzym, welches miRNA generiert, die wiederum einen wichtigen Regulator der Genexpression darstellt. Die Podozyten-spezifische Deletion von Dicer führte bei einem mutanten Mausstamm zur GS und Proteinurie 4-5 Wochen postpartum und zeigte multiple renale Veränderungen wie den Verlust der Podozytenfußfortsätze, eine Podozytenapoptose und Destruktionen der glomerulären Basalmembran (Shi et al., 2008).

Ein SNP (single nucleotide polymorphism) des MTHFS-Gens in einer genomweiten Assoziationsstudie der Framingheartstudie zeigte eine signifikante Kopplung mit einer cNI bei Atherosklerosepatienten und gilt als mögliches Kandidatengen für Nierenerkrankungen. Das Gen befindet sich auf HSA15q25.1 (bei Ratte RNO8q31) und damit am Rand des Konkordanzintervalls des U_{Aib} -QTL auf RNO8. Das Gen kodiert für die Methenyltetrahydrofolat Synthetase, welche in der Niere exprimiert wird und auf den Folsäuremetabolismus Einfluss nimmt (Kottgen et al., 2008).

Es ist jedoch durchaus denkbar, dass bisher unbekannte Gene, bzw. bisher nicht im Rahmen von Nierenerkrankungen in Erscheinung getretene Gene den beiden U_{Aib} -QTL bei MWF zugrunde liegen. Daher ist eine Reduktion der Kandidatengenregion z. B. über die Zucht kongener Stämme erforderlich. Darauf aufbauend könnten anhand von Sequenz- oder SNP-Analysen, sowie differentieller Genexpressionsstudien möglicherweise relevante Kandidatengene ermittelt werden. Die Identifizierung der

zugrunde liegenden Gene birgt einen vielversprechenden Ansatz, das Verständnis über die U_{Alb} , welche nicht nur durch eine cNI und eine renale Ersatztherapie im Endstadium, sondern vor allem durch ihre hohe Komorbidität mit kardiovaskulären Erkrankungen in der Allgemeinbevölkerung von entscheidender Bedeutung für das weltweite Gesundheitssystem ist.

In einem weiteren Schritt gilt es diese Gene auf ihre Relevanz beim Menschen zu prüfen. Langfristig birgt dies individuelle Therapieoptionen betroffener Patienten und bildet einen Baustein in der Bewältigung der zunehmenden Herausforderung cNE für das weltweite Gesundheitssystem. Neben therapeutischen Optionen können Risikogruppen schneller identifiziert und einer intensivierten Betreuung zugeführt werden. Die Detektion von Kandidatengenomen birgt darüber hinaus die Möglichkeit, das Verständnis für pathogenetische Prozesse im Rahmen von Nierenerkrankungen zu erweitern und so unser Gesamtverständnis über die Funktion und Struktur des komplexen Organs Niere zu erweitern.

5. Zusammenfassung

Chronische Nierenerkrankungen (cNE) stellen aufgrund ihrer steigenden Prävalenz eine zunehmende Herausforderung für unser Gesundheitssystem dar. Ihre Genese ist vielschichtig. Insbesondere ein Diabetes mellitus und arterieller Bluthochdruck sind mit einer erhöhten cNE-Rate assoziiert. Zahlreiche Studien belegen zudem den Einfluss genetischer Suszeptibilitätsfaktoren. Die Ausscheidung einer pathologisch erhöhten Albuminkonzentration im Harn hat sich als wichtiger prognostischer Marker für cNE erwiesen. Gleichzeitig konnte eine Assoziation der Albuminurie (U_{Alb}) mit kardio- und cerebrovaskulären Erkrankungen, sowie der Gesamtmortalität und zwar auch unabhängig von zusätzlichen Risikofaktoren in der Allgemeinbevölkerung nachgewiesen werden. Dies bekräftigt die wissenschaftliche Relevanz des komplex vererbten Merkmals U_{Alb} . Die Identifizierung der genetischen Grundlagen der U_{Alb} birgt neue Erkenntnisse über den Pathomechanismus chronischer Nierenerkrankungen.

Der Inzuchtrattenstamm MWF weist einen milden Hypertonus und eine progressive U_{Alb} auf. Wie beim Menschen wird die U_{Alb} bei ihm komplex genetisch beeinflusst. Daher stellt die MWF-Ratte für genetische Untersuchungen einen vielversprechenden Modellorganismus dar, zu dem die hypertensive aber nierengesunde SHR-Ratte einen geeigneten Kontraststamm darstellt. Ab der 8. Lebenswoche tritt bei MWF eine

pathologische U_{Alb} auf $(18,1 \pm 1,9 \text{ mg}/24\text{h})$, die ab der 18. Woche nephrotische Grenzwerte überschreitet. In Kosegregations- und Kopplungsanalysen zwischen MWF und SHR haben sich insbesondere die QTL auf RNO6 und RNO8 für die U_{Alb} , strukturelle Nierenschädigung und Glomerulanzahl bei MWF von Bedeutung erwiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung beider QTL sowie deren Interaktionen anhand des doppelkonsomen Stamms $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}\text{8}^{\text{SHR}}$ untersucht. Dieser weist RNO6 und RNO8 des nierengesunden SHR-Stamms im MWF-Genom auf und wurde im Altersverlauf von 4 bis 52 Wochen phänotypisch hinsichtlich der U_{Alb} , Nierenhistologie, des SBD und molekularer Marker charakterisiert. Die Ergebnisse wurden mit den Parentalstämmen MWF und SHR, sowie mit den einzelkonsomen Stämmen $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}$ und $\text{MWF-8}^{\text{SHR}}$ verglichen.

Erstaunlicher Weise konnte die U_{Alb} nicht nur ab der 8. Woche im Vergleich zu MWF und $\text{MWF-8}^{\text{SHR}}$ und ab der 12. Woche zu $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}$ signifikant reduziert werden ($p < 0,0001$). Die U_{Alb} zeigte sich langfristig und vollständig eliminiert und war ab der 14. Woche zusätzlich signifikant geringer als bei SHR-Ratten ($1,9 \pm 0,3$ vs. $0,6 \pm 0,04 \text{ mg}/24\text{h}$, $p < 0,0001$). Diese Befunde sind umso interessanter, da $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}\text{8}^{\text{SHR}}$ -Ratten der 24. Woche einen mit SHR vergleichbaren und zu MWF signifikant höheren SBD aufwiesen ($169,1 \pm 1,7$ vs. $175,3 \pm 2,8$ vs. $145,1 \pm 1,1 \text{ mmHg}$). Dies belegt eindrücklich die Blutdruckunabhängigkeit der U_{Alb} bei MWF. Gleichzeitig trat eine Reduktion histologischer Schädigungsmarker (GSI, TDI, RIF) im Vergleich zu MWF auf. Zudem konnten diese Parameter zu $\text{MWF-8}^{\text{SHR}}$ deutlich verbessert werden ($p < 0,007$) und auch im Vergleich zu $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}$ waren glomeruläre Nierenschäden signifikant gemindert ($p < 0,004$), obwohl beide Einzelkonsomen bereits eine zu MWF signifikante U_{Alb} -Reduktion zeigten. Die verbesserte Nierenmorphologie spiegelte sich zudem in der Expression von Kollagen III und NGAL wider. Sowohl Kollagen III-, ein Marker der renalen Fibrose, als auch NGAL-mRNA, v. a. ein Marker tubulärer Nierenschäden, wurden auf signifikant niedrigerem Niveau exprimiert als bei MWF und $\text{MWF-8}^{\text{SHR}}$ ($p < 0,03$). Darüber hinaus konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen der U_{Alb} und Nierenmorphologie bei MWF zur Anzahl oberflächlicher Glomeruli aufgezeigt werden. Diese liegen subkapsulär und sind für die MWF-Ratte spezifisch. Die Anzahl subkapsulärer Glomeruli konnte bei $\text{MWF-6}^{\text{SHR}}\text{8}^{\text{SHR}}$ im Vergleich zu MWF und zu den Einzelkonsomen signifikant verringert werden ($p < 0,0001$).

Der Vergleich von männlichen und weiblichen Tieren des doppelkonsomen Stamms konnte belegen, dass weiterhin ein sexueller Dimorphismus hinsichtlich der U_{Alb} auf

niedrigerem Niveau bestehen bleibt und die bei MWF-Weibchen milderen Nierenschäden durch die gleichen QTL auf RNO6 und RNO8 wie bei MWF-Männchen beeinflusst werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine komplexe Interaktion zwischen den auf RNO6 und RNO8 detektierten QTL hin, die eine Reduktion der U_{Alb} im Vergleich zu MWF als auch SHR-Ratten bewirkt. Diese führten zu einer vollständigen Eliminierung des albuminurischen Phänotyps bis ins hohe Alter (52 Wochen) trotz Persistenz weiterer U_{Alb} -QTL im MWF-Genom. Die Identifizierung der zugrunde liegenden Gene birgt neue Erkenntnisse über die Mechanismen der komplex regulierten Plasmafiltration in der Niere und damit der Pathogenese von cNE beim Menschen. Dies eröffnet individualisierte therapeutische oder präventiv-therapeutische Möglichkeiten für die Humanmedizin.

6. Abkürzungen

| | |
|--------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| μ | Mikro |
| Abb. | Abbildung |
| ACE | Angiotensin Converting Enzyme, Angiotensin-konvertierendes Enzym |
| Aqua bidest. | Aqua bidestillata |
| C | Cytidin |
| c | Zenti |
| ca. | circa |
| CBF | Campus Benjamin Franklin |
| cDNA | komplementäre DNA |
| cM | centi Morgan |
| cNE | Chronische Nierenerkrankung |
| cNI | Chronische Niereninsuffizienz |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| DEPC | Diethyldicarbonat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxynukleosidtriphosphate |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | Enzyme linked immunosorbent assay |
| et al. | et alia |
| Fc | fragment crystalline, nicht antigenbindendes Molekülende eines Antikörpers |
| FU/Fub | Freie Universität Berlin |
| g | Gramm |
| G | Guanosin |
| GFR | glomeruläre Filtrationsrate |
| GSI | Glomeruloskleroseindex |
| h | Stunde |
| IgG | Immunglobulin G |
| kg | Kilogramm |
| l | Liter |

| | |
|-------------------|---|
| LOD | logarithm of the odds, Wahrscheinlichkeit Genkopplung |
| m | Milli |
| M | Mol; molar |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| min | Minute |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule |
| mmol | Millimol |
| mRNA | messenger RNA |
| n | Anzahl |
| p | p-Wert |
| pAVK | periphere arterielle Verschlusskrankheiten |
| pH | pH-Wert |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| sec | Sekunde |
| Tab. | Tabelle |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| U | Unit(s), Einheit(en) |
| u. a. | unter anderem/n |
| UKBF | Universitätsklinikum Benjamin Franklin |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| v. a. | vor allem |
| vs. | versus |
| Ztm | Zentrales Tierlaboratorium Medizinische Hochschule Hannover |

7. Literaturverzeichnis

- Agewall S, Wikstrand J, Ljungman S, Fagerberg B. Usefulness of microalbuminuria in predicting cardiovascular mortality in treated hypertensive men with and without diabetes mellitus. Risk Factor Intervention Study Group. *Am J Cardiol* 1997;80:164-9.
- Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ et al. Copy number polymorphism in *Fcgr3* predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature* 2006;439:851-5.
- Arar N, Nath S, Thameem F et al. Genome-wide scans for microalbuminuria in Mexican Americans: the San Antonio Family Heart Study. *Genet Med* 2007;9:80-7.
- Arnlöv J, Evans JC, Meigs JB et al. Low-grade albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2005;112:969-75.
- Atkins RC. The epidemiology of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2005:14-8.
- Babaya N, Fujisawa T, Nojima K et al. Direct evidence for susceptibility genes for type 2 diabetes on mouse chromosomes 11 and 14. *Diabetologia* 2010;53:1362-71.
- Bachvarov DR, Landry M, Pelletier I et al. Characterization of two polymorphic sites in the human kinin B1 receptor gene: altered frequency of an allele in patients with a history of end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:598-604.
- Bakoush O, Tencer J, Torffvit O, Tenstad O, Skogvall I, Rippe B. Increased glomerular albumin permeability in old spontaneously hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1724-31.
- Barker DF, Hostikka SL, Zhou J et al. Identification of mutations in the *COL4A5* collagen gene in Alport syndrome. *Science* 1990;248:1224-7.
- Bigazzi R, Bianchi S, Baldari D, Campese VM. Microalbuminuria predicts cardiovascular events and renal insufficiency in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 1998;16:1325-33.
- Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:337-44.
- Bowden DW, Colicigno CJ, Langefeld CD et al. A genome scan for diabetic nephropathy in African Americans. *Kidney Int* 2004;66:1517-26.
- Broeckel U, Shiozawa M, Kissebah AH, Provoost AP, Jacob HJ. Susceptibility genes for end-organ damage. New strategies to understand diabetic and hypertensive nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:840-2.
- Brown DM, Provoost AP, Daly MJ, Lander ES, Jacob HJ. Renal disease susceptibility and hypertension are under independent genetic control in the fawn-hooded rat. *Nat Genet* 1996;12:44-51.
- Burton C, Harris KP. The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1996;27:765-75.
- Calandra S, Tarugi P, Ghisellini M, Gherardi E. Plasma and urine lipoproteins during the development of nephrotic syndrome induced in the rat by adriamycin. *Exp Mol Pathol* 1983;39:282-99.
- Coresh J, Selvin E, Stevens LA et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 2007;298:2038-47.
- Cowley AW Jr, Roman RJ, Jacob HJ. Application of chromosomal substitution techniques in gene-function discovery. *J Physiol* 2004;554:46-55.
- de Jong PE, van der Velde M, Gansevoort RT, Zoccali C. Screening for chronic kidney disease: where does Europe go? *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:616-23.

- Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A. Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis. *Diabetologia* 1989;32:219-26.
- Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL® -Deutsche Hypertonie Gesellschaft. Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie. Stand Juni 2008; <http://leitlinien.net/046-001.pdf>.
- Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2002;40:221-6.
- Doorenbos C, Tsaih SW, Sheehan S et al. Quantitative trait loci for urinary albumin in crosses between C57BL/6J and A/J inbred mice in the presence and absence of Apoe. *Genetics* 2008;179:693-9.
- Eriksen BO, Ingebretsen OC. The progression of chronic kidney disease: a 10-year population-based study of the effects of gender and age. *Kidney Int* 2006;69:375-82.
- Fassi A, Sangalli F, Maffi R et al. Progressive glomerular injury in the MWF rat is predicted by inborn nephron deficit. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(8):1399-406.
- Feld LG, Van Liew JB, Galaske RG, Boylan JW. Selectivity of renal injury and proteinuria in the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int* 1977;12:332-43.
- Filler G, Bökenkamp A, Hofmann W, Le Bricon T, Martínez-Brú C, Grubb A. Cystatin C as a marker of GFR--history, indications, and future research. *Clin Biochem* 2005;38:1-8.
- Fink L, Stahl U, Ermert L, Kummer W, Seeger W, Bohle RM. Rat porphobilinogen deaminase gene: a pseudogene-free internal standard for laser-assisted cell picking. *Biotechniques* 1999;26:510-6.
- Fliser D, Pacini G, Engelleiter R et al. Insulin resistance and hyperinsulinemia are already present in patients with incipient renal disease. *Kidney Int* 1998;53:1343-7.
- Fogarty DG, Hanna LS, Wantman M, Warram JH, Krolewski AS, Rich SS. Segregation analysis of urinary albumin excretion in families with type 2 diabetes. *Diabetes* 2000a;49:1057-63. a
- Fogarty DG, Rich SS, Hanna L, Warram JH, Krolewski AS. Urinary albumin excretion in families with type 2 diabetes is heritable and genetically correlated to blood pressure. *Kidney Int* 2000b;57:250-7. b
- Fox CS, Yang Q, Guo CY et al. Genome-wide linkage analysis to urinary microalbuminuria in a community-based sample: the Framingham Heart Study. *Kidney Int* 2005 Jan;67:70-4.
- Frankel WN, Schork NJ. Who's afraid of epistasis? *Nat Genet* 1996;14:371-3.
- Freedman BI, Beck SR, Rich SS et al. A genome-wide scan for urinary albumin excretion in hypertensive families. *Hypertension* 2003;42(3):291-6.
- Garrett MR, Dene H, Rapp JP. Time-Course Genetic Analysis of Albuminuria in Dahl Salt-Sensitive Rats on Low-Salt Diet. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1175-1187.
- Garrett MR, Gunning WT, Radecki T, Richard A. Dissection of a genetic locus influencing renal function in the rat and its concordance with kidney disease loci on human chromosome 1q21. *Physiol Genomics* 2007;30:322-34.
- Garrett MR, Joe B, Yerga-Woolwine S. Genetic linkage of urinary albumin excretion in Dahl salt-sensitive rats: influence of dietary salt and confirmation using congenic strains. *Physiol Genomics* 2006;25:39-49.
- Gerstein HC, Mann JF, Yi Q et al. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA* 2001;286:421-6.

- Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 2004;428:493-521.
- Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ. Finding genes that underlie complex traits. *Science* 2002;298:2345-9.
- Hackbarth H, Büttner D, Jarck D, Pothmann M, Messow C, Gärtner K. Distribution of glomeruli in the renal cortex of Munich Wistar Frömter (MWF) rats. *Ren Physiol* 1983;6:63-71.
- Hackbarth H, Gwinner W, Alt JM, Hagemann I, Thiemann A, Finke B. The Munich Wistar Frömter rat: proteinuria and blood pressure in correlation to the number of superficial glomeruli. *Ren Physiol Biochem* 1991;14(6):246-52.
- Hedrich H. History, strains and models. In: Krinke GJ, ed. *The laboratory rat*. Academic Press 2000;3-16.
- Hillege HL, Fidler V, Diercks GF et al. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation* 2002;106:1777-82.
- Hillege HL, Janssen WM, Bak AA et al. Microalbuminuria is common, also in a nondiabetic, nonhypertensive population, and an independent indicator of cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity. *J Intern Med* 2001;249:519-26.
- Holubarsch CJF. Kardiovaskuläre bei Patienten mit Nierenerkrankungen – Epidemiologie, Pathophysiologie und Therapie. *Clin Res Cardiol Suppl* 2007;2:9-14.
- Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 1981;241:F85-93.
- Huber TB, Benzing T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14:211-6.
- Ijpeelaar DH, Schulz A, Koop K et al. Glomerular hypertrophy precedes albuminuria and segmental loss of podoplanin in podocytes in Munich-Wistar-Frömter rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:F758-67.
- Inomata H, Watanabe T, Iizuka Y et al. Identification of quantitative trait loci for cardiac hypertrophy in two different strains of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertens Res* 2005;28:273-81.
- Iyengar SK, Abboud HE, Goddard KA et al. Genome-wide scans for diabetic nephropathy and albuminuria in multiethnic populations: the family investigation of nephropathy and diabetes (FIND). *Diabetes* 2007;56:1577-85.
- Jafar TH, Schmid CH, Stark PC et al. The rate of progression of renal disease may not be slower in women compared with men: a patient-level meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2047-53.
- Jager A, Kostense PJ, Ruhé HG et al. Microalbuminuria and peripheral arterial disease are independent predictors of cardiovascular and all-cause mortality, especially among hypertensive subjects: five-year follow-up of the Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:617-24.
- James MR, Lindpaintner K. Why map the rat? *Trends Genet* 1997;13:171-3.
- Jensen JS, Feldt-Rasmussen B, Strandgaard S, Schroll M, Borch-Johnsen K. Arterial hypertension, microalbuminuria, and risk of ischemic heart disease. *Hypertension* 2000;35:898-903.
- Jones CA, Francis ME, Eberhardt MS et al. Microalbuminuria in the US population: third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis* 2002;39:445-59.

- Karlsen FM, Andersen CB, Leyssac PP, Holstein-Rathlou NH. Dynamic autoregulation and renal injury in Dahl rats. *Hypertension* 1997;30:975-83.
- Kaysen GA. New insights into lipid metabolism in chronic kidney disease: what are the practical implications? *Blood Purif* 2009;27:86-91.
- Kottgen A, Kao WH, Hwang SJ et al. Genome-wide association study for renal traits in the Framingham Heart and Atherosclerosis Risk in Communities Studies. *BMC Med Genet* 2008;9:49.
- Křen V, Pravenec M, Lu S et al. Genetic isolation of a region of chromosome 8 that exerts major effects on blood pressure and cardiac mass in the spontaneously hypertensive rat. *J Clin Invest* 1997;99:577-81.
- Křenová D, Šoltysová L, Pravenec M, Moisan MP, Kurtz WT, Křen V. Putative candidate genes for blood pressure control in the SHR.BN-RNO8 congenic substrains. *Journal of Experimental Animal Science* 2000;41:51-3.
- Kreutz R, Higuchi M, Ganten D. Molecular genetics of hypertension. *Clin Exp Hypertens A* 1992;14:15-34.
- Kreutz R, Hübner N. Congenic rat strains are important tools for the genetic dissection of essential hypertension. *Semin Nephrol* 2002;22:135-47.
- Kreutz R, Kovacevic L, Schulz A, Rothermund L, Ketteler M, Paul M. Effect of high NaCl diet on spontaneous hypertension in a genetic rat model with reduced nephron number. *J Hypertens* 2000;18:777-82.
- Krolewski AS, Poznik GD, Placha G et al. A genome-wide linkage scan for genes controlling variation in urinary albumin excretion in type II diabetes. *Kidney Int* 2006;69:129-36.
- Lander ES, Green P. Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:2363-7.
- Lazar J, Moreno C, Jacob HJ, Kwitek AE. Impact of genomics on research in the rat. *Genome Res* 2005;15:1717-28.
- Leon JM, Freedman BI, Miller MB et al. Genome scan of glomerular filtration rate and albuminuria: the HyperGEN study. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:763-71.
- Levey AS, Coresh J, Balk E et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003;139:137-47.
- Liang M, Lee NH, Wang H et al. Molecular networks in Dahl salt-sensitive hypertension based on transcriptome analysis of a panel of consomic rats. *Physiol Genomics* 2008;34:54-64.
- Macconi D, Abbate M, Morigi M et al. Permselective dysfunction of podocyte-podocyte contact upon angiotensin II unravels the molecular target for renoprotective intervention. *Am J Pathol* 2006;168:1073-85.
- Maric C, Xu Q, Sandberg K, Hinojosa-Laborde C. Age-related renal disease in female Dahl salt-sensitive rats is attenuated with 17 beta-estradiol supplementation by modulating nitric oxide synthase expression. *Gend Med* 2008;5:147-59.
- Marsh JB, Sparks CE. Lipoproteins in experimental nephrosis: plasma levels and composition. *Metabolism* 1979;28:1040-5.
- Mattson DL, Dwinell MR, Greene AS et al. Chromosome substitution reveals the genetic basis of Dahl salt-sensitive hypertension and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F837-42.
- Mattson DL, Kunert MP, Roman RJ, Jacob HJ, Cowley AW Jr. Substitution of chromosome 1 ameliorates L-NAME hypertension and renal disease in the fawn-hooded hypertensive rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F1015-22.

- McBride MW, Charchar FJ, Graham D et al. Functional genomics in rodent models of hypertension. *J Physiol* 2004;554:56-63.
- McGuire BB, Watson RW, Pérez-Barriocanal F, Fitzpatrick JM, Docherty NG. Gender differences in the renin-angiotensin and nitric oxide systems: relevance in the normal and diseased kidney. *Kidney Blood Press Res* 2007;30:67-80.
- Migeon BR. X inactivation, female mosaicism, and sex differences in renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:2052-9.
- Mochizuki T, Wu G, Hayashi T et al. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 1996;272:1339-42.
- Monti J, Plehm R, Schulz H, Ganten D, Kreutz R, Hübner N. Interaction between blood pressure quantitative trait loci in rats in which trait variation at chromosome 1 is conditional upon a specific allele at chromosome 10. *Hum Mol Genet* 2003;12:435-9.
- Moore JH. The ubiquitous nature of epistasis in determining susceptibility to common human diseases. *Hum Hered* 2003;56:73-82.
- Mori K, Nakao K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int* 2007;71:967-70.
- Müller GA, Markovic-Lipkovski J, Frank J, Rodemann HP. The role of interstitial cells in the progression of renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 1992;2:198-205.
- National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39:S1-266.
- Nerlich A, Schleicher E. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. *Am J Pathol* 1991;139:889-99.
- Neugarten J. Gender and the Progression of Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13: 2807–2809.
- Nickolas TL, Barasch J, Devarajan P. Biomarkers in acute and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;17:127-32.
- Ober C, Loisel DA, Gilad Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nat Rev Genet* 2008;9:911-22.
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963;27:282-93.
- Packard M, Saad Y, Gunning WT, Gupta S, Shapiro J, Garrett MR. Investigating the effect of genetic background on proteinuria and renal injury using two hypertensive strains. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:F839-46.
- Phillips TJ, Belknap JK. Complex-trait genetics: emergence of multivariate strategies. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:478-85.
- Poyan Mehr A, Siegel AK, Kossmehl P et al. Early onset albuminuria in Dahl rats is a polygenetic trait that is independent from salt loading. *Physiol Genomics* 2003;14:209-16.
- Prows DR, Hafertepen AP, Winterberg AV et al. Reciprocal congenic lines of mice capture the *aliq1* effect on acute lung injury survival time. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38:68-77.
- Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int* 1984;26:137-43.
- Rangel-Filho A, Sharma M, Datta YH et al. RF-2 gene modulates proteinuria and albuminuria independently of changes in glomerular permeability in the fawn-hooded hypertensive rat. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:852-6.

- Rapp JP, Garrett MR, Deng AY. Construction of a double congenic strain to prove an epistatic interaction on blood pressure between rat chromosomes 2 and 10. *J Clin Invest* 1998;101:1591-5.
- Rapp JP. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev* 2000;80:135-72.
- Remuzzi A, Puntorieri S, Mazzoleni A, Remuzzi G. Sex related differences in glomerular ultrafiltration and proteinuria in Munich-Wistar rats. *Kidney Int* 1988;34:481-6.
- Romundstad S, Holmen J, Kvenild K, Hallan H, Ellekjaer H. Microalbuminuria and all-cause mortality in 2,089 apparently healthy individuals: a 4.4-year follow-up study. The Nord-Trøndelag Health Study (HUNT), Norway. *Am J Kidney Dis* 2003;42:466-73.
- Rovira-Halbach G, Alt JM, Brunkhorst R, Frei U, Kühn K, Stolte H. Single nephron hyperfiltration and proteinuria in a newly selected rat strain with superficial glomeruli. *Ren Physiol* 1986;9:317-25.
- Ruf RG, Wolf MT, Hennies HC et al. A gene locus for steroid-resistant nephrotic syndrome with deafness maps to chromosome 14q24.2. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1519-22.
- Salgado JV, Neves FA, Bastos MG, França AK, Brito DJ, Santos EM, Salgado Filho N. Monitoring renal function: measured and estimated glomerular filtration rates - a review. *Braz J Med Biol Res* 2010;43:528-36.
- Satko SG, Sedor JR, Iyengar SK, Freedman BI. Familial clustering of chronic kidney disease. *Semin Dial* 2007;20:229-36.
- Schachter AD, Ichimura T, Kohane IS. Chromosomes 18 and X are quantitative trait loci for nephrotic-range proteinuria in rats. *Pediatr Nephrol* 2005;20:1717-23.
- Schelling JR, Abboud HE, Nicholas SB et al. Genome-wide scan for estimated glomerular filtration rate in multi-ethnic diabetic populations: the Family Investigation of Nephropathy and Diabetes (FIND). *Diabetes* 2008;57(1):235-43.
- Schork NJ, Krieger JE, Trolliet MR et al. A biometrical genome search in rats reveals the multigenic basis of blood pressure variation. *Genome Res* 1995;5:164-72.
- Schulz A, Hänsch J, Kuhn K et al. Nephron deficit is not required for progressive proteinuria development in the Munich Wistar Frömter rat. *Physiol Genomics* 2008a;35:30-5.
- Schulz A, Litfin A, Kossmehl P, Kreutz R. Genetic dissection of increased urinary albumin excretion in the munich wistar frömter rat. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2706-14.
- Schulz A, Schlesener M, Weiss J et al. Protective effect of female gender on the development of albuminuria in a polygenetic rat model is enhanced further by replacement of a major autosomal QTL. *Clin Sci (Lond)* 2008b;114:305-11.
- Schulz A, Standke D, Kovacevic L et al. A major gene locus links early onset albuminuria with renal interstitial fibrosis in the MWF rat with polygenetic albuminuria. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:3081-9.
- Schulz A, Weiss J, Schlesener M et al. Development of overt proteinuria in the Munich Wistar Frömter rat is suppressed by replacement of chromosome 6 in a consomic rat strain. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:113-21.
- Seda O, Sedova L, Kazdova L, Krenova D, Kren V. Metabolic characterization of insulin resistance syndrome feature loci in three brown Norway-derived congenic strains. *Folia Biol (Praha)* 2002;48:81-8.

- Seda O, Sedová L, Liska F et al. Novel double-congenic strain reveals effects of spontaneously hypertensive rat chromosome 2 on specific lipoprotein subfractions and adiposity. *Physiol Genomics* 2006;27:95-102.
- Shi S, Yu L, Chiu C et al. Podocyte-selective deletion of *dicer* induces proteinuria and glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:2159-69.
- Siegel AK, Kossmehl P, Planert M et al. Genetic linkage of albuminuria and renal injury in Dahl salt-sensitive rats on a high-salt diet: comparison with spontaneously hypertensive rats. *Physiol Genomics*. 2004 Jul 8;18:218-25.
- Silbiger S, Neugarten J. Gender and human chronic renal disease. *Gend Med* 2008;5 Suppl A:S3-S10.
- Stevens LA, Schmid CH, Greene T et al. Factors other than glomerular filtration rate affect serum cystatin C levels. *Kidney Int* 2009;75:652-60.
- Stoll M, Cowley AW Jr, Tonellato PJ et al. A genomic-systems biology map for cardiovascular function. *Science* 2001;294:1723-6.
- Strahorn P, Graham D, Charchar FJ, Sattar N, McBride MW, Dominiczak AF. Genetic determinants of metabolic syndrome components in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 2005;23:2179-86.
- Sullivan JC. Sex and the renin-angiotensin system: inequality between the sexes in response to RAS stimulation and inhibition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;294:R1220-6.
- Tarugi P, Nicolini S, Albertazzi L et al. Dyslipoproteinemia in an inbred rat strain with spontaneous chronic progressive nephrotic syndrome. *J Lipid Res* 1991;32:1675-87.
- Tonelli M, Isles C, Curhan GC et al. Effect of pravastatin on cardiovascular events in people with chronic kidney disease. *Circulation* 2004;110:1557-63.
- Tsimihodimos V, Dounousi E, Siamopoulos KC. Dyslipidemia in chronic kidney disease: an approach to pathogenesis and treatment. *Am J Nephrol* 2008;28:958-73.
- Tsujita Y, Iwai N, Tamaki S, Nakamura Y, Nishimura M, Kinoshita M. Genetic mapping of quantitative trait loci influencing left ventricular mass in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H2062-7.
- van Dijk SJ, Specht PA, Lazar J, Jacob HJ, Provoost AP. Absence of an interaction between the Rf-1 and Rf-5 QTLs influencing susceptibility to renal damage in rats. *Nephron Exp Nephrol* 2006a;104:e96-e102.
- van Dijk SJ, Specht PA, Lazar J, Jacob HJ, Provoost AP. Synergistic QTL interactions between Rf-1 and Rf-3 increase renal damage susceptibility in double congenic rats. *Kidney Int* 2006b;69:1369-76.
- van Dijk SJ, Specht PA, Lutz MM, Lazar J, Jacob HJ and Provoost AP. Interaction between Rf-1 and Rf-4 quantitative trait loci increases susceptibility to renal damage in double congenic rats. *Kidney Int* 2005;68:2462-2472.
- van Dijk SJ. *Physiological Genomics of the Rat Renal Failure QTLs Rf-1 through Rf-5*. Dissertation, Erasmus Universität Rotterdam, 2005.
- Vaziri N D. Dyslipidemia of chronic renal failure: the nature, mechanisms, and potential consequences. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F262-72.
- Vaziri ND, Moradi H. Mechanisms of dyslipidemia of chronic renal failure. *Hemodial Int* 2006;10:1-7.
- Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1982;1:1430-2.

-
- Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL et al. Linkage of a gene causing familial focal segmental glomerulosclerosis to chromosome 11 and further evidence of genetic heterogeneity. *Genomics* 1999;58:113-20.
- Yamori Y, Mori C, Nishio T et al. Cardiac hypertrophy in early hypertension. *Am J Cardiol* 1979;44:964-9.
- Ye P, West MJ. Cosegregation analysis of natriuretic peptide genes and blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:930-6.
- Yoshioka K, Takemura T, Tohda M et al. Glomerular localization of type III collagen in human kidney disease. *Kidney Int* 1989;35(5):1203-11.
- Zhang L, Summers KM, West MJ. Cosegregation of genes on chromosome 5 with heart weight and blood pressure in genetic hypertension. *Clin Exp Hypertens* 1996;18(8):1073-87.

8. Anhang

8.1 Lebenslauf

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

8.2 Publikationen und Abstracts

Originalarbeiten

Schulz A, Hänsch J, Kuhn K, Schlesener M, Kossmehl P, Nyengaard JR, Wendt N, Huber M, Kreutz R. Nephron deficit is not required for progressive proteinuria development in the Munich Wistar Frömter rat. *Physiol Genomics* 2008;35(1):30-5.

van Es N, Schulz A, Ijpelaar D, van der Wal A, Kuhn K, Schütten S, Kossmehl P, Nyengaard JR, de Heer E, Kreutz R. Elimination of severe albuminuria in aging hypertensive rats by exchange of 2 chromosomes in double-consomic rats. *Hypertension*; 2011 Aug;58(2):219-24.

Abstracts

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

Schulz A, Hänsch J, Kuhn K, Schlesener M, Wendt N, Nyengaard JR, Kreutz R. 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. 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)

Schulz A, Hänsch J, Kuhn K, Schlesener M, Wendt N, Nyengaard JR, Kreutz R. 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)

Schulz A, Kuhn K, Kossmehl P, Wendt N, Kreutz R. Complete elimination of the albuminuria phenotype in Munich Wistar Frömter rats by replacement of two chromosomes in a double-consomic strain. *Hypertension* 2009;54:e61.
(High Blood Pressure Council; Chicago, USA 2009)

Schulz A, Kuhn K, Kossmehl P, Wendt N, Kreutz R. Komplette Eliminierung des Albuminurie-Phänotyps bei Munich Wistar Frömter-Ratten durch den Austausch von zwei Chromosomen in einem doppelkonsomen Stamm. *DMW* 2009;134: S7.
(Hochdruckliga; Lübeck, Deutschland 2009)

Schulz A, Kuhn K, Nyengaard JR, Kreutz R. Analysis of a double-consomic rat strain provides new insights into albuminuria and nephron deficit development in Munich Wistar Frömter rats.

(Rat Genomics & Models; Cold Spring Harbor/New York, USA 2009)

Schulz A, Kuhn K, Nyengaard JR, Kreutz R. Replacement of two rat chromosomes completely eliminates the development of albuminuria and affects the inherited nephron deficit in a new double-consomic rat model derived from MWF.
(EDDP; München 2010)

8.3 Vortrag und Auszeichnungen

Vortrag

Genetische Faktoren, die die Albuminurie beeinflussen, unterliegen keinem vollständig rezessiven Vererbungsmodus bei der polygenetisch determinierten Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte.

31. Wissenschaftlicher Kongress Hypertonie 2007 der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL - Deutsche Hypertonie Gesellschaft; Bochum, 23.11.2007.

Auszeichnung

Young Investigator Award 2007

Anlässlich des 31. Wissenschaftlichen Kongresses der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL - Deutsche Hypertonie Gesellschaft, in Bochum.

8.3 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe in der Klinischen Pharmakologie, die Bereitstellung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Ebenso möchte ich mich für die Förderung meiner Arbeit durch ein Forschungsstipendium der Charité herzlich bedanken. Diese hat mir die Durchführung meiner Tätigkeit am Institut begleitend zum Studium deutlich erleichtert.

Frau Dr. Angela Schulz möchte ich ganz herzlich für die ausgezeichnete Unterstützung und konstruktive Kritik während meiner Tätigkeit in der Arbeitsgruppe danken. Sie war mir immer eine große Hilfe und auf ihre Unterstützung bei allen Herausforderungen und Schwierigkeiten im wissenschaftlichen Alltag war stets Verlass.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Sabine Wunderlich und Frau Claudia Plum dafür, dass sie mir beim Erlernen von Methoden geduldig zur Seite standen und zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre im Labor beitrugen.

Herrn Dr. Norbert Wendt danke ich besonders für die Einarbeitung und praktische Unterstützung bei der tierexperimentellen Arbeit. Herrn Dr. Peter Koßmehl gilt mein Dank für die Mitwirkung an den histologischen Auswertungen.

In der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin und im Institut für Toxikologie sei vor allem Bettina Bublath und Christiane Priebsch für die Durchführung der Rattenzucht und für die stetige Hilfsbereitschaft gedankt.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, die mich als Doktorandin vielfach unterstützt und gefördert haben, für die fruchtbare Zusammenarbeit und das ausgesprochen freundliche Miteinander. Insbesondere seien an dieser Stelle Heike Negatu, Maria Schlesener und Dr. Jonna Hänsch genannt.

Und schließlich bin ich ganz besonders meinem Lebensgefährten Matthias Plehm und meiner Familie für die vielen aufmunternden Worte und die Motivation, sowie die Unterstützung im Alltag zu Dank verpflichtet, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

8.4 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Kristina Kuhn, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Charakterisierung des doppelkonsomen Rattenstamms MWF-6^{SHR}8^{SHR} zur Analyse der Albuminurie-QTL auf Chromosom 6 und Chromosom 8 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

06.07.2011