

Aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. G. A. Müller)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Bedeutung der Blockade des lokalen
Angiotensinsystems für die chronisch progrediente
Niereninsuffizienz im Rahmen der Alport-Nephritis**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Sebastian Bemme
aus
Rodewisch

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Strutz

II. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Krick

III. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Wilting

Promotor-Vertretung: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. Crozier

Tag der mündlichen Prüfung: 03. September 2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die chronisch progrediente Niereninsuffizienz	1
1.2 Die Alport-Nephritis und das Tiermodell der Kollagen-4A3-defizienten Mäuse	5
1.3 Die Nierenfibrose	8
1.4 Das lokale Angiotensinsystem der Niere	12
1.5 Bone Morphogenetic Protein-7 und der BMP-Signalweg	14
1.6 PAI-1, uPAR und das Plasminogen-Plasmin-System im Rahmen der renalen Fibrosierung	17
1.7 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Reagenzien und Chemikalien	22
2.1.2 Selbst angesetzte Puffer und Lösungen	24
2.1.3 Primär-Antikörper	25
2.1.4 Sekundär-Antikörper	26
2.1.5 Oligonukleotid-Primer.....	26
2.1.6 Multikomponentensysteme	27
2.1.7 Gebrauchswaren	27
2.1.8 Software	27
2.1.9 Gerätschaften	28
2.2 Tiermodell und Studiendesign	29
2.2.1 Tiermodell	29
2.2.2 Genotyping der Versuchstiere	29
2.2.3 Studiendesign	30
2.2.4 Berechnung der Medikamentendosierung	30
2.3 Gewinnung organischen Materials	31
2.3.1 Präparation der Versuchstiere	31
2.3.2 Materialaufbereitung	31
2.3.3 Anfertigung von Gewebeschnitten	31
2.4 Biochemische Analysen	32
2.4.1 Bestimmung der Kreatinin- und Harnstoff-N-Konzentration im Serum..	32
2.4.2 Bestimmung des Gesamt-Kollagen-Gehaltes mittels Hydroxyprolin-Assay.....	32
2.5 Histologische Methoden	33
2.5.1 Vorbereitung der Gewebeschnitte	33

2.5.2 Methylgrün-Pikrosiriusrot-Färbung	33
2.5.3 Immunhistochemie	34
2.5.3.1 Immunhistochemie: α SMA-IH, S100A4-IH, PCNA-IH	34
2.5.3.2 BMP-7-PCNA-Doppelimmunhistochemie	35
2.5.3.3 α SMA-PCNA-Doppelimmunhistochemie	35
2.5.4 Immunfluoreszenz	36
2.5.4.1 PAI-1-Immunfluoreszenz	36
2.5.4.2 PAI-1- und AQP-1/2-Immunfluoreszenz angrenzender Gewebeschnitte	36
2.5.4.3 Doppelimmunfluoreszenz: α SMA-PAI-1-, α SMA-S100A4- und PCNA-S100A4-DIF	37
2.5.5 Anfertigung histologischer Abbildungen	38
2.5.6 Quantitative Auswertung der histologischen Färbungen	38
2.5.6.1 Quantifizierung der Fibrose über Flächenanteilbestimmung der Kollagenfasern	38
2.5.6.2 Quantifizierung der PCNA-Immunhistochemie	38
2.6 Expressionsanalysen	39
2.6.1 Vorbereitung der Gewebeproben für die mRNA-Isolation	39
2.6.2 Kombinations-Isolationsverfahren mit der Isolation nach Chomczynski und RNeasy® Mini Kit von Qiagen	39
2.6.3 Konzentrationsbestimmung	39
2.6.4 Umschreiben der Gesamt-mRNA zu cDNA	40
2.6.5 Vorbereitung der RT-PCR-Ansätze	41
2.6.6 Ablauf der RT-PCR	42
2.6.7 Berechnung der relativen Expression	42
2.7 Statistische Analysen	44
3 Ergebnisse	45
3.1 Retentionswerte: Kreatinin und Harnstoff-N im Serum	45
3.2 Tubulointerstitielle Fibrosierung	46
3.2.1 Quantitative Bestimmung des Fibrosierungsgrades	46
3.2.2 RT-PCR: Maus-Prokollagen Typ 1A1	47
3.2.3 Exemplarische histologische Darstellung der Fibrosierung	48
3.3 Proliferation tubulärer, interstitieller und glomerulärer Zellen	49
3.3.1 Quantitative Auswertung der PCNA-Immunhistochemie	49
3.3.2 Exemplarische histologische Darstellung proliferierender Zellen	51
3.4 Expression des BMP-7 und des ALK-3	52
3.4.1 mBMP-7- und mALK-3-RT-PCR und BMP-7-Immunhistochemie	52

3.5 Expression des PAI-1 und des uPAR	53
3.5.1 mPAI-1- und muPAR-RT-PCR	53
3.5.2 PAI-1-Immunfluoreszenz	54
3.6 Histologische Abbildungen	55
3.6.1 Methylgrün-Pikrosiriusrot-Färbung	55
3.6.2 α -Glattmuskelaktin-Immunhistochemie (α SMA-IH)	56
3.6.3 S100A4-Immunhistochemie	57
3.6.4 α -Glattmuskelaktin-S100A4-Doppelimmunfluoreszenz	58
3.6.5 PCNA-Immunhistochemie	59
3.6.6 PCNA- α -Glattmuskelaktin-Doppelimmunhistochemie	60
3.6.7 PCNA-S100A4-Doppelimmunfluoreszenz	60
3.6.8 PCNA-BMP-7-Doppelimmunhistochemie	61
3.6.9 PAI-1-Immunfluoreszenz und PAI-1- α -Glattmuskelaktin- Doppelimmunfluoreszenz	62
3.6.10 PAI-1-, AQP1- und AQP2-Immunfluoreszenz angrenzender Gewebeschnitte	63
4 Diskussion	64
4.1 Progressionsminderung der chronisch progredienten Niereninsuffizienz durch Blockade des lokalen Angiotensinsystems	64
4.2 Bedeutung des Bone Morphogenic Protein-7 und dessen Rezeptor ALK-3 im Rahmen der chronisch progredienten Niereninsuffizienz	73
4.3 Bedeutung des PAI-1 und des uPAR im Rahmen der chronisch progredienten Niereninsuffizienz	75
5 Zusammenfassung	78
6 Abkürzungsverzeichnis	80
7 Literaturverzeichnis	83

1 Einleitung

1.1 Die chronisch progrediente Niereninsuffizienz

Die chronisch progrediente Niereninsuffizienz ist definiert als eine mindestens 3 Monate bestehende Einschränkung der Nierenfunktion mit einer glomerulären Filtrationsrate < 60 ml/min pro $1,73$ m² KO oder durch pathologische Veränderungen in der Nierenbiopsie bei höherer GFR (Levey et al. 2005) und wird nach internationalen Richtlinien in 5 Stadien eingeteilt, wobei sich das Endstadium, die terminale Niereninsuffizienz oder End Stage Renal Disease, durch eine GFR < 15 ml/min pro $1,73$ m² KO bzw. die Erfordernis einer Nierenersatztherapie definiert (Levey et al. 2003).

In den letzten Jahren kam es zu einer starken Zunahme sowohl chronisch als auch terminal niereninsuffizienter Patienten. Man geht in Deutschland von einer Population von fast 10 Millionen Menschen mit chronischer Niereninsuffizienz in den verschiedenen Stadien aus mit ca. 90000 nierenersatzpflichtigen Patienten mit Dialyse und Nierentransplantation, wobei die Inzidenz und Prävalenz terminal niereninsuffizienter Patienten jährlich um etwa 4-5 % ansteigt (Frei und Schober-Halstenberg 2008; Hugo 2007). In den USA hat sich von 1990 bis 2005 sowohl die Inzidenz als auch die Prävalenz der terminalen Niereninsuffizienz mehr als verdoppelt (St Peter 2007) und bis 2010 wurde ein Anstieg der globalen Population terminal niereninsuffizienter Patienten auf 2 Millionen vorausgesagt (Lysaght 2002).

Ursachen der chronisch progredienten Niereninsuffizienz sind mannigfaltig. Aufgrund der enormen Zunahme der Prävalenz des Diabetes mellitus Typ II in den letzten Jahren ist die Diabetische Nephropathie in den westlichen Industrienationen mit einem Anteil von 30-40 % zur häufigsten Ursache der chronisch progredienten und der terminalen Niereninsuffizienz geworden (Whaley-Connell et al. 2009). Es wurde für Deutschland ein Anstieg der Prävalenz von Typ-II-Diabetikern von 6 % im Jahr 2000 auf ca. 8 % bis zum Jahr 2010 berechnet (Hauner 2006) und in den USA ein Trend der Prävalenz des Diabetes mellitus von 4 % im Jahr 2000 auf voraussichtlich 7,2 % bis zum Jahr 2050 ermittelt (Boyle et al. 2001). Zweithäufigste Ursache der chronisch progredienten Niereninsuffizienz ist die Hypertensive Nephropathie, die durch die hohe Inzidenz und zunehmende Prävalenz der Hypertoniker in der Bevölkerung ebenfalls vermehrt an Bedeutung gewinnt (Bakris und Ritz 2009). Weitere Ursachen sind verschiedene Glomerulonephritiden und interstitielle Nephritiden. Als häufigste angeborene Ursachen gelten die Zystennierenerkrankung und das Alport-Syndrom.

Die chronisch progrediente Niereninsuffizienz ist gekennzeichnet durch eine meist langsame Progredienz und wird oftmals erst ab Stadium 3 bis 4 symptomatisch, häufig aber im Rahmen einer Routineuntersuchung diagnostiziert (Methven und MacGregor 2009). Bei zunehmender Einschränkung der renalen Funktion kann es aufgrund der Volumenretention

1 Einleitung

zu prätibialen Ödemen bis hin zum Lungenödem kommen. Des Weiteren treten Störungen des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes auf, wie Hyperkaliämie, Hyperphosphatämie und metabolische Azidose. Folge der fehlenden Entgiftung ist die Urämie, diagnostiziert durch einen Anstieg der Retentionsparameter Kreatinin und Harnstoff-N. Verursacht werden die Urämiesymptome, wie Übelkeit und Vigilanzstörungen, durch Akkumulation von Methylguanidin, AGEs, Polyaminen und β 2-Mikroglobulin (Yavuz et al. 2005) sowie zahlreichen weiteren Substanzen, die von der EUTox-Gruppe als Urämietoxine klassifiziert wurden (Vanholder et al. 2008). Der Mangel an Erythropoetin führt zur renalen Anämie und der Mangel an aktivem Vitamin D3 bedingt die renale Osteopathie. Entscheidend für den Verlauf der Erkrankung ist, dass das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse mit verminderter GFR deutlich ansteigt und diese die Haupttodesursache terminal niereninsuffizienter Patienten darstellen (Kundhal und Lok 2005; Levin 2003). Kardiovaskuläre Ereignisse nehmen allerdings auch erheblichen Anteil an der Mortalität der Patienten in früheren Stadien, selbst bei nur leicht eingeschränkter Nierenfunktion (Pinkau et al. 2004). Daher erreicht nur ein Bruchteil der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz trotz Progredienz der Erkrankung das Stadium 5.

Therapieempfehlungen zur Behandlung der chronisch progredienten Niereninsuffizienz umfassen neben der Behandlung der Grunderkrankung und Meidung nephrotoxischer Substanzen v.a. eine Blutdruckeinstellung auf 130/80 mmHg bzw. 125/75 mmHg bei bereits bestehender Proteinurie von > 1 g/Tag und außerdem eine diätetische Proteinrestriktion zur Senkung der Proteinurie mit Zielwerten unter 0,5 g/Tag (Thilly et al. 2009; Zidek 2010). Aufgrund ihrer nephroprotektiven Wirkung empfehlen sich v.a. ACE-Hemmer und Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten zur Senkung des Blutdruckes.

Bei annähernd komplettem Verlust der Organfunktion, d.h. im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz, stehen derzeit der Ersatz des gesamten Organs mittels allogener Nierentransplantation oder der Ersatz der renalen Eliminations-Funktion durch Hämodialyse oder Peritonealdialyse zur Verfügung.

Die Methode der Hämodialyse, wie sie heute als Standardverfahren in der Medizin eingesetzt wird, geht zurück auf die Erfindung von Georg Haas, der 1924 erstmals eine „Blutwaschung“ am Menschen durchführte. Die Grundidee, Trennung von Partikeln und Flüssigkeit mittels einer semipermeablen Membran, wurde bereits 1854 von dem schottischen Chemiker Thomas Graham entdeckt. 1948 überlebte ein Patient erstmals aufgrund durchgeführter Hämodialyse durch den niederländischen Arzt Johan Kolff ein akutes Nierenversagen. Der Durchbruch in der Versorgung chronisch Kranker mittels Hämodialyse gelang erst mit der Entwicklung des chirurgisch angelegten arteriovenösen Shunts 1960 durch Belding Scribner und Wayne Quinton (Enke 2007; Wizemann und Benedum 1994).

1 Einleitung

Die Peritonealdialyse wurde bereits 1923 durch Georg Ganter bei einem urämischen Patienten in Würzburg erstmals eingesetzt. Durch die Arbeiten und Veröffentlichungen von Popovich und Oreopoulos im Jahr 1978 gewannen die chronisch ambulante Peritonealdialyse sowie die zu Hause durchführbare Peritonealdialyse zunehmend an Bekanntheit und wurden daraufhin vermehrt in der Versorgung terminal niereninsuffizienter Patienten verwendet (Oreopoulos et al. 2008; Popovich et al. 1978).

Im Moment stehen in Deutschland ca. 1200 Dialyseeinrichtungen zur Verfügung. Laut dem Quasi-Niere-Bericht ermittelte man für das Jahr 2006 in Deutschland eine Prävalenz von ca. 66.500 Dialysepatienten, davon ca. 3.200 Patienten, die mittels Peritonealdialyse behandelt wurden (Frei und Schober-Halstenberg 2008). Angesichts der steigenden Prävalenz dialysepflichtiger Patienten gewinnen auch die Probleme, die sich aus der Versorgung terminal niereninsuffizienter Patienten mittels Dialyse ergeben, zunehmend an Bedeutung. Dabei stehen einerseits volkswirtschaftliche Aspekte und andererseits Komplikationen, die mit der Dialyse verbunden sind, im Vordergrund. Die hohe und weiter steigende finanzielle Belastung für das Gesundheitswesen wird deutlich, wenn man bedenkt, dass der Anteil der Kosten für die Nierenersatztherapie ca. fünfmal so hoch ist wie der Anteil der terminal niereninsuffizienten Patienten an der Population aller chronisch Kranken (St Peter 2007). Komplikationen an der Hämodialyse umfassen u.a. Hypotonie, Muskelkrämpfe, Schmerzen, Übelkeit, Blutungskomplikationen und anaphylaktische Reaktionen, die allerdings aufgrund neuerer biokompatibler Dialysemembrane wesentlich seltener geworden sind. Eine der Hauptkomplikationen der Hämodialyse ist trotz sehr strenger Hygienemaßnahmen die Infektion und Thrombosierung des arterio-venösen Shunts, da dieser im Regelfall pro Woche dreimal punktiert wird. Des Weiteren kommt es bei zahlreichen Hämodialysepatienten im Laufe der Zeit vermehrt zu vaskulären Kalzifikationen, die das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse weiter erhöhen (Krasniak et al. 2007). Bei der Peritonealdialyse stellt die Peritonitis die häufigste und gravierendste Komplikation dar. Das Überleben einer großen Anzahl terminal niereninsuffizienter Patienten wurde mit der hohen Verfügbarkeit der Dialyse in den Industriestaaten deutlich verlängert. Die Mortalität in Deutschland beträgt ungefähr 17,5 % pro Jahr und ist in den letzten Jahren konstant geblieben (Frei und Schober-Halstenberg 2008). Die 5-Jahres-Überlebensrate von Dialysepatienten liegt im Moment bei ca. 50%, wobei die Überlebenszeit individuell stark schwankt und von den jeweiligen Risikofaktoren des Patienten abhängt. Ziel der Dialyse ist die Überbrückung der fehlenden Nierenfunktion, bis ein Spenderorgan für den Patienten zur Transplantation zur Verfügung steht, wobei eine Großteil der Patienten aufgrund von Komorbiditäten nicht für den Eingriff geeignet und daher lebenslang auf die Dialyse angewiesen ist.

Die allogene Nierentransplantation stellt derzeit die Therapie der Wahl der terminalen Niereninsuffizienz dar. Die Erfolgsgeschichte dieses Therapieansatzes ist durch die

1 Einleitung

zunehmende Verbesserung der chirurgischen Techniken und der Immunsuppression in den letzten Jahrzehnten bedingt (Kaplan und Meier-Kriesche 2004). Bereits 1902 gelangen Emrich Ullmann in Wien erfolgreich mehrere Nierentransplantationen im Tierexperiment (Langer und Kahan 2002). Die erste am Menschen durchgeführte Nierentransplantation im Jahr 1933 sowie weitere in den darauffolgenden Jahren führten zwar allesamt akut oder innerhalb eines Jahres zu einer Abstoßungsreaktion des Transplantats, zeigten aber, dass nach technischen Gesichtspunkten die Verpflanzung der Niere und eine Anastomosierung der Nierengefäße bzw. der Ureteren auch beim Menschen möglich ist. Erst 1954 gelang Dr. Joseph Murray und Dr. J. Hartwell Harrison in Boston zwischen eineiigen Zwillingen eine Nierentransplantation mit langfristiger, letztendlich acht Jahre bestehender Transplantatfunktion (Barry und Murray 2006). Zu Beginn der sechziger Jahre führte der Einsatz immunsuppressiver Medikamente zu weiteren Fortschritten in der Transplantationschirurgie, wobei zunächst die Kombination von Azathioprin mit Corticosteroiden Verwendung fand. Als Meilenstein der immunsuppressiven Therapie in der Transplantationschirurgie ist sicherlich die Einführung von Ciclosporin A zu Beginn der achtziger Jahre zu werten (Oka und Yoshimura 1996), mit dessen Hilfe die Transplantatüberlebensrate bei Leichenspende deutlich gesteigert werden konnte. Obwohl die Niere eines der am häufigsten transplantierten menschlichen Organe ist, übersteigt die Zahl der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz die Zahl der zur Verfügung stehenden Spender-Nieren deutlich. Nach erfolgter Transplantation besteht lebenslang die Gefahr einer Transplantatdysfunktion, deren Risiko allerdings mittels neuer immunsuppressiver Medikamente in den letzten Jahren weiterhin deutlich gesenkt werden konnte.

Trotz der enormen Fortschritte in der Behandlung der chronisch progredienten Niereninsuffizienz mittels Dialyse oder Nierentransplantation fordern diese Therapieansätze einen erheblichen Tribut, sei es einerseits durch die Belastung des Gesundheitswesens und die Komplikationen aufgrund der Hämodialyse oder andererseits durch die Notwendigkeit einer immunsuppressiven Therapie für den Rest des Lebens nach erfolgter Nierentransplantation. Angesichts dieser Probleme und der voraussichtlich weiter ansteigenden Zahl terminal niereninsuffizienter Patienten in den kommenden Jahrzehnten stehen sowohl praktizierende Mediziner als auch die Forschung einer großen Herausforderung gegenüber. Neben der Aufgabe, die chronisch progrediente Niereninsuffizienz in möglichst frühen Stadien zu erkennen, um die Patienten rechtzeitig an die entsprechenden Spezialisten weiterzuleiten, ist es außerdem notwendig, nach neuen Therapien zu suchen, die im Gegensatz zu aktuellen Behandlungsformen das Voranschreiten der chronisch progredienten Niereninsuffizienz nicht nur verlangsamen, sondern auch in späten Stadien aufhalten und bestenfalls sogar zu einer Umkehrung des Prozesses führen.

1.2 Die Alport-Nephritis und das Tiermodell der Kollagen-4A3-defizienten Mäuse

In der vorliegenden Studie wurde das Tiermodell der Kollagen-4A3-defizienten Mäuse verwendet, die eine chronische Niereninsuffizienz entwickeln, deren Pathogenese der Alport-Nephritis des Menschen entspricht. Das Alport-Syndrom wurde erstmals 1927 von A. C. Alport (Alport 1927; Kashtan und Michael 1996) beschrieben und stellt eine hereditäre progressive Nephropathie, einhergehend mit Innenohrschwerhörigkeit (Johnsson und Arenberg 1981; Myers und Tyler 1972) und Augenveränderungen (Thompson et al. 1987), dar. Die Prävalenz der Erkrankung in der Gesamtbevölkerung beträgt ca. 0,01-0,02 % (Haas 2006; Haas 2009). Mit 1-2 % Prävalenz in der Population dialysepflichtiger Patienten findet sich das AS neben der Zystennieren-Erkrankung als zweithäufigste angeborene Ursache der terminalen Niereninsuffizienz (Turner und Rees 1996), wobei man je nach Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz eine juvenile (<31. LJ.) und eine adulte Form (>31. LJ.) des Alport-Syndroms unterscheidet.

Die Erkrankung wird durch einen fehlerhaften Aufbau von Kollagen Typ IV, welches u.a. in den Basalmembranen der Glomeruli, des Innenohrs und des Auges vorkommt, hervorgerufen. Normalerweise besteht Kollagen Typ IV aus einer Triple-Helix dreier Alpha-Ketten, wobei 6 verschiedene Kollagen-IV-Alpha-Ketten vom menschlichen Genom codiert werden (Khoshnoodi et al. 2008) und drei Triple-Helix-Kombinationen möglich sind.

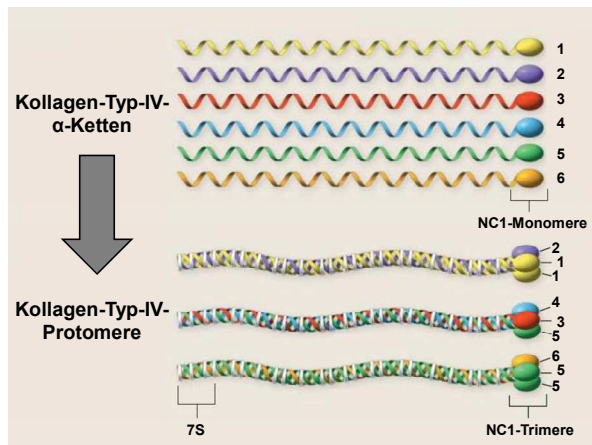


Abb. 1: Darstellung der 6 verschiedenen α -Ketten des Kollagen Typ IV beim Menschen und der drei möglichen Triple-Helix-Kombinationen (nach Hudson et al. 2003, S. 2544).

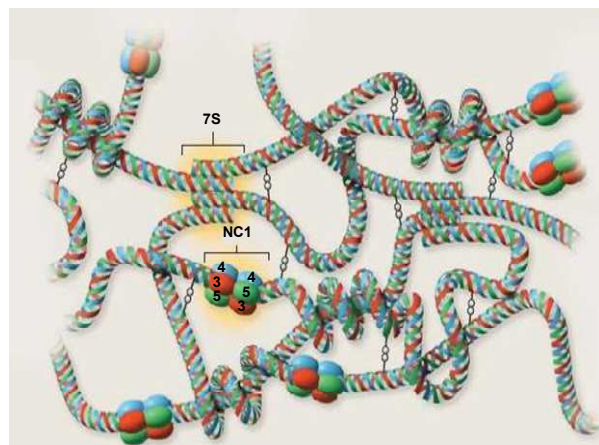


Abb. 2: Darstellung des Kollagen-IV-Netzwerkes, aufgebaut aus Kollagen-IV- $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Triple-Helices, wie es in Basalmembranen der Glomeruli vorkommt (nach Hudson et al. 2003, S. 2545).

Während der embryonalen Entwicklung besteht das Kollagen-IV-Grundgerüst aus mehreren Kollagen-IV- $\alpha1\alpha1\alpha2$ -Triple-Helices. Während der Adoleszenz werden diese in den Basalmembranen der Glomeruli, des Innenohrs und des Auges normalerweise durch Kollagen-IV- $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Triple-Helices und in der Bowman-Membran durch Kollagen-IV- $\alpha5\alpha5\alpha6$ -Triple-Helices ersetzt, wie in Abb. 3 (S. 6) gezeigt. Werden aufgrund einer Genmutation die α -Ketten 3, 4 oder 5 nicht gebildet, kommt es im Verlauf der Adoleszenz zu

1 Einleitung

Strukturabnormalitäten, wie Lamellierung und Aufsplitterung der Basalmembrane des Glomerulus (Hudson et al. 2003), wie in Abb. 4 dargestellt.

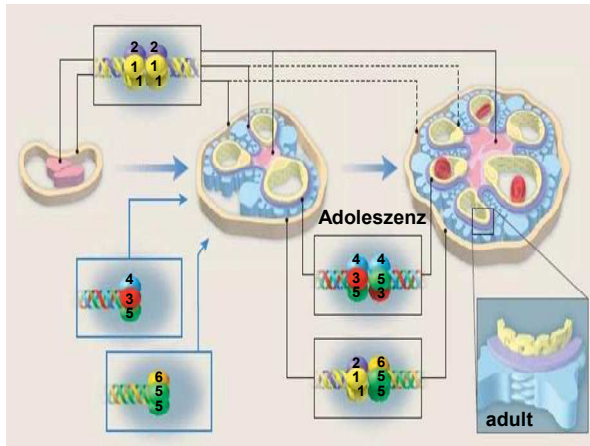


Abb. 3: Ersatz der Kollagen-IV- $\alpha1\alpha1\alpha2$ -Triple-Helices im Kollagen-IV-Netzwerk durch Kollagen-IV- $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Triple-Helices in der glomerulären Basalmembran bzw. durch Kollagen-IV- $\alpha5\alpha5\alpha6$ -Triple-Helices in der Bowman-Membran im Verlauf der Adoleszenz (nach Hudson et al. 2003, S. 2546).

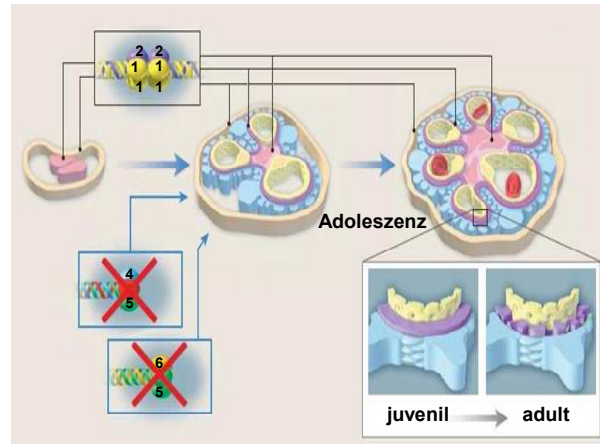


Abb. 4: Der fehlende Ersatz der Kollagen-IV- $\alpha1\alpha1\alpha2$ -Triple-Helices durch Kollagen-IV- $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Triple-Helices führt zu Aufsplitterung und Lamellierung der glomerulären Basalmembran und dadurch zur Alport-Nephritis mit chronischem Nierenversagen (nach Hudson et al. 2003, S. 2546).

Als Ursache findet sich dabei in 85 % der Fälle eine Mutation im x-chromosomal lokalisierten Gen der Alpha-5-Kette des Kollagens Typ IV (Hudson et al. 2003), die bei männlichen Mutationsträgern zu einem progressiven Verlauf der Erkrankung mit Hämaturie und Proteinurie als Frühsymptome und mit Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz bereits im Jugendalter bis jungen Erwachsenenalter führt, dagegen bei heterozygoten weiblichen Mutationsträgern meist nur eine Hämaturie und Proteinurie verursacht (Turner und Rees 1996). Mutationen im Gen der Alpha3- oder der Alpha4-Kette des Kollagens Typ IV bedingen das autosomal-rezessiv (Lemmink et al. 1994; Mochizuki et al. 1994) oder das sehr seltene autosomal-dominant (Jefferson et al. 1997; van der Loop et al. 2000) vererbte Alport-Syndrom, deren Phänotypen im Gegensatz zum x-chromosomal vererbten Alport-Syndrom variabler ausgeprägt sind (Heidet et al. 2001; van der Loop et al. 2000). Heute geht man davon aus, dass heterozygote Mutationsträger des autosomal-rezessiv vererbten Alport-Gendefektes mit 40 % einen beträchtlichen Anteil der Patienten mit Familiärer Benigner Hämaturie (FBH) darstellen, deren Prävalenz in der Gesamtbevölkerung annähernd 1% beträgt (Haas 2009; Voskarides et al. 2007). Die FBH wird aufgrund ihrer glomerulären Morphologie im englischen Sprachraum auch „thin basement membrane disease“ genannt und ist zusammen mit der IgA-Nephropathie die häufigste Ursache der asymptomatischen Hämaturie (Savigne et al. 2003).

Probleme bei der Diagnose des Alport-Syndroms ergeben sich aus dem erst relativ spät auftretenden wegweisenden Symptomenkomplex aus Niereninsuffizienz und Innenohrschwerhörigkeit. Eine frühzeitige sichere Diagnosestellung, durchgeführt z.B. bei

1 Einleitung

isolierter Hämaturie im Kindesalter oder bekannter Familienanamnese, und die damit verbundene Möglichkeit einer frühzeitigen therapeutischen Intervention ist nur durch Analysen auf molekularer Ebene erreichbar. Dies ist entweder durch immunhistochemischen Nachweis der veränderten Zusammensetzung des Kollagens Typ IV oder durch Nachweis der genetischen Mutation der Gene für die Kollagen-IV- α 3-, α 4- und α 5-Ketten möglich (Gubler 2007).

Aktuell ist eine kausale Therapie der Alport-Nephritis nur mittels Nierentransplantation möglich. Konservative Therapiestrategien zielen auf eine Progressionsminderung der Erkrankung ab, um ein Fortschreiten der chronisch progredienten Niereninsuffizienz zu verlangsamen, und umfassen die bereits in Kapitel 1.1 beschriebenen Therapiemaßnahmen. Ein Erfolg versprechender Therapieansatz ist die Gabe von ACE-Hemmern, die bereits im Tiermodell der Kollagen-4A3-defizienten Mäuse eine deutliche Progressionsminderung der Alport-Nephritis in Bezug auf die tubulointerstitielle Fibrose, die Proteinurie und den Anstieg der Retentionswerte mit stärkerem Effekt im Vergleich zu Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten aufwiesen (Gross et al. 2004). Derzeitige Empfehlungen beinhalten daher neben den grundlegenden Therapiestrategien zur Progressionsminderung der chronisch progredienten Niereninsuffizienz die frühzeitige hochdosierte Gabe von ACE-Hemmern, wie z.B. Ramipril, bei Kindern mit diagnostiziertem Alport-Syndrom, wobei die Langzeiteffekte dieser Behandlungsstrategie aktuell noch intensiv untersucht werden (Gross und Kashtan 2009).

Als weiterer Therapieansatz wird der Einsatz von Stammzellen im Rahmen des Alport-Syndroms untersucht, wobei verschiedene Studien einen positiven Effekt im Sinne einer verzögerten renalen Fibrosierung und einer verbesserten Nierenfunktion der mittels Stammzelltherapie behandelten Versuchstiere zeigten, ein Effekt auf die Überlebenszeit der Versuchstiere und den Zeitpunkt der terminalen Niereninsuffizienz aber nicht in allen Studien nachgewiesen werden konnte (LeBleu et al. 2009; Ninichuk et al. 2006).

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse durch Gabe von ACE-Hemmern steht die Erforschung der Therapiestrategien zur Behandlung des Alport-Syndroms noch weit am Anfang. Es werden noch zahlreiche klinische und tierexperimentelle Studien benötigt, einerseits zur Optimierung bekannter Therapieansätze und zur Gewinnung von Langzeitresultaten, andererseits um die Effekte neuer Therapiestrategien, wie z.B. der Stammzelltherapie im Rahmen der Alport-Nephritis, zu untersuchen und diese in Zukunft auch in der Behandlung von Patienten einsetzen zu können. Des Weiteren sollte die Grundlagenforschung an Tiermodellen des Alport-Syndroms dazu dienen, neue Therapieansätze zu finden, die die Progression der chronischen Niereninsuffizienz aufgrund einer Alport-Nephritis nicht nur aufhalten, sondern auch umkehren können.

1.3 Die Nierenfibrose

Die tubulointerstitielle Fibrose, einhergehend mit der Atrophie der Tubuli und der peritubulären Kapillaren, stellt neben der Glomerulosklerose das morphologische Korrelat der chronisch progredienten Niereninsuffizienz dar (Boor et al. 2010), wobei gezeigt werden konnte, dass die Fibrosierung des Nierenparenchyms stärker mit der Einschränkung der Nierenfunktion korreliert als glomeruläre Veränderungen (Strutz und Müller 2006). Grundlage der Fibrosierung ist die Akkumulation interstitieller Matrixbestandteile, wie u.a. Kollagen verschiedener Typen, Fibronectin, Laminin, Proteoglykane, Polysaccharide und Glykoproteine im Interstitium (Eddy 1996). Ursache ist einerseits die vermehrte Bildung interstitieller Matrixbestandteile durch aktivierte Fibroblasten bzw. Myofibroblasten und andererseits der verminderte Abbau durch u.a. Matrixmetalloproteinasen. Abhängig von der Ursache kann ersterer oder letzterer Mechanismus größere Bedeutung für die Fibrosierung haben. Isolierte Fibroblasten aus fibrotischen Nieren weisen eine deutlich höhere Kollagenproduktion auf als solche, die aus gesundem Nierengewebe gewonnen wurden (Rodemann und Müller 1991). Das Tiermodell der unilateralen Ureterobstruktion UUO dagegen geht mit stark vermindertem Kollagenabbau, aber kaum erhöhter Kollagensynthese einher (Gonzalez-Avila et al. 1988).

Bei der Erforschung der Nierenfibrosierung stellten sich in den letzten Jahren zwei grundsätzliche Fragen, zum einen nach der Herkunft der für die Fibrosierung verantwortlichen aktivierten Fibroblasten und zum anderen nach den Mediatoren, die zur Aktivierung der Fibroblasten führen. Fibroblasten wurden ursprünglich als kontraktile zelluläre Elemente sowie als Quelle extrazellulärer Matrix beschrieben (Cohnheim 1867). Die derzeitige beste Definition lautet: Zellen, die nicht Blutgefäßen, Entzündungszellen oder Epithelien zugeordnet sind und den zellulären Hauptbestandteil des interstitiellen Gewebes und Bindegewebes darstellen (Kalluri und Zeisberg 2006). Gemeinsamkeit aller Fibroblasten ist die spindelförmige Morphologie, wobei die Gruppe aller Zellen, die dieses morphologische Kennzeichen im Nierenparenchym erfüllen, sehr heterogen ist. Außerdem existieren nur wenige spezifische Markerproteine, die eine Unterscheidung der verschiedenen Zellpopulationen mesenchymalen Ursprungs mit spindelförmiger Morphologie im Nierenparenchym ermöglichen. Man unterscheidet neben den eigentlichen ursprünglichen Fibroblasten des Interstitiums (Expression von 5´Ectonucleotidase und des Fibroblast Specific Protein-1 FSP-1) u.a. durch EMT entstandene Fibroblasten (Expression von FSP-1), Perizyten (Expression von Nerve Growth Factor und Platelet Derived Growth Factor- α - und - β -Rezeptor), glatte Gefäßmuskelzellen (Expression von Alpha-Glattmuskelaktin), Myofibroblasten (Expression von Alpha-Glattmuskelaktin) und mesenchymale Stammzellen, wobei zur Unterscheidung der genannten Zellpopulationen zusätzliche topografische

1 Einleitung

Kriterien benötigt werden, z.B. die Nähe der Perizyten zu Gefäßen (Strutz und Zeisberg 2006).

Die Aktivierung des Myofibroblasten, der verantwortlich für die interstitielle Matrixdeposition ist (Grinnell 1994; Qi et al. 2006; Zeisberg et al. 2000), wird heute als Schlüsselereignis in der renalen Fibrosierung angesehen, da dieser Zelltyp bei der Progression der Nierenfibrose eine entscheidende Rolle spielt (Essawy et al. 1997; Meran und Steadman 2011; Tang et al. 1996). Der Begriff Myofibroblast wurde ursprünglich für Fibroblasten mit kontraktile Eigenschaften (Strutz und Müller 2006) geprägt, die u.a. verantwortlich für die Kontraktion bei der Wundheilung sind (Ryan et al. 1974). Der Myofibroblast kennzeichnet sich durch die Expression von Alpha-Glattmuskel-Aktin (Hinz 2007; Tomasek et al. 2002), welches allerdings auch in anderen mesenchymalen Zellen wie z.B. Perizyten und physiologisch in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird (Kalluri und Zeisberg 2006). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung nicht bei allen Fibroblasten zur Expression von Alpha-Glattmuskel-Aktin führt und daher die Population der aktivierten Fibroblasten zwar hauptsächlich, aber nicht ausschließlich aus Myofibroblasten besteht (Okada et al. 2000). Neben der Veränderung des Phänotyps infolge Alpha-Glattmuskel-Aktin-Expression kommt es außerdem zu einer ausgeprägten Zunahme der Synthese interstitieller Matrix (Rodemann und Müller 1991) und der proliferativen Aktivität (Strutz et al. 2000 b). In der Zellkultur lassen sich aus fibrotischen Nieren wesentlich mehr Fibroblasten isolieren als aus gesunden Nieren (Müller und Rodemann 1991; Strutz et al. 2001 a), was für eine verstärkte Proliferation spricht.

Es existieren zahlreiche Stimuli, die zur Aktivierung eines Fibroblasten führen. Grundlage der Fibrosierung ist zunächst die infolge eines Gewebeschadens unterschiedlicher Ätiologie auftretende Entzündungsreaktion des Gewebes mit Infiltration durch Entzündungszellen, wie Lymphozyten und Makrophagen (Wang Y und Harris 2011; Zeisberg et al. 2001). Die Proteinurie infolge primär glomerulärer Schäden bei verschiedenen Glomerulonephritiden, der diabetischen Nephropathie und der Alport-Nephritis stellt eine entscheidende Ursache der tubulointerstitiellen Inflammation dar (Strutz 2009). Es kommt zur Freisetzung Fibroblasten stimulierender Proteine, wie u.a. TGF- β 1, PDGF, CTGF, tPA und FGF-2 (Alpers et al. 1993; Boor und Floege 2011; Border und Noble 1994; Hao et al. 2010; Qi et al. 2006; Strutz et al. 2000 b; Strutz et al. 2001 b). Daneben gibt es noch andere Aktivierungsmechanismen, z.B. durch direkten Zellkontakt mit Entzündungszellen, durch EZM-Integrin-Interaktion (α 1 und β 1) sowie durch Hypoxie oder Hyperglykämie (Bechtel und Zeisberg 2009; Qi et al. 2006).

Typischerweise bleibt der aktivierte Fibroblastenphänotyp erhalten, auch wenn der pathogenetische Reiz nicht mehr einwirkt, sodass es zu einer autonomen Proliferation aktivierter Fibroblasten kommt. Mögliche Ursachen sind die autokrine Stimulation durch

1 Einleitung

FGF-2 (Strutz et al. 2000 b; Strutz et al. 2002) und evtl. epigenetische Veränderungen (Bechtel et al. 2010), wie bereits in der Krebsforschung nachgewiesen wurde (Kalluri und Zeisberg 2006; Orimo et al. 2005).

Die Frage nach der Herkunft der aktivierten Fibroblasten ist ein kontrovers diskutiertes Thema. Bereits 1867 wurde von Cohnheim, der die Mechanismen der Entzündung untersuchte, angenommen, dass Fibroblasten, damals noch kontraktile zelluläre Elemente genannt, von Leukozyten abstammen (Cohnheim 1867). 1970 konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten lokaler Herkunft sind (Ross et al. 1970). Bisher nahm man an, dass Myofibroblasten das aktivierte Stadium nur der ursprünglichen interstitiellen Fibroblasten darstellen. Man konnte außerdem zeigen, dass die meisten tubulointerstitiellen Alpha-Glattmuskel-Aktin exprimierenden Zellen lokaler Herkunft sind (Faulkner et al. 2005). Andere Studien lassen vermuten, dass ein Teil der Myofibroblastenpopulation von Perizyten und glatten Muskelzellen abstammen (Duffield und Humphreys 2011; Wiggins et al. 1993). Des Weiteren entsteht ca. ein Drittel der Extrazellulärmatrix bildenden Zellen durch Epitheliale-Mesenchymale Transformation (Iwano et al. 2002). Außerdem konnte man nachweisen, dass ein Teil der Fibroblasten sowohl in der gesunden Niere als auch bei chronisch progredienter Niereninsuffizienz aus dem Knochenmark stammt (Grimm et al. 2001; Iwano et al. 2002; Wada et al. 2010). Es wurde gezeigt, dass aus dem Knochenmark stammende Fibroblasten bzw. mesenchymale Stammzellen z.T. auch reparative Effekte aufweisen (Poulsom et al. 2001; Togel et al. 2005), bzw. dass Myofibroblasten mit Ursprung aus dem Knochenmark nicht signifikant zur Kollagenproduktion in fibrotischen Nieren beitragen (Roufosse et al. 2006).

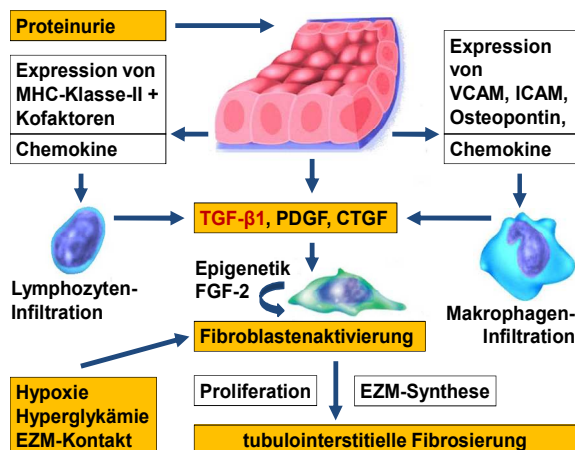


Abb. 5: Darstellung der Mechanismen, die zur Aktivierung der Fibroblasten führen und damit die tubulointerstitielle Fibrosierung verursachen (nach Strutz und Neilson 2003, S. 463 und 468).

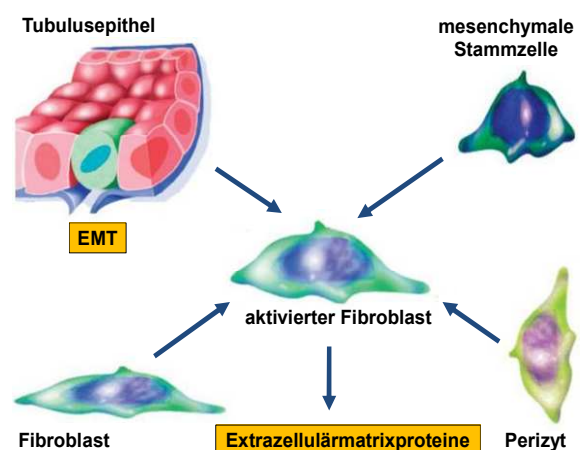


Abb. 6: Darstellung der Herkunft des aktivierten Fibroblasten in der fibrotischen Niere (nach Strutz und Müller 2006, S. 3369).

Diese Studien belegen, dass die für die Nierenfibrosierung verantwortlichen aktivierten Myofibroblasten von verschiedenen Zelltypen abstammen können. Neben der Aktivierung und

1 Einleitung

Proliferation der ursprünglichen Fibroblasten des Interstitiums konnten auch Perizyten, zirkulierende Stammzellen sowie die Epithelial-Mesenchymale Transformation von Tubulusepithelzellen als Ursprung der aktivierten Fibroblasten identifiziert werden, wobei die prozentuale Verteilung der jeweiligen Fibroblastenpopulation möglicherweise von der zugrundeliegenden Ätiologie des Krankheitsprozesses abhängig ist und die Frage nach der Herkunft der aktivierten Fibroblasten noch nicht vollständig geklärt ist (Kalluri und Zeisberg 2006), sodass weitere Untersuchungen notwendig sind.

In den letzten Jahren gelangte der Vorgang der EMT, der bereits intensiv in der Krebsforschung untersucht wird, zunehmend in den Focus der Fibroseforschung. Die Epithelial-Mesenchymale Transformation beschreibt die Umwandlung von Epithelzellen in Zellen, die einen mesenchymalen Phänotyp aufweisen, d.h. eine spindelförmige Morphologie und die Expression mesenchymaler Markerproteine (Iwano et al. 2002). Der Vorgang wurde bereits 1982 von Greenburg and Hay beschrieben (Greenburg und Hay 1982). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass EMT eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung von Karzinomen (Yang et al. 2004) sowie bei der Bildung des Mesoderms durch Gastrulation im Rahmen der Embryogenese spielt (Baum et al. 2008; Hay und Zuk 1995). Im Rahmen der Fibrogenese führt die EMT zur Umwandlung von Tubulusepithelzellen in Fibroblasten und konnte erstmalig durch die Klonierung des Fibroblast Specific Protein-1 (FSP-1) nachgewiesen werden (Strutz et al. 1995). Der immunhistochemische Nachweis FSP-1-positiver Tubulusepithelzellen gelang mittels transgener Mäuse nach unilateraler Ureterobstruktion als Tiermodell der chronisch progredienten Niereninsuffizienz (Iwano et al. 2002). Während der EMT kommt es zu einer allmählichen Veränderung des Phänotyps der Tubulusepithelzellen mit Verlust der apikobasalen Zellpolarität, mit Verlust der Expression von Adhäsionsmolekülen wie ZO-1 und E-Cadherin und mit beginnender Expression von mesenchymalen Markern, wie Vimentin, Alpha-Glattmuskelaktin und wie bereits beschrieben FSP-1. Dabei existieren vermutlich mehrere Zwischenstadien mit Co-Expression epithelialer und mesenchymaler Marker (Zeisberg und Kalluri 2004). Infolgedessen kann es möglicherweise zu einer Migration der Zelle durch die tubuläre Basalmembran in das Interstitium kommen. Die Expression von Alpha-Glattmuskelaktin in Tubulusepithelien wurde in einer Studie im Tiermodell der 5/6-Nephrektomie beschrieben, wobei sich eine Migration der Tubulusepithelzellen ins Interstitium auch elektronenmikroskopisch zeigte (Ng YY et al. 1998). Tubulusepithelzellen (außer den Epithelien der Sammelrohre) entstehen während der Embryonalentwicklung aus dem Mesenchym des Metanephrons durch Mesenchymal-Epitheliale Transformation, eine Tatsache, die die Fähigkeit dieser Zellen zur EMT unterstreicht, und daher die EMT möglicherweise die Umkehrung embryonaler Entwicklungsprogramme darstellt (Zeisberg und Kalluri 2004). Mittlerweile konnte EMT auch in zahlreichen anderen Organen und Geweben, wie z.B. der Schilddrüse, der Brustdrüse und

1 Einleitung

der Retina nachgewiesen werden (Hay und Zuk 1995). Je nach Ätiologie scheint der Vorgang der EMT mehr oder weniger Bedeutung für die Pathogenese der Nierenfibrose zu haben. In den mittels Proteinurie bzw. Angiotensin II induzierten Tiermodellen der renalen Fibrosierung fanden sich kein Nachweis der EMT bzw. keine Unterbrechung der tubulären Basalmembran (Faulkner et al. 2005; Ikeda et al. 2004). Im Gegensatz dazu leistet die EMT im Tiermodell der unilateralen Ureterobstruktion einen signifikanten Beitrag zur Progression der Nierenfibrosierung (Iwano et al. 2002; Yang et al. 2002), aber auch im Tiermodell der Nephritis, die durch nephrotoxisches Serum ausgelöst wird (Zeisberg et al. 2003 b). Bis vor einigen Jahren nahm man an, dass die Fibrosierung ein irreversibler Prozess sei, dessen Progredienz zwar verlangsamt, aber nicht gestoppt werden kann. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die renale Fibrosierung (Zeisberg et al. 2003 b) und auch die Leberfibrose (Battaller und Brenner 2005) reversibel sind. Einige Substanzen, wie z.B. Pentoxifyllin, IFN-gamma und Relaxin, sind imstande, die Fibroblastenaktivierung und deren Proliferation und Matrixsynthese (Heeg et al. 2005; Strutz et al. 2000 a) zu hemmen. Die EMT dagegen stellt einen ganz neuen Ansatzpunkt therapeutischer Strategien dar. Man konnte in der Zellkultur und im Tiermodell nachweisen, dass BMP-7, ein Morphogen der TGF- β 1-Superfamilie, die EMT und damit den Prozess der Fibrosierung gänzlich aufhalten bzw. sogar umkehren kann (Hruska et al. 2000; Zeisberg et al. 2003 a; Zeisberg et al. 2003 b). Ebenso konnte für HGF gezeigt werden, dass es die Fähigkeit besitzt, die EMT aufzuhalten und die Progression der Nierenfibrose im Tiermodell zu stoppen (Yang und Liu 2002).

1.4 Das lokale Angiotensinsystem der Niere

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System hat eine entscheidende Bedeutung für die Physiologie des menschlichen Organismus, da es eine zentrale Rolle bei der Blutdruckregulation und der Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes einnimmt. Renin ist eine Endopeptidase, die vom juxtaglomerulären Apparat der Glomeruli in der Niere exprimiert wird (Hackenthal et al. 1990) und das in der Leber gebildete Angiotensinogen zu dem Dekapeptid Angiotensin I umwandelt (Navar 1997). Angiotensin II ist ein aus acht Aminosäuren bestehendes Peptidhormon mit einem Molekulargewicht von 1046,19 Da und entsteht aus Angiotensin I durch enzymatische Spaltung mittels des in der Lunge gebildeten und zirkulierenden, aber auch auf den Endothelzellen der Gefäße exprimierten Angiotensin Converting Enzyme ACE (Cushman et al. 1971; Paul et al. 2006).

Es existieren verschiedene Typen von Angiotensin-II-Rezeptoren, von denen die AT₁- und AT₂-Rezeptoren bisher am besten untersucht wurden. Die blutdrucksteigernde Wirkung von Angiotensin II wird v.a. über AT₁-Rezeptoren vermittelt und umfasst neben der direkten Erhöhung des Blutgefäßtonus auch die verminderte Wasser- und Salzausscheidung durch

1 Einleitung

Vasokonstriktion der Vasa afferentia und efferentia der Glomeruli, durch direkte Regulation der tubulären Wasser- und Salzreabsorption und durch Stimulation der Aldosteron-Ausschüttung in der NNR (Kobori et al. 2007). Diese Signalwege macht man sich in der Behandlung der arteriellen Hypertonie, die Volkskrankheit Nr.1 der westlichen Industrienationen, zunutze. ACE-Hemmer führen zur verminderten Bildung von Angiotensin I und AT₁R-Antagonisten blockieren den Angiotensin-Rezeptor Typ 1 und hemmen so die blutdrucksteigernde Wirkung des Angiotensin II direkt.

Angiotensin II spielt neben der Blutdruckregulation eine wichtige Rolle in der lokalen Physiologie und Pathophysiologie verschiedener Organe (Paul et al. 2006). Neben der Synthese von Angiotensin I und II im Blutkreislauf können diese Peptide auch direkt in den einzelnen Geweben gebildet werden. Die Existenz eines lokalen Angiotensinsystems der Niere wird durch mehrere Studien belegt (Harris und Cheng 1996; Wolf und Neilson 1993), die u.a. zeigen, dass die Konzentration von Angiotensin II im Tubulus und Interstitium nicht allein durch die Konzentration von Angiotensin II im Blutplasma erklärbar ist (Ingert et al. 2002). Es wurde nachgewiesen, dass alle grundlegenden Bestandteile des Renin-Angiotensin-Systems, d.h. Angiotensinogen, Renin und ACE, von proximalen oder distalen Tubulusepithelzellen exprimiert werden, sich im Tubuluslumen sowie im Interstitium anreichern und daher eine lokale Bildung von Angiotensin II in der Niere ermöglichen (Ichihara et al. 2004; Kobori et al. 2007).

Angiotensin II besitzt in der Niere zahlreiche Effekte auf die einzelnen Zelltypen, einschließlich des Zellwachstums und -differenzierung, der Zellproliferation und der Apoptose, wodurch es einen entscheidenden Faktor in der Progredienz der tubulointerstitiellen Fibrose darstellt (Ruiz-Ortega et al. 2006). Im Rahmen der chronisch progredienten Niereninsuffizienz ist der AT₁-Rezeptor mit hauptverantwortlich für die pathophysiologischen Effekte von Angiotensin II. AT₁-Rezeptoren werden durch zahlreiche verschiedene Zelltypen in der Niere exprimiert, wobei in der fibrosierten Niere AT₁-Rezeptoren auch auf interstitiellen Fibroblasten zu finden sind (Okada et al. 2002). Neben Verstärkung der glomerulären Hypertension und Induktion einer tubulointerstitiellen Hypoxie durch Vasokonstriktion der renalen Blutgefäße werden über den AT₁-Rezeptor v.a. Zellproliferation, Inflammation und renale Fibrogenese durch die Stimulation profibrogener Faktoren wie z.B. TGF-β₁, PDGF und CTGF vermittelt (Mezzano et al. 2001; Ruiz-Ortega et al. 2006). Im Gegensatz dazu zeigt die Aktivierung des AT₂-Rezeptors gegenteilige Effekte, wie Vasodilatation, Wachstumshemmung und Apoptose, die im Rahmen der renalen Fibrogenese eher protektiv wirken (Fogo 2007; Henrion et al. 2001).

Obwohl in der Vergangenheit bereits immer wieder gezeigt wurde, dass die Inhibition des Angiotensinsystems durch ACE-Hemmer oder Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten eine deutliche Progressionsminderung der chronisch progredienten Niereninsuffizienz zur Folge

1 Einleitung

hat, ist nicht eindeutig belegt, ob ACE-Hemmer oder Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten oder sogar die Kombination aus beiden Substanzklassen einen stärkeren Benefit zeigen. Ein pharmakologischer Vorteil der ACE-Hemmer ist möglicherweise die stärkere Senkung der glomerulären Hypertension durch Bradykinin-vermittelte Dilatation der efferenten Arteriole, währenddessen AT₁R-Antagonisten spezifisch den AT₁-Rezeptor, nicht aber den AT₂-Rezeptor und dessen protektive Effekte blockieren und außerdem auch durch die Chymase gebildetes Angiotensin II kompetitiv hemmen (Fogo 2007; Hilgers und Mann 2002).

Trotz erwiesener effektiver Progressionsminderung der chronisch progredienten Niereninsuffizienz durch beide Substanzklassen zeigen tierexperimentelle Studien keinen Vorteil einer Kombinationstherapie aus ACE-Hemmern und AT₁-Rezeptor-Antagonisten (Ots et al. 1998). Auch Remuzzi et al. berichten keinen Unterschied bzgl. der Proteinurie und Retentionsparameter (Remuzzi et al. 1999), währenddessen andere klinische Studien entweder einen Vorteil der ACE-Hemmer (Lacourciere et al. 2000; Mogensen et al. 2000) oder der AT₁-Rezeptor-Antagonisten (Robles et al. 2009) aufzeigen.

Daher werden weitere Studien benötigt, um zu klären welche der beiden Substanzklassen in der Behandlung der chronisch progredienten Niereninsuffizienz, möglicherweise auch abhängig von der jeweiligen Ätiologie und Pathogenese, Vorteile gegenüber der anderen zeigt und daher vorrangig indiziert ist. Gross et al. zeigen, dass für das Alport-Syndrom ACE-Hemmer eine deutlich stärkere Progressionsminderung der interstitiellen Fibrose zur Folge haben (Gross et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, ob sich dieses Ergebnis mit anderen Substanzen der jeweiligen Wirkstoffklassen wiederholen lässt.

1.5 Bone Morphogenetic Protein-7 und der BMP-Signalweg

Das Bone Morphogenetic Protein-7, kurz BMP-7, ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 35 kDa und gehört der TGF- β -Superfamilie an. Deren Familienmitglieder steuern eine Reihe zellulärer Prozesse, u.a. den Zellzyklus, die Zelldifferenzierung, die Reproduktion, die Zellmotilität, die Zelladhäsion, das Nervenwachstum, das Knochenwachstum, Wundheilungsprozesse und die Immunantwort (Attisano und Wrana 2002; Chang et al. 2002; Hogan 1996; Kingsley 1994; Massague 2000). Das erste namensgebende Mitglied TGF- β 1 wurde bereits in den frühen 80er Jahren entdeckt (Roberts et al. 1981; Roberts et al. 1980; Sporn et al. 1986) und spielt eine physiologische Rolle bei der Wundheilung und eine pathologische Rolle bei der Fibrosierung verschiedener Organe, indem es Fibroblasten aktiviert und zur Bildung interstitieller Matrixbestandteile wie v.a. Kollagen führt (Border und Noble 1994).

Die Existenz der Bone Morphogenetic Proteins als Knorpel- und Knochenwachstum auslösende Proteine wurde schon in den 1960er Jahren vermutet. Eine genaue

1 Einleitung

Beschreibung der eigentlichen Proteine gelang allerdings erst in den 80er Jahren (Wozney et al. 1988). Bisher wurden mehr als 15 Bone Morphogenetic Proteins, unterteilt in mehrere Untergruppen, bei Säugetieren entdeckt. Dazu zählen u.a. die Untergruppen BMP-2/4 mit BMP-2 und BMP-4, die Untergruppe OP-1 mit BMP-5, BMP-6, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (OP-2) und die Untergruppe GDF-5 mit GDF-5, GDF-6 (BMP-13) und GDF-7 (BMP-12) (Kawabata et al. 1998). Neben dem Einfluss auf die Knochen- und Knorpelentwicklung spielen die meisten BMPs eine wichtige Rolle in der frühen Embryonalentwicklung und ein Knockout verläuft, wie bei BMP-2 und -4, schon im Embryonalstadium letal (Kawabata et al. 1998).

Es sind drei BMP-Typ-I-Rezeptoren ALK-2 (ActRI), ALK-3 (BMPRIA) und ALK-6 (BMPRII) und drei BMP-Typ-II-Rezeptoren BMPRII, ActRII und ActRIIB für die BMP-Signalkaskade beschrieben, wobei der BMP-7-Signalweg über den ALK-3- oder den ALK-6-Rezeptor verläuft (Kawabata et al. 1998; ten Dijke et al. 1994). Während die BMPRII-Expression konstitutiv erfolgt, werden die Typ-I-Rezeptoren vermutlich reguliert exprimiert (Bosukonda et al. 2000; Zeisberg 2006). BMP- bzw. TGF- β -Rezeptoren sind Serin-Threonin-Kinasen, die ohne Ligandenbindung als Homodimere vorliegen. Nach Liganden-Bindung bilden sie einen heterotetrameren Komplex aus zwei Typ-I- und zwei Typ-II-Proteinen, wobei der Typ-I-Rezeptor die Ligandenspezifität determiniert (Moustakas et al. 1993; Shi und Massague 2003; Yamashita et al. 1994). Anschließend phosphoryliert die konstitutiv aktive Serin-Threonin-Kinase-Domäne im Typ-II-Rezeptor die Glycin-Serin-Domäne im Typ-I-Rezeptor (Wrana et al. 1994). Intrazellulär erfolgt die Weiterleitung der Signale über die Phosphorylierung der Smad-Proteine wie in Abb. 7 (S. 16) dargestellt. (Baker und Harland 1997; Heldin et al. 1997). Die Smad-Familie besteht aus drei Unterfamilien, den durch Rezeptoren regulierten Smads oder kurz R-Smads Smad1, 2, 3 und 5, dem Common-Partner-Smad oder kurz Co-Smad Smad4 und den inhibitorischen Smads oder kurz I-Smads Smad6 und 7 (Attisano und Wrana 2002).

BMP-7, auch Osteogenic Protein-1 genannt, ist eines der BMPs, das eine deutliche Stimulation der Knochenbildung aufweist (Knutsen et al. 1993; Ozkaynak et al. 1990). Daneben spielt BMP-7 auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Niere und der Augen. Während der embryonalen Nephrogenese induziert BMP-7 die Transformation von metanephrischem Mesenchym zu Epithel und ist dadurch an der Bildung von Glomeruli und Tubuli beteiligt (Hogan 1996). Eine homozygote Deletion in Mäusen resultiert in Mikrophthalmie, Polydactylie, Hypomineralisation und schwerer renaler Dysplasie (Dudley et al. 1995; Luo et al. 1995). In adulten Nieren wird BMP-7 v.a. in tubulären Epithelzellen und Podozyten exprimiert (Gould et al. 2002; Wang SN et al. 2001).

BMP-7 ist imstande, in der Zellkultur sowie im Tiermodell EMT und die Progression der renalen Fibrosierung zu verhindern, bzw. den Prozess der TGF- β 1-vermittelten EMT und Fibrosierung sogar umzukehren (Wang S et al. 2003; Zeisberg et al. 2003 a; Zeisberg et al.

1 Einleitung

2003 b), indem es die Expression des EMT-Proteoms antagonisiert. Das EMT-Proteom ist gekennzeichnet durch die vermehrte Expression bestimmter für Zellmotilität wichtiger Proteine wie z.B. FSP-1, Alpha-Glattmuskelaktin. Außerdem kommt es zur Induktion der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und -9, welche Bestandteile der Basalmembran spalten können und zur Induktion Fibroblasten stimulierender Zytokine, wie TGF- β 1 selbst und FGF-1, -2, -8. Dagegen werden Proteine wie E-Cadherin und ZO-1, die für die Homöostase und Stabilität des tubulären Epithelverbands durch Bildung von Tight Junctions und Adherens Junctions notwendig sind, vermindert exprimiert (Kalluri und Neilson 2003). TGF- β 1 führt zur Expression des EMT-Proteoms über die Bereitstellung bestimmter Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Snail oder Slug (Kalluri und Neilson 2003). BMP-7 führt über den Smad-abhängigen Signalweg direkt zur Induktion bestimmter Zielgene, wie E-Cadherin, die durch TGF- β 1 inhibiert werden (Zeisberg et al. 2003 b). Zu den gemeinsamen Downstream-Genen zählen auch die Id-Protein codierenden Gene (Ruzinova und Benezra 2003). BMP-7 ist in der Lage, die Kollagenexpression in Myofibroblasten durch die Induktion von Id-2 und -3, zu reprimieren (Izumi et al. 2006). Ein weiterer Mechanismus der Antagonisierung erfolgt über kompetitive Nutzung des Co-Smads Smad4 (Weiskirchen und Meurer 2007). Außerdem hemmt Trps1, ein durch BMP-7 induziertes Protein, den Arkadia-vermittelten Abbau von Smad7 und führt dadurch zur Hemmung des TGF- β 1-Smad3-Signalwegs (Gai et al. 2010; Gai et al. 2009).

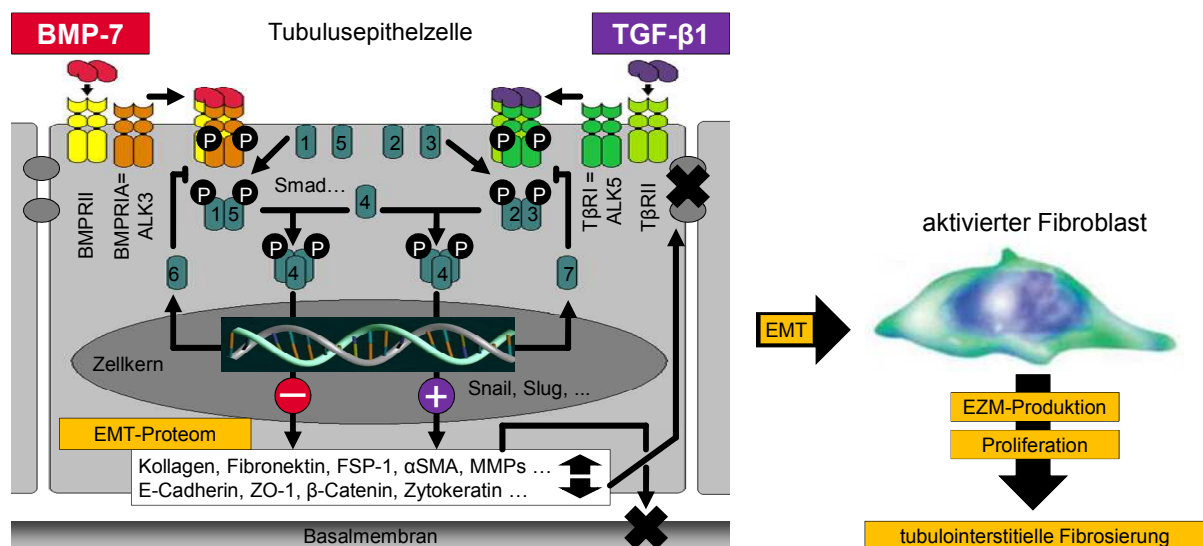


Abb. 7: Schema der antagonistischen Effekte von TGF- β 1 und BMP-7 auf die Tubulusepithelzelle: BMP-7 und TGF- β 1 stabilisieren den heterotetrameren Komplex der Typ-I- und -II-Rezeptoren. Der heterooligomere BMP-Rezeptor-Komplex phosphoryliert die R-Smads Smad1 und 5, der TGF- β 1-Rezeptor-Komplex dagegen die R-Smads Smad2 und 3. Die aktivierten R-Smads bilden mit dem Co-Smad Smad4 einen heterotrimeren Komplex. Im Zellkern bindet der heterotrimer Komplex zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren an die Promotoren von TGF- β 1- bzw. BMP-7-Zielgenen (Weiskirchen und Meurer 2007). Beide Signalwege antagonisieren einander, u.a. durch die Induktion bestimmter Zielgene und die kompetitive Nutzung von Co-Smad Smad4. BMP-7 und TGF- β 1 zeigen unterschiedliche Effekte auf die Expression von Kollagen. Außerdem antagonisiert BMP-7 die TGF- β 1-vermittelte Expression des EMT-Proteoms und ist dadurch in der Lage, die Entstehung von aktivierten Fibroblasten zu verhindern (Kalluri und Neilson 2003).

1.6 PAI-1, uPAR und das Plasminogen-Plasmin-System im Rahmen der renalen Fibrosierung

Ursache der renalen Fibrosierung ist neben der vermehrten Produktion interstitieller Matrix auch der verminderte Abbau derselben (Schnaper 1995). Der Abbau der extrazellulären Matrix wird u.a. vom Plasminogenaktivator-Plasminogen-Plasmin-System reguliert, denn Plasmin ist direkt an der Degradierung von interstitiellen Matrixproteinen wie Fibronectin, Laminin, Proteoglykanen und Kollagen Typ IV beteiligt und indirekt über die Aktivierung der Matrixmetalloproteinasen, die ihrerseits Kollagen degradieren (Eddy 2002; He et al. 1989; Ramos-DeSimone et al. 1999).

Ursprünglich wurde Plasmin im Rahmen der Blutgerinnung beschrieben, da es eine wichtige Rolle bei der Fibrinolyse spielt (Kane 1984). Plasmin entsteht als Produkt der proteolytischen Spaltung von aus der Leber stammendem Plasminogen durch Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) oder Tissue-type Plasminogen Activator (tPA). Aktives Plasmin spaltet Fibrin und führt dadurch zur Auflösung und zum Abbau von Thromben. Dabei bindet tPA zunächst an Fibrin, wodurch es selbst aktiviert wird und daraufhin Plasminogen aktivieren kann. Im Gegensatz zu tPA ist die Affinität von uPA zu Fibrin deutlich geringer, daher kann tPA als Initiator der Fibrinolyse angesehen werden (Loscalzo und Braunwald 1988).

Da aktiver Urokinase-type Plasminogen Activator neben Plasminogen auch Bestandteile der Extrazellulärmatrix, wie z.B. Fibronectin (Gold et al. 1989), direkt proteolytisch umsetzen kann und im Vergleich zu tPA vermehrt extravaskulär exprimiert wird, v.a. auch im Nierenparenchym durch Fibroblasten und inflammatorische Zellen (Eddy 2002), spielt uPA im Vergleich zu tPA vermutlich eine größere Rolle bei der Initiierung des Abbaus interstitieller Matrix durch das Plasminogen-Plasmin-System. Urokinase-type Plasminogen Activator wird von verschiedenen Zellen als inaktiver pro-uPA autokrin oder parakrin sezerniert und bindet anschließend an den uPA-Rezeptor. Die proteolytische Spaltung zu aktivem uPA kann durch Plasmin erfolgen (Kasai et al. 1985), wobei Plasmin eine höhere Affinität zu Rezeptor-gebundenem uPA aufweist als zu uPA in Lösung (Blasi 1993). Der uPA-Rezeptor (uPAR) auf der Zelloberfläche kann sowohl inaktives als auch aktives uPA binden und dadurch die perizelluläre Degradation von extrazellulärer Matrix initiieren (Blasi 1993; Blasi et al. 1987).

Die Bedeutung des uPA-uPAR-Komplexes wurde in den letzten Jahren v.a. im Rahmen der Metastasierung verschiedener maligner Tumore untersucht. Dabei spielt neben der Initiierung der perizellulären Proteolyse zur Lösung einzelner Zellen aus dem Tumorgewebe und der Vermittlung der für die Zellmigration essentiellen Zelladhäsion unter Beteiligung von Integrinen auch die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege, die ebenfalls die Zelladhäsion und Zellmigration entscheidend beeinflussen, durch uPAR eine wichtige Rolle (Dear und Medcalf 1998). Des Weiteren kann der uPA-uPAR-Komplex eine Metastasierung durch EMT begünstigen. Für uPAR und uPA konnte eine Beteiligung an der durch Hypoxie

1 Einleitung

induzierten EMT metastasierender Brustkrebszellen nachgewiesen werden. Außerdem löst die uPAR-Überexpression eine EMT auch unter normoxischen Bedingungen aus (Jo et al. 2009; Lester et al. 2007). Im Rahmen der renalen Fibrosierung wurde gezeigt, dass tPA Plasmin-unabhängig an der EMT beteiligt ist durch Induktion der Basalmembran spaltenden MMP-9 und dadurch profibrogene Effekte im Tiermodell der UUO aufweist (Yang et al. 2002). Des Weiteren stellt tPA ein potentes Mitogen für interstitielle Fibroblasten dar (Hao et al. 2010). Trotz der dargestellten Bedeutung für EMT und Zellmigration scheint uPAR aufgrund der Fähigkeit zur Initiierung der Degradation extrazellulärer Matrix durch Plasmin antifibrotisch zu wirken, da die uPAR-Defizienz die renale Fibrosierung im Tiermodell beschleunigt (Zhang et al. 2003 a).

Sowohl uPA als auch tPA werden durch Bildung eines enzymatisch inaktiven 1:1-Komplexes mit dem Plasminogen Activator Inhibitor-1 PAI-1 effektiv gehemmt, der auf diesem Weg die Aktivität Plasmins kontrolliert (Irigoyen et al. 1999). PAI-1 ist ein Protein der SERPIN-Familie (SERine Protease INhibitor) mit einem Molekulargewicht von 50 kDa, das Anfang der 80er Jahre entdeckt wurde (Loskutoff und Edgington 1981). Aktives PAI-1 hat eine relativ kurze Halbwertszeit und eine starke Tendenz eine stabilere Konformation anzunehmen, wodurch es seine inhibitorische Funktion verliert (Hekman und Loskutoff 1985; Mottonen et al. 1992). Diese Konformationsänderung wird durch die Bindung von PAI-1 an Vitronectin, ein 70-kDa-Glykoprotein, das sowohl im Plasma als auch in der Extrazellulärmatrix vorkommt, verlangsamt. PAI-1 wird dadurch stabilisiert und in Bereichen mit ausgeprägter Extrazellulärmatrix angereichert, wobei dort der uPA-uPAR-vermittelte Abbau derselben inhibiert wird (Seiffert und Loskutoff 1991; Zhou et al. 2003).

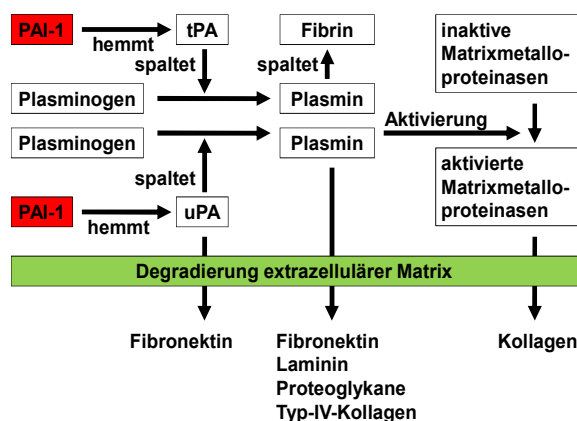


Abb. 8: Schema des Plasminogen-Plasmin-Systems und dessen Substrate sowie der Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen durch Plasmin (nach Huang Y und Noble 2007, S. 1008).

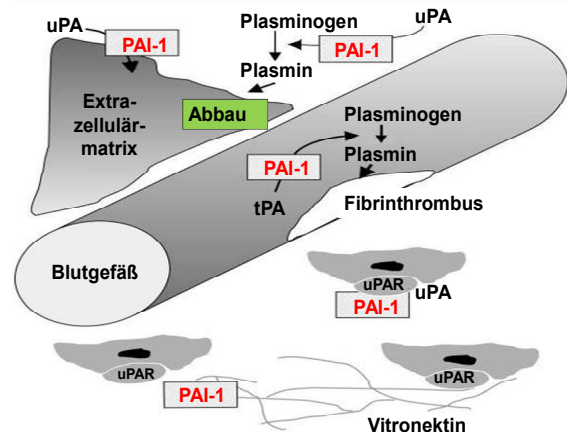


Abb. 9: Intravasaler Thrombenabbau und interstitieller Abbau der EZM durch das Plasminogen-Plasmin-System. PAI-1 und uPAR konkurrieren um die Bindung an Vitronectin (nach Eddy 2002, S. F210).

1 Einleitung

Neben der Bedeutung von PAI-1 als Inhibitor der Fibrinolyse gewann man in den letzten Jahren zunehmend Einblick in die Rolle, die PAI-1 in der Pathogenese verschiedener Nierenerkrankungen spielt. In der gesunden Niere ist PAI-1 normalerweise nicht nachweisbar, wohingegen zahlreiche chronische Nierenerkrankungen, v.a. solche die durch Akkumulation extrazellulärer Matrix charakterisiert sind, mit erhöhter PAI-1-Expression im Nierengewebe einhergehen (Eddy und Fogo 2006). Dazu zählen u.a. die Diabetische Nephropathie (Pauksakon et al. 2002), die IgA-Nephropathie sowie verschiedene Glomerulonephritiden und die Fokal-Segmentale Glomerulosklerose (Hamano et al. 2002). Des Weiteren kommt es zu einem Anstieg der PAI-1-Level im Plasma im Sinne eines Akute-Phase-Proteins als Antwort auf Stressreaktionen des Organismus, u.a. bei akutem Nierenversagen verschiedener Genese (Eddy und Fogo 2006). Es zeigte sich, dass die PAI-1-Konzentration im Plasma beim Hämolytisch-Urämischem Syndrom schon vor der Einschränkung der Niereninsuffizienz ansteigt (Chandler et al. 2002) und mit der Schwere des Krankheitsverlaufs und dem Outcome korreliert (Bergstein et al. 1992; Chant et al. 1994). Bei der chronischen Niereninsuffizienz fand man ebenfalls erhöhte Plasma-PAI-1-Konzentrationen, wodurch sich möglicherweise die vaskulären Komplikationen dieser Patientengruppe erklären ließen (Eddy und Fogo 2006; Vaughan 2005). Zahlreiche tierexperimentelle Daten unterstreichen einen profibrogenen Effekt von PAI-1, wobei eine PAI-1-Defizienz die renale Fibrosierung im Tierexperiment hemmt (Oda et al. 2001), dagegen eine PAI-1-Überexpression zu einer verstärkten renalen Fibrosierung im Tiermodell führt (Matsuo et al. 2005).

Neben den Protease-inhibitorischen Effekten auf das Plasminogen-Plasmin-System besitzt PAI-1 zusätzlich uPA-Rezeptor-abhängige Effekte, die u.a. die Zelladhäsion und -migration beeinflussen und dadurch eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen, bei der Wundheilung, bei der Angiogenese, aber auch bei der Tumormetastasierung spielen (Eddy 2002). PAI-1 konkurriert mit uPAR um die Bindung an eine Domäne am NH₂-Terminus von Vitronektin nahe einer Integrin-Bindungsdomäne, wobei PAI-1 eine wesentlich höhere Affinität als uPAR zu Vitronektin besitzt und dadurch die uPAR- und die Integrin-Vitronektin-vermittelte Zelladhäsion und -migration unterbinden kann (Deng et al. 2001). Des Weiteren bildet PAI-1 einen Komplex mit Integrin, uPA, uPAR und LRP, der anschließend endozytiert wird (Olson et al. 1992). Da dieser Prozess zur Clearance von PAI-1 führt, stellt er einen weiteren möglichen Mechanismus der antifibrotischen Wirkung von uPAR dar (Zhang et al. 2003 b). Gleichzeitig führt die Ausbildung dieses Komplexes zur Ablösung der Integrine von der Extrazellulärmatrix (Czekay et al. 2003). Dieser Effekt, die Protease-inhibitorischen Effekte von PAI-1 und In-vitro-Studien suggerieren einen antimigratorischen Effekt von PAI-1 (Kjoller et al. 1997). Allerdings sprechen Studien, welche belegen, dass Tumore mit einer ausgeprägten Metastasierungstendenz mit erhöhter PAI-1-Expression einhergehen

1 Einleitung

(Andreasen et al. 1997) und dass PAI-1-defiziente Mäuse im Tierexperiment eine geringere Metastasierung aufweisen (Bajou et al. 1998), deutlich für eine Förderung der Zellmigration durch PAI-1. Die Ursachen der promigratorischen Effekte von PAI-1 sind noch nicht eindeutig geklärt. Einerseits werden durch Unterbrechung der Integrin-Vitronektin-Interaktion evtl. Interaktionen zwischen Integrinen und Fibronektin möglich, die eine Fibroblastenmigration und die damit verbundene Fibrosierung verstärken (Eddy und Fogo 2006), andererseits stellt die Zellmigration ein komplexes Zusammenspiel von Zelladhäsion und durch PAI-1 begünstigte Zelldeadhäsion dar. Außerdem werden PAI-1 und uPA nach der Endozytose des PAI-1-uPA-uPAR-Komplexes abgebaut, während uPAR recycled wird und dadurch an einer anderen Stelle der Zellmembran erneut die Integrin-vermittelte Zellmigration und nach Bindung von uPA erneut die perizelluläre Proteolyse der EZM initiieren und die Zellmigration vorantreiben kann (Blasi 1993). Des Weiteren wird eine verstärkte Angiogenese als Ursache der promigratorischen Effekte des PAI-1 postuliert (Eddy 2002).

Aufgrund der profibrotischen Effekte von PAI-1 stellt dieses Molekül möglicherweise einen neuen medikamentösen Ansatzpunkt in der Behandlung und evtl. Umkehrung der durch tubulointerstitielle Fibrose gekennzeichneten terminalen Niereninsuffizienz dar. Daher sollte die genaue Wirkung des PAI-1 in der Pathogenese der Nierenfibrosierung weiter intensiv untersucht werden. Um die Bedeutung der Plasminogenaktivatoren bzw. deren Rezeptoren, v.a. des uPAR, und Co-Rezeptoren zu klären, werden ebenfalls noch weitere Studien benötigt, da Knockout-Studien sowie die Beteiligung dieser Moleküle an der Degradation extrazellulärer Matrix einerseits und an der EMT andererseits sowohl antifibrotische als auch profibrotische Effekte im Rahmen der renalen Fibrosierung aufzeigen.

1.7 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

- (1) Zeigen andere Wirksubstanzen aus den Substanzklassen der ACE-Hemmer bzw. der Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten ebenfalls eine deutliche Progressionsminderung der chronisch progredienten Niereninsuffizienz im Rahmen einer Alport-Nephritis, wie für Ramipril bzw. Candesartan bereits gezeigt werden konnte, mit stärkerer nephroprotektiver Wirkung des ACE-Hemmers im Vergleich zum AT₁-Rezeptor-Antagonisten?
- (2) Welche Rolle spielt die Expression des Bone Morphogenetic Protein-7 im Rahmen der Alport-Nephritis, bzw. wie verhält sich die Expression dieses Proteins unter Medikation mittels ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Antagonisten?
- (3) Welche Rolle spielen Faktoren des Plasminogen-Plasmin-Systems im Rahmen der Fibrosierung bei der Alport-Nephritis und wie verhält sich die Expression dieser Proteine unter Medikation mittels ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Antagonisten?

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die nephroprotektive Wirkung von Enalapril mit Irbesartan verglichen werden und die Progredienz der chronischen Niereninsuffizienz hinsichtlich der Retentionsparameter Kreatinin und Harnstoff-N im Serum, der Entwicklung einer tubulointerstitiellen Fibrose und der Proliferation beurteilt werden. Des Weiteren sollte die Expression der Proteine BMP-7 und dessen Rezeptor BMPRIA oder ALK-3 sowie PAI-1 und uPAR mittels RT-PCR und Immunhistochemie bzw. Immunfluoreszenz untersucht werden.

Der Einsatz von AT₁R-Antagonisten ist ein wichtiger Bestandteil bei der Behandlung der chronisch-progredienten Niereninsuffizienz, allerdings ist wenig bekannt über den Einfluss der Blockade des Renin-Angiotensin-Systems auf das Plasminogen-Plasmin-System. Daher untersuchten wir die Effekte des ACE-Hemmers Enalapril und des AT₁RA Irbesartan auf PAI-1 und uPAR im Tiermodell der Kollagen-4A3-defizienten Mäuse (COL4A3^{-/-}).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Produkt	Firma
4-(Dimethylamino)-Benzaldehyd	Roth, Karlsruhe
Antibody Diluent, Dako REAL™	Dako, Glostrup, Dänemark
AEC Substrate-Chromogen	Dako, Glostrup, Dänemark
Antigen Unmasking Solution	Linaris, Wertheim-Bettingen
BCIP-Chromogen	Boehringer, Mannheim
Bovines Serumalbumin	PAA Labs, Pasching, Österreich
Chloramin-T-Trihydrat	Roth, Karlsruhe
Citrat-Puffer: Target Retrieval Solution (10x)	Dako, Glostrup, Dänemark
DAB-Chromogen	Dako, Glostrup, Dänemark
DAB-Substrat-Puffer	Dako, Glostrup, Dänemark
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
DNA Ladder 100 bp	BioKit, Toufen, Taiwan
DNA Loading Dye 6x	BioKit, Toufen, Taiwan
dNTP Mix 10 mM	Invitrogen, Carlsbad, CA USA
DTT 0.1 M	Invitrogen, Carlsbad, CA USA
EDTA	Sigma, Steinheim
Eindeckmedium: Immu-Mount	Thermo, Pittsburgh, PA USA
Essigsäure 100 % (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck, Darmstadt
Ethanol 99 % (C ₂ H ₅ OH)	Chemie-Vertrieb, Hannover
Ethanol ≥ 99,9 % (C ₂ H ₅ OH)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
First Strand-Puffer 5x	Invitrogen, Carlsbad, CA USA
Formaldehyd (CH ₂ O)	Roth, Karlsruhe
HistoGreen-Chromogen	Linaris, Wertheim-Bettingen
HistoGreen-Puffer	Linaris, Wertheim-Bettingen
HistoGreen-H ₂ O ₂	Linaris, Wertheim-Bettingen
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung	Roth, Karlsruhe
L-4-Hydroxy-Prolin	Roth, Karlsruhe

2 Material und Methoden

Levamisol	Sigma, Steinheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) 50 mM	Invitrogen, Carlsbad, CA USA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methylgrün	Sigma, Steinheim
Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
n-Propanol (C ₃ H ₇ OH)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat-Trihydrat (Na(CH ₃ COO)·3H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
NBT-Chromogen	Boehringer, Mannheim
Nuclease-Free Water	Ambion, Austin, TX USA
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Invitrogen, Carlsbad, CA USA
PCR Buffer 10x	Invitrogen, Carlsbad, CA USA
Pikrinsäure	Sigma, Steinheim
Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, CA USA
Proteinase K	Sigma, Steinheim
Reverse Transkriptase: SuperScript™ II	Invitrogen, Carlsbad, CA USA
Ribonuklease-Inhibitor: RNaseOUT™	Invitrogen, Carlsbad, CA USA
Ribonuklease: RNase H	Invitrogen, Carlsbad, CA USA
RLT-Puffer: RNeasy® Lysis Buffer	Qiagen, Hilden
RNase Zap®	Ambion, Austin, TX USA
ROX Passive Reference Dye	Bio-Rad, München
Salzsäure (HCl) 37 %	Merck, Darmstadt
Sirius Red: Direct Red 80	Sigma, Steinheim
SYBR® Green Supermix	Bio-Rad, München
Tris	Roth, Karlsruhe
Vitro-Clud®	R. Langenbrinck, Teningen
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 %	Merck, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe
Citronensäure-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Agarose	Fisher Scientific, Schwerte

2 Material und Methoden

2.1.2 Selbst angesetzte Puffer und Lösungen

Tab. 1: Selbst angesetzte Puffer und Lösungen

Puffer / Lösungen	Inhalt	Lösungsmittel
Acetat-Citrat-Puffer	60 g Natriumacetat-Trihydrat 23 g Citronensäure-Monohydrat 6 ml Essigsäure 100 % 17 g Natriumhydroxid	ad 500 ml mit Aqua bidest pH 6,5 eingestellt
Agarose-Gel 1,5 %	1,8 g Agarose	in 120 ml TAE-Puffer (1x) aufkochen + 3 µl Ethidiumbromid 0,02 %
BSA-Lösung 2 %	1 g Bovines Serum Albumin	in 50 ml PBS-Tween20
Chloramin-T-Reagenz	0,635 g Chloramin-T-Trihydrat 10 ml n-Propanol 50 %	ad 50 ml mit Acetat-Citrat-Puffer
DAB-Lösung	20 µl DAB-Chromogen	in 1 ml DAB-Substrat-Puffer
Ehrlich´s Reagenz	7,5 g 4-(Dimethylamino)-Benzaldehyd	in 50 ml n-Propanol / HCl 37 % (1:1)
Essigsäure 0,1 N	5,7 ml Essigsäure 100 %	ad 1 l mit Aqua bidest
Ethanol 70 %	35 ml Ethanol ≥ 99.9 %	dd 50 ml mit Aqua bidest
Formaldehyd 4 %	110 ml Formaldehyd 37 % 6,5 g Di-Natriumhydrogenphosphat 4,0 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	ad 1 l mit Aqua bidest
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris + 18,6 g EDTA 57,1 ml Essigsäure 100 %	ad 1 l mit Aqua bidest pH 8,4 eingestellt
TAE-Puffer (1x)	20 ml TAE (50x)	ad 1 l mit Aqua bidest
HCl 0,01 N	830 µl HCl 37 %	in 1 l Aqua bidest
HistoGreen-Gebrauchslösung	2 Tropfen HistoGreen-Chromogen 2 Tropfen HistoGreen-H ₂ O ₂	in 1 ml HistoGreen-Puffer
Hydroxy-Prolin-Stocklösung c = 0,01 mg/ml	10 mg L-4-Hydroxy-Prolin	in 10 ml Aqua bidest, davon 10 µl ad 1 ml mit Acetat-Citrat-Puffer
Lysis-Puffer	10 µl Mercaptoethanol	ad 1 ml mit RLT-Puffer
Methylgrün-Lösung	20 g Methylgrün	in 755 ml Essigsäure 0,1 N + 265 ml Natriumacetat 0,1 N pH 4,2 eingestellt und gefiltert

2 Material und Methoden

Natriumacetat 0,1 N	6,8 g Natriumacetat-Trihydrat	ad 500 ml mit Aqua bidest
NBT-BCIP-Lösung	450 µl NBT 350 µl BCIP 50 mg Levamisol	in 100 ml NBT-BCIP-Substrat-Puffer
NBT-BCIP-Substrat-Puffer	12,1 g Tris 5,84 g Natriumchlorid 10,17 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat	ad 1 l Aqua bidest pH 9,5 eingestellt
n-Propanol 50%	5 ml n-Propanol	ad 10 ml mit Aqua bidest
PBS (10x)	80,0 g Natriumchlorid 14,5 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 2,0 g Kaliumchlorid 2,0 g Kaliumdihydrogenphosphat	ad 1 l mit Aqua bidest pH 7,4 eingestellt
PBS (1x)	200 ml PBS (10x)	ad 2 l mit Aqua bidest
PBS-Tween20 0,01 %	200 µl Tween 20	in 2 l PBS (1x)
Pikrosiriusrot-Lösung 0,01 %	0,1 g Sirius Red	in 100 ml kalter Pikrinsäure-Lösung, pH 2,0 eingestellt
TBS (10x)	121 g Tris 175 g NaCl	ad 2 l mit Aqua bidest pH 7,5 eingestellt
TBS (1x)	200 ml PBS (10x)	ad 2 l mit Aqua bidest
TBS 0,01 % Tween20	200 µl Tween 20	in 2 l TBS (1x)

2.1.3 Primär-Antikörper

Tab. 2: Primär-Antikörper

Epitop	Spezies	Firma
PCNA	Maus	Invitrogen, Carlsbad, CA USA
αSMA	Maus	Dako, Glostrup, DK
BMP-7	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA USA
PAI1	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA USA
AQP1	Kaninchen	Alpha Diagnostic, San Antonio, TX USA
AQP2	Kaninchen	CalBiochem, San Diego, CA USA
S100A4	Kaninchen	Dako, Glostrup, DK

2 Material und Methoden

2.1.4 Sekundär-Antikörper

Tab. 3: Sekundär-Antikörper

Epitop	Spezies	Konjugat	Firma
IgG-Maus	Ziege	Biotin	Vector, Burlingame, CA USA
IgG-Kaninchen	Ziege	Biotin	Vector, Burlingame, CA USA
IgG-Maus	Kaninchen	HRP	Dako, Glostrup, DK
IgG-Ziege	Kaninchen	Alkal. Phosphatase	Chemicon, Temecula, CA USA
IgG-Kaninchen	Ziege	Alexa Fluor® 488	Molecular Probes, Eugene, OR USA
IgG-Maus	Ziege	Alexa Fluor® 555	Molecular Probes, Eugene, OR USA

2.1.5 Oligonukleotid-Primer

Tab. 4: Oligonukleotid-Primer

Primer		Sequenz 5' → 3'	Tm	Fragmentlänge
Oligonukleotid-Primer für RT-PCR von Primer Design, Southampton, GB:				
mCOL1A1	for	TCG TGG CTT CTC TGG TCT C	56,4 °C	141 bp
	rev	CCG TTG AGT CCG TCT TTG C	56,9 °C	
Oligonukleotid-Primer für RT-PCR von Eurofins MWG Operon, Ebersberg:				
mGAPDH	for	GCC TCC CGT GTT CCT ACC	60,5 °C	101 bp
	rev	GCC TGC TTC ACC ACC TCC	60,5 °C	
mBMP-7	for	CTG ACG CCG ACA TGG TCA T	58,8 °C	75 bp
	rev	GGT GGT ATC GAG GGT GGA AGA	61,8 °C	
mPAI-1	for	TTC ATC GCT GCA CCC TTT G	56,7 °C	75 bp
	rev	TCT GAT GAG TTC AGC ATC CAA GA	58,9 °C	
muPAR	for	CCA TAG CAA CCA GAC CTT TCA CTT	61,0 °C	94 bp
	rev	ATT CGG TGG AAA GCT CTG AAG	58,4 °C	
mALK-3	for	GGA CAT GCG TGA GGT TGT GT	59,4 °C	65 bp
	rev	CGC TGT TCC AGC GGT TAG AC	61,4 °C	
Oligonukleotid-Primer für das Genotyping von Invitrogen, Carlsbad, CA USA:				
COL4A3	for	CCA GGC TTA AAG GGA AAT CC	58,4 °C	926 bp
	rev	CCT GCT AAT ATA GGG TTC GAG A	60,1 °C	
COL4A3neo-muta		ATT CGC CAA TGA CAA GAC G	55,0 °C	länger

2 Material und Methoden

2.1.6 Multikomponentensysteme

Produkt	Firma
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Vectastain ABC-Kit Elite Standard	Vector, Burlingame, CA USA

2.1.7 Gebrauchswaren

Produkt	Firma
Einbettkassetten	Kabe-Labortechnik, Nümbrecht
Einmalhandschuhe	Hartmann, Heidenheim
Einmalskalpelle: Techno Cut	HMD Healthcare, Horsham, GB
Dako Pen	Dako, Glostrup, DK
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Kunststoff-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Kunststoff-Petrischalen	Roth, Karlsruhe
Laborgeschirr	Roth, Karlsruhe
Objektträger Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pipetten verschiedener Größen	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Pipettenspitzen: Biosphere Filter Tips	Eppendorf, Hamburg
Präparierscheren und -pinzetten verschiedener Größen	B. Braun, Melsungen
Reaktionsgefäße: Falcons 25 ml und 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Reaktionsgefäße: Mikro-Schraubröhre 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße: E-Tubes 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße: Tubes 0,2 ml und 0,6 ml	Biozym, Hess. Oldendorf
Reaktionsgefäße: Optical Tube & Cap, 8x Strip	Stratgene, Santa Clara, CA USA
Kanülen und Spritzen verschiedener Größen	B. Braun, Melsungen

2.1.8 Software

Produkt	Firma
Analysis	Soft-Imaging System, Münster
Sigma Stat	Systat Software, Chicago, IL USA
Sigma Plot	Systat Software, Chicago, IL USA
MxPro QPCR Software	Stratagene, Santa Clara, CA USA
Multi-Analyst™	Bio-Rad, München
UV WinLab	Perkin Elmer, Waltham, MA USA

2 Material und Methoden

2.1.9 Gerätschaften

Produkt	Firma
Digitalkamera Camedia C-3040 Zoom	Olympus, Hamburg
Elektrophorese-Spannungsgerät E741	Consort, Turnhout, B
Feinwaage Precisa 180A	Precisa Instruments, Dietikon, CH
Fluor-S™ Multi Imager	Bio-Rad, München
Gelelektrophorese-Kammer	Universitätsmedizin, Göttingen
Kreisschüttler Titramax 100T	Heidolph Instruments, Schwabach
Kühl- und Tiefkühlschränke	verschiedene Firmen
Laborwaage E2000D	Sartorius, Göttingen
Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Axiovert S100TV	Carl Zeiss Mikrolmaging, Göttingen
Mikrotom 2040	Reichert-Jung, Nussloch
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen
PCR-Cycler T Professional	Biometra, Göttingen
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen
Photometer Gene Quant II	Pharmacia, San Francisco, CA USA
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipettierhilfen für 0,1 bis 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Reinstwasseranlage Milli-Q RG	Millipore, Schwalbach
RT-PCR-Cycler Stratagene Mx3000P	Stratagene, Santa Clara, CA USA
Rührgerät RCT basic	IKA-Werke, Staufeu
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Thermostat	Liebisch, Bielefeld
Tischschüttler Lab Dancer	IKA-Werke, Staufeu
Ultra-Turrax T25	IKA-Werke, Staufeu
UV/Vis-Spektrometer Lambda 25	Perkin Elmer, Waltham, MA USA
Vakuum-Zentrifuge	Bachofer, Reutlingen
Wärmeschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Wasserbad	Medax, Neumünster
Zentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg

2.2 Tiermodell und Studiendesign

2.2.1 Tiermodell

Die Kollagen-4A3-defizienten Mäuse (COL4A3^{-/-}) mit 129/SvJ-Hintergrund wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. Oliver Gross, Abteilung Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt. Kollagen-4A3-defiziente Mäuse dienen als Tiermodell für das autosomal rezessiv vererbte Alport-Syndrom und für die Alport-Nephritis (Cosgrove et al. 1996).

2.2.2 Genotyping der Versuchstiere

Die Genotypisierung der Versuchstiere erfolgte ebenfalls durch die Arbeitsgruppe Gross, wie in der Literatur beschrieben (Gross et al. 2003). Als Biopsie diente ein ca. 5 mm langes Schwanzstück des jeweiligen Versuchstiers. Die Mausbiopsien wurden nach Zugabe von 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K, beides enthalten im DNeasy® Blood & Tissue Kit, über 5 h bei 56 °C unter konstantem Schütteln verdaut. Die DNA-Extraktion erfolgte mittels des DNeasy® Blood & Tissue Kits. Im Anschluss wurde die PCR mit den unter 2.1.5 (S.26) angegebenen COL4A3-Primern durchgeführt (1. Aktivierung und Denaturierung: 2 min 30 sec bei 95 °C, 2. Primerhybridisierung 40 sec bei 55 °C, 3. Elongation 1 min 20 sec bei 68 °C, 4. Denaturierung: 45 sec bei 95 °C, 2.-4. 37x). Dafür wurden pro Tube 1,7 µl der extrahierten DNA und 23,8 µl des Mastermixes pipettiert.

Mastermix für das Genotyping:	20 µl	NFW
	0,75 µl	50 mM MgCl ₂
	2,5 µl	PCR Buffer 10x
	0,5 µl	dNTP Mix
	0,5 µl	Primer COL4A3fwd (10 pmol/µl)
	0,5 µl	Primer COL4A3rev (10 pmol/µl)
	0,5 µl	Primer COL4A3neo-muta (10 pmol/µl)
	0,18 µl	Platinum® Taq DNA Polymerase

10 µl des PCR-Produkts wurden zusammen mit 1 µl Loading Dye auf ein 1,5 %iges Agarose-Gel übertragen und bei 70 Volt aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden unter dem Fluor-S™ Multi Imager sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert. Das Amplifikationsprodukt zeigte sich bei Wildtyptieren als einzelne Bande auf Höhe von 926 bp, bei homozygoten Kollagen-4A3-defizienten Tieren als einzelne Bande auf einer Höhe oberhalb derjenigen bei Wildtyptieren. Bei heterozygoten Tieren finden sich beide Banden. Als Vergleich lief das Amplifikationsprodukt eines bekannten heterozygoten Tieres mit.

2 Material und Methoden

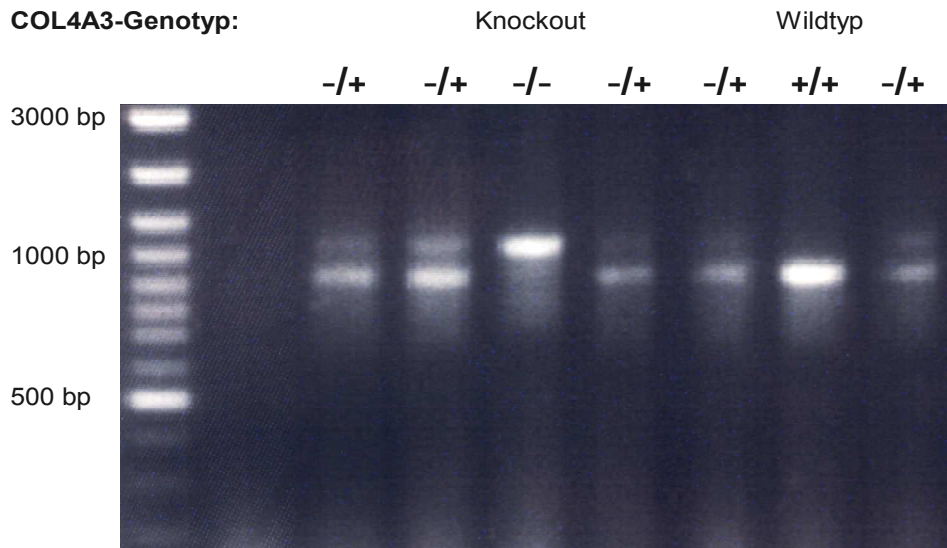


Abb. 10: Elektrophorese-Gel zum Genotyping der Versuchstiere: Zwei Banden finden sich bei heterozygoten Versuchstieren, eine untere Bande bei Wildtyptieren und eine obere Bande bei homozygoten COL4A3-defizienten Tieren.

2.2.3 Studiendesign

Die vorliegende Studie wurde von der Bezirksregierung Braunschweig nach § 8 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes geprüft und genehmigt und nach den entsprechenden Vorgaben des Tierschutzgesetzes durchgeführt. COL4A3^{-/-}-Versuchstiere mit 129/SvJ-Hintergrund bekamen ab dem 20. Lebensstag für insgesamt 50 Tage entweder Placebo (COL4A3^{-/-}), 10 mg/kg KG/Tag Enalapril (EN-COL4A3^{-/-}) oder 50 mg/kg KG/Tag Irbesartan (IB-COL4A3^{-/-}) über das Futter verabreicht. Der durch Vorversuche bestimmte mittlere Futterverbrauch pro Tag diente als Grundlage für die Arzneistoffdosierung bzw. die Herstellung der Futterpellets. Als Kontrolle dienten COL4A3^{+/+}-Tiere mit 129/SvJ Hintergrund. Alle COL4A3^{-/-}-Tiere wurden nach 70 +/- 5 Tagen getötet. Die Haltung der Tiere erfolgte unter konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit bei einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Zyklus mit maximal 5 Tieren pro Box. Die Geschlechtsverteilung innerhalb der COL4A3^{-/-}-, EN-COL4A3^{-/-}- und IB-COL4A3^{-/-}-Gruppe betrug annähernd 1:1. Alle Tiere der Wildtyp-Gruppe waren Weibchen.

2.2.4 Berechnung der Medikamenten-Dosierung

Die angestrebten Medikamentendosierungen betragen 10 mg/kg KG/Tag Enalapril und 50 mg/kg KG/Tag Irbesartan und entsprachen damit den maximalen therapeutischen Dosierungen bei Mäusen, sodass bei beiden Substanzen ein maximaler therapeutischer Effekt erwartet wurde.

Aus Vorversuchen wurde eine durchschnittliche Fressmenge der Tiere von 3,22 g Futter pro Tag und ein durchschnittliches Tiergewicht von 20 g ermittelt. Die Enalapril-Dosierung von 10 mg/kg KG/Tag entspricht 0,2 mg/20 g KG/Tag. Daraus berechnet sich eine Konzentration von 0,2 mg Enalapril in 3,22 g Futter. Das entspricht 62,11 mg Enalapril pro kg Futter. Die

2 Material und Methoden

Irbesartan-Dosierung von 50 mg/kg/Tag entspricht 1 mg/20 g KG/Tag, d.h. es berechnet sich eine Konzentration von 1 mg Irbesartan in 3,22 g Futter. Das entspricht 310,55 mg Irbesartan pro kg Futter.

2.3 Gewinnung organischen Materials

2.3.1. Präparation der Versuchstiere

Zunächst erfolgte eine Narkose des entsprechenden Versuchstieres in einer Kammer mittels Isofluran. Nach Eintreten absoluter Bewegungslosigkeit des Tieres wurde es sofort aus der Kammer entfernt und auf einer Alufolie platziert, sodass Urin mit einer 200 Mikroliterpipette aufgenommen werden konnte. Dieser wurde direkt in ein weiteres E-Tube überführt und kryokonserviert. Anschließend wurde das Herz transkutan punktiert, mit einer 5-ml-Spritze vorsichtig Blut aspiriert und dieses ebenfalls in ein E-Tube überführt. Daraufhin erfolgte die Eröffnung des Abdomens und Thorax und nach erneuter Punktion des Herzens die transkardiale Perfusion mit 4° C kalter 0,9 %iger NaCl-Lösung. Anschließend wurden beide Nieren und weitere Organe, deren Gewebe für verschiedene Methoden als Kontrolle dienten, entnommen und aufbereitet.

2.3.2 Materialaufbereitung

Die rechte Niere wurde in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die linke Niere wurde über Nacht in 4 %igem Formalin fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Alle anderen Organe wurden ebenfalls in 4 %igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Das Einbetten der entnommenen Organe in Paraffin wurde in der Abteilung für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Die Blutproben wurden bei 10.000 rpm zentrifugiert, das Serum abpipettiert und in ein neues E-Tube überführt, welches im Anschluss ebenfalls kryokonserviert wurde. Die Lagerung aller kryokonservierten Proben erfolgte bei -80° C.

2.3.3 Anfertigung von Gewebeschnitten

Die in einem Paraffinblock eingebetteten Nieren wurden zunächst für einige Minuten auf einer Kälteplatte herunter gekühlt und anschließend in ein Mikrotom eingespannt. Die eingestellte Schnittdicke betrug 1,5 Mikrometer. Zur Vermeidung dickerer Schnittdicken aufgrund Ausdehnung des Paraffinblocks bei Zimmertemperatur wurde der erste Schnitt verworfen und direkt anschließend der nächste angefertigt, der zunächst in ein Wasserbad (40 °C) überführt und nach ca. zwei Minuten mit einem Superfrost-Objektträger aufgenommen wurde. Zur besseren Adhäsion des Gewebes an den Objektträger erfolgte die Trocknung der Gewebeschnitte über Nacht bei 37 °C.

2.4 Biochemische Analysen

2.4.1 Bestimmung der Kreatinin- und Harnstoff-N-Konzentration im Serum

Die Bestimmung der Kreatinin- und Harnstoff-N-Konzentrationen im Serum der Versuchstiere erfolgte im Zentrallabor in der Abteilung für Klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen mittels eines Cobas Modular Analyzers der Firma Roche.

2.4.2 Bestimmung des Gesamt-Kollagen-Gehaltes mittels Hydroxyprolin-Assay

Zunächst wurden mit einem sterilen Skalpell ca. 3 x 2 x 1 mm große Gewebestücke von den kryokonservierten Nieren entfernt, in ein Röhrchen mit Schraubverschluss überführt und die Masse des Gewebes auf einer Feinwaage bestimmt, nachdem zuvor das jeweilige Röhrchen auf 0 mg austariert wurde. Anschließend wurden jeweils [$m_{\text{Gewebe}} \times 19$] μl 6 N HCl aufgefüllt ($c = 1 \text{ mg Gewebe} / 20 \mu\text{l}$). Die Proben wurden bei 100 °C für 24 h inkubiert, sodass die vollständige Hydrolyse des Gewebes erfolgte. Von jeder Probe wurden 50 μl (entspricht 2,5 mg eingesetzten Gewebes) in ein E-Tube überführt und für 2 h in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurden jeweils 400 μl Acetat-Citrat-Puffer aufgefüllt und diese auf 2 E-Tubes á 200 μl (entspricht 1,25 mg eingesetzten Gewebes) verteilt. Zur Bestimmung der Standardkurve wurden mehrere Standardproben (mit $m_{\text{HP}} = 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,5; 0,7; 0,8; 0,9; 1 \mu\text{g}$ Hydroxyprolin) jeweils doppelt pipettiert, indem das entsprechende Volumen einer Hydroxyprolin-Stocklösung ($c = 0,01 \text{ mg/ml}$) in ein E-Tube überführt und mit Acetat-Citrat-Puffer auf 200 μl aufgefüllt wurde. Nach Zugabe von 400 μl Chloramin-T-Reagenz zu den Proben und Standardproben erfolgte die Inkubation für 25 min bei Raumtemperatur und im Anschluss nach Zugabe von 400 μl Ehrlich's Reagenz die Inkubation für 20 min bei 60 °C. Die Reaktion wurde in Eiswasser abgestoppt und die Proben wurden in Dunkelheit gelagert, sodass das Chromophor bis zu 3 h stabil ist. Das Gesamtvolumen von 1 ml wurde in eine Küvette überführt und die Absorption der jeweiligen Probe sowie der Standardproben bei 550 nm in dem UV/Vis-Spektrometer Lambda 25 gemessen (Edwards und O'Brien 1980). Die Standardprobe mit 0 μg HP diente als Blank. Da die Proben und Standardproben jeweils doppelt pipettiert wurden, wurde aus den Messwerten jeweils der Mittelwert gebildet. Unter der Annahme, dass die Standardkurve linear verläuft, wurde die Absorption der Standardproben durch die jeweils eingesetzte HP-Masse dividiert und der Mittelwert der Quotienten gebildet, der die Steigung der Standardkurve von 0,7 ergibt.

Der Hydroxyprolin-Gehalt der Proben wurde aus der Standardkurve wie folgt ermittelt: $m_{\text{Hydroxyprolin}} = \text{Absorption} : 0,7$. Der Kollagen-Gehalt der Proben ergibt sich aus der Formel $c_{\text{Kollagen}} = m_{\text{Hydroxyprolin}} \times 6 \text{ [mg/mg Gewebe]}$ unter der Annahme, dass der Hydroxyprolin-Gehalt des Kollagens 13 % (Faktor 7,5) beträgt und 1,25 mg Gewebe pro Probe für die Reaktion eingesetzt wurden ($7,5 : 1,25 = 6$).

2.5 Histologische Methoden

2.5.1 Vorbereitung der Gewebeschnitte

Zu Beginn der histologischen Färbungen wurden die Gewebeschnitte zunächst für zweimal 10 min in 100 % Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (zweimal 2 min EtOH 100 %, einmal 2 min EtOH 90 % und einmal 1 min EtOH 70 %) und für 5 min unter fließendem Aqua dest rehydriert.

2.5.2. Methylgrün-Pikrosiriusrot-Färbung

Da sich bei der Durchführung der Pikrosiriusrot-Färbung nach einem herkömmlichen Protokoll zeigte, dass sich die Kollagenfasern zwar deutlich rot anfärben, aber die Zellkerne des Nierenparenchyms v.a. die interstitieller Zellen sich auch blassrot darstellen, wurde die Methode mit einer Gegenfärbung mittels Methylgrün wie folgt kombiniert. Nach Entparaffinieren und Rehydrierung der Gewebeschnitte (siehe 2.5.1, S. 33) erfolgte der erste Färbeschritt in einer Küvette mit Methylgrün-Lösung (pH = 4,2) für 15 min. Danach wurden die OT einzeln jeweils zweimal kurz unter fließendem Aqua dest gespült. Anschließend erfolgte der zweite Färbeschritt in einer Küvette mit Pikrosiriusrot-Lösung für 45 min, woraufhin die OT dreimal mit 0,01 N HCl gespült und nach Entwässern für dreimal 2 min in 100 % Ethanol und dreimal 2 min in Xylol mit Vitro-Clud® eingedeckt wurden. Kollagenfasern werden deutlich rot angefärbt. Zellkerne interstitieller sowie glomerulärer Zellen und sowohl die Zellkerne als auch das Zytoplasma der Tubulusepithelzellen stellen sich dagegen blassgrün bis grün dar. Man erhält einen guten farblichen Kontrast zw. Kollagenfasern und den Zellen des Nierenparenchyms, wodurch sich die Färbemethode zur Quantifizierung der Fibrose mittels Flächenanteilbestimmung der Kollagenfasern über den Farbschwellenwert eignet.

2.5.3 Immunhistochemie

2.5.3.1 Immunhistochemie: α SMA-IH, S100A4-IH, PCNA-IH

Im Anschluss an Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte (siehe 2.5.1, S. 33) erfolgte eine Antigendemaskierung in Antigen-Unmasking-Solution oder Citrat-Puffer (siehe Tab. 5) für 5x 3 min in der Mikrowelle bei 700 Watt. Nach dem Abkühlen wurde die endogene Peroxidase mittels 3 % H₂O₂ (15 min) geblockt. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörper-Bindungen erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte mit BSA-Lösung für 30 min bei RT. Nach Abklopfen der BSA-Lösung wurden 50 μ l des Primärantikörpers (Verdünnung siehe Tab. 5) aufgebracht und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach und zwischen allen nachfolgenden Schritten wurden jeweils drei Waschschrte á 3 min in PBS + 0,01 % Tween20 durchgeführt. Die Inkubation mit je 50 μ l der biotinylierten Sekundärantikörper (Verdünnung siehe Tab. 5) erfolgte für 45 min bei RT. Anschließend wurde durch Inkubation mit 50 μ l eines ABC-Kits (35 μ l von Lösung A + 35 μ l Lösung B in 2 ml PBS) über 30 min eine Peroxidase an den Sekundärantikörper gekoppelt. Der gebundene Antikörper-Enzym-Komplex wurde unter dem Mikroskop mit den Chromogenen AEC oder HistoGreen (siehe Tab. 5) entwickelt, bis sich das gewünschte Färbeergebnis zeigte. Nach der Gegenfärbung in Hämalaun für 4 min wurden die Gewebeschnitte 6 min unter warmem fließendem Leitungswasser differenziert und daraufhin wasserlöslich eingedeckt. Nach Gegenfärbung in Kernechtrot für 5 min wurden die Gewebeschnitte 1 min mit Aqua dest gespült, in einer Ethanolreihe mit aufsteigender Konzentration entwässert und nach 3x 2 min in Xylol mit Vitro-Clud® eingedeckt.

Tab. 5: α SMA-IH, S100A4-IH, PCNA-IH

Färbung	α SMA-IH	S100A4-IH	PCNA-IH
Antigen-demaskierung	Antigen-Unmasking-Solution	Antigen-Unmasking-Solution	Citrat-Puffer
Primär-AK Spezies	Anti- α SMA Maus	Anti-S100A4 Kaninchen	Anti-PCNA Maus
Verdünnung des Primär-AK	1:50 in BSA-Lösung	1:50 in BSA-Lösung	vorverdünnt
Sekundär-AK Konjugat	Anti-IgG-Maus Biotin	Anti-IgG-Kaninchen Biotin	Anti-IgG-Maus Biotin
Verdünnung des Sekundär-AK	1:200 in BSA-Lösung	1:500 in BSA-Lösung	1:200 in PBS+Tween20
Chromogen Gegenfärbung	HistoGreen Kernechtrot	AEC Hämalaun	AEC Hämalaun

2.5.3.2 BMP-7-PCNA-Doppelimmunhistochemie

Im Anschluss an Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte (siehe 2.5.1, S. 33) erfolgte eine Antigendemaskierung in Citrat-Puffer für 5x 3 min in der Mikrowelle bei 700 Watt. Nach dem Abkühlen wurde die endogene Peroxidase mittels 3 % H₂O₂ (15 min) geblockt. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörper-Bindungen erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte mit AB-Diluent für 30 min bei RT. Nach Abklopfen wurden 50 µl des 1. Primärantikörpers Anti-PCNA/ Maus (vorverdünnt) aufgebracht und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach und zwischen allen nachfolgenden Schritten wurden jeweils drei Waschschrte á 3 min in TBS + 0,01 % Tween20 durchgeführt. Die Inkubation mit 50 µl des 1. Sekundärantikörpers Anti-IgG-Maus/ Kaninchen/ HRP (1:200 in AB-Diluent) erfolgte für 45 min bei RT. Der gebundene Antikörper-Enzym-Komplex wurde unter dem Mikroskop mit dem Chromogen AEC entwickelt, bis sich ein zufriedenstellendes Färbeergebnis zeigte. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit 50 µl des 2. Primärantikörpers Anti-BMP-7/ Ziege (1:25) über Nacht bei 4°C. Die Inkubation mit 50 µl des 2. Sekundärantikörpers Anti-IgG-Ziege/ Kaninchen/ AP (1:250 in AB-Diluent) erfolgte für 45 min bei RT. Der gebundene Antikörper-Enzym-Komplex wurde mit dem Chromogen NBT-BCIP entwickelt. Durch die Zugabe von Levamisol zum Chromogen wurde die endogene Phosphatase geblockt. Nach der Gegenfärbung in Hämalaun für 4 min wurden die Gewebeschnitte 6 min unter warmem fließendem Leitungswasser differenziert und schließlich wasserlöslich eingedeckt.

2.5.3.3 αSMA-PCNA-Doppelimmunhistochemie

Im Anschluss an Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte (siehe 2.5.1, S. 33) erfolgte eine Antigendemaskierung in Antigen-Unmasking-Solution für 5x 3 min in der Mikrowelle bei 700 Watt. Nach dem Abkühlen wurde die endogene Peroxidase mittels 3 % H₂O₂ (15 min) geblockt. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörper-Bindungen erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte mit BSA-Lösung für 30 min bei RT. Nach Abklopfen wurden 50 µl des 1. Primärantikörpers Anti-PCNA/ Maus (vorverdünnt) aufgebracht und für 60 min bei RT inkubiert. Danach und zwischen allen nachfolgenden Schritten wurden jeweils drei Waschschrte á 3 min in PBS + 0,01 % Tween20 durchgeführt. Die Inkubation mit 50 µl des 1. Sekundärantikörpers Anti-IgG-Maus/ Kaninchen/ HRP (1:200 in BSA-Lösung) erfolgte für 45 min bei RT. Der gebundene Antikörper-Enzym-Komplex wurde unter dem Mikroskop mit dem Chromogen DAB entwickelt, bis sich ein zufriedenstellendes Färbeergebnis zeigte. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit 50 µl des 2. Primärantikörpers Anti-αSMA/ Maus (1:50 in BSA-Lösung) für 60 min bei RT. Die Inkubation mit 50 µl des 2. Sekundärantikörpers Anti-IgG-Maus/ Kaninchen/ HRP (1:200 in BSA-Lösung) erfolgte für 45 min bei RT. Der gebundene Antikörper-Enzym-Komplex wurde unter dem Mikroskop mit dem Chromogen

2 Material und Methoden

HistoGreen entwickelt, bis sich ein zufriedenstellendes Färbeergebnis zeigte. Nach der Gegenfärbung in Hämalaun für 4 min und Differenzierung für 6 min unter warmem fließendem Leitungswasser wurden die Gewebeschnitte in einer Ethanolreihe mit aufsteigender Konzentration entwässert und nach dreimal 2min in Xylol mit Vitro-Clud® eingedeckt.

2.5.4 Immunfluoreszenz

2.5.4.1 PAI-1-Immunfluoreszenz

Im Anschluss an Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte (siehe 2.5.1, S. 33) erfolgte eine Antigendemaskierung in Antigen-Unmasking-Solution (1:100 in Aqua bidest) für 5x 3 min in der Mikrowelle bei 700 Watt. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörper-Bindungen erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte für 30 min mit BSA-Lösung. Nach Abklopfen der BSA-Lösung wurden 50 µl des Primärantikörpers Anti-PAI-1/ Kaninchen (1:50 in BSA-Lösung) aufgebracht und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Anti-IgG-Kaninchen/ Alexa488 (1:200 in BSA-Lösung) für 45 min. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten jeweils drei Waschschrte á 3 min in PBS + 0,01 % Tween2 auf dem Schüttler. Alle Inkubations- und Waschschrte der Immunfluoreszenz erfolgten unter Lichtausschluss. Zum Abschluss wurden die Gewebeschnitte für 10 min mit DAPI inkubiert und danach mit Immunofluorescence Mounting Medium eingedeckt.

2.5.4.2 PAI-1- und AQP-1/2-Immunfluoreszenz angrenzender Gewebeschnitte

Zur Färbung angrenzender Gewebeschnitte wurden drei Gewebeschnitte, deren Abtrennung vom Paraffinblock mit dem Mikrotom direkt nacheinander erfolgte, mit der gleichen Ausrichtung in einer Reihe auf dem OT platziert. Der erste Gewebeschnitt diente dabei der PAI-1-IF, der zweite der AQP-1- oder AQP-2-IF und der dritte der Negativkontrolle. Die PAI-1-Immunfluoreszenz wurde, wie unter 2.5.5.1 beschrieben, durchgeführt. Die AQP-1- bzw. – AQP-2-IF wurde, wie unter 2.5.5.1 beschrieben, durchgeführt, allerdings mit Anti-AQP-1/ Kaninchen bzw. Anti-AQP-2/ Kaninchen als Primärantikörper (jeweils 1:50 in BSA-Lösung).

2.5.4.3 Doppelimmunfluoreszenz: α SMA-PAI-1-, α SMA-S100A4- und PCNA-S100A4-DIF

Im Anschluss an Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte (siehe 2.5.1, S. 33) erfolgte eine Antigendemaskierung in Citrat-Puffer oder Antigen-Unmasking-Solution (siehe Tab. 6) für 5x 3 min in der Mikrowelle bei 700 Watt. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörper-Bindungen erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte für 30 min mit BSA-Lösung. Nach Abklopfen der BSA-Lösung wurden 50 μ l des Primärantikörper-Gemisches (siehe Tab. 6) aufgebracht und für 60 min bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem 1. Sekundärantikörper (siehe Tab. 6) und danach die Inkubation mit dem 2. Sekundärantikörper (siehe Tab. 6) jeweils für 45 min bei RT. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten jeweils drei Waschschrte á 3 min in PBS + 0,01 % Tween20 auf dem Schüttler. Alle Inkubations- und Waschschrte der Immunfluoreszenz erfolgten unter Lichtausschluss. Zum Abschluss wurden die Gewebeschnitte für 10 min mit DAPI inkubiert und danach mit Immunofluorescence Mounting Medium eingedeckt.

Tab. 6: α SMA-PAI-1-, α SMA-S100A4- und PCNA-S100A4-DIF

Färbung	αSMA-PAI-1-DIF	αSMA-S100A4-DIF	PCNA-S100A4-DIF
Antigen-demaskierung	Antigen-Unmasking-Solution	Citrat-Puffer	Citrat-Puffer
1. Primär-AK / Spezies	Anti- α SMA / Maus	Anti- α SMA / Maus	Anti-PCNA / Maus
Verdünnung des 1. Primär-AK	1:50 in BSA-Lösung	1:50 in BSA-Lösung	vorverdünnt
2. Primär-AK / Spezies	Anti-PAI-1 / Kaninchen	Anti-S100A4 / Kaninchen	Anti-S100A4 / Kaninchen
Verdünnung des 2. Primär-AK	1:50 in BSA-Lösung	1:50 in BSA-Lösung	1:50 in der Lösung des 1. Primär-AK
Inkubationsdauer und -temperatur	über Nacht bei 4 °C	60 min bei RT	60 min bei RT
1. Sekundär-AK Konjugat	Anti-IgG-Kaninchen Alexa488	Anti-IgG-Maus Alexa555	Anti-IgG-Maus Alexa555
Verdünnung des 1. Sekundär-AK	1:200 in BSA-Lösung	1:200 in BSA-Lösung	1:200 in BSA-Lösung
2. Sekundär-AK Konjugat	Anti-IgG-Maus Alexa555	Anti-IgG-Kaninchen Alexa488	Anti-IgG-Kaninchen Alexa488
Verdünnung des 2. Sekundär-AK	1:200 in BSA-Lösung	1:200 in BSA-Lösung	1:200 in BSA-Lösung

2.5.5 Anfertigung histologischer Abbildungen

Die Fotografien der mittels Pikrosiriusrot und Immunhistochemie gefärbten Gewebeschnitte wurden am Mikroskop Axiovert S100TV mit der installierten Digitalkamera Camedia C-3040 Zoom in den unter den Abbildungen angegebenen Vergrößerungen aufgenommen. Zur Anfertigung der IF-Abbildungen wurde der entsprechende Gesichtsfeldbereich durch Verschieben eines Filters nacheinander mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen angeregt und mittels einer installierten Fluoreszenz-Kamera fotografiert. Im Anschluss wurden die dadurch erhaltenen zwei bzw. drei verschiedenen Schwarz-Weiß-Fluoreszenz-Fotografien je nach Wellenlänge, mit der der angeregte AK-gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff fluoresziert, mittels des Programms Analysis von Soft-Imaging digital gefärbt (DAPI: blau; Alexa555: rot; Alexa488: grün) und zu einer mehrfarbigen IF-Abbildung digital übereinander gelegt.

2.5.6 Quantitative Auswertung der histologischen Färbungen

2.5.6.1 Quantifizierung der Fibrose über Flächenanteilbestimmung der Kollagenfasern

Pro Gewebeschnitt wurden drei Bilder der Nierenrinde und drei Bilder des Nierenmarks mit der am Mikroskop installierten Digitalkamera Camedia C-3040 Zoom aufgenommen (Einstellungen am Mikroskop Axiovert S100TV: Vergrößerung 100x, Helligkeit Stufe 5, Verwendung des Blaufilters). Im Anschluss erfolgte die morphometrische Auswertung durch das Programm Analysis. Das Farbschwellenwertintervall wurde von 300 bis 45 gesetzt, sodass der Anteil intensiv rot gefärbter Fläche und damit der Anteil der Fläche angefärbter Kollagenfasern an der Gesamtfläche berechnet wurden. Der Fibrosierungsgrad ergab sich aus den Mittelwerten aller 6 Aufnahmen eines Gewebeschnittes.

2.5.6.2 Quantifizierung der PCNA-Immunhistochemie

Zur quantitativen Bestimmung der Zellproliferation in den Glomeruli, den Tubuli und dem Interstitium wurde die Anzahl der mittels PCNA-IH braunrot sowie die nur mit Hämalaun angefärbten Zellkerne ausgezählt und daraus der Anteil der proliferierenden, d.h. PCNA-positiven glomerulären, tubulären und interstitiellen Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl bestimmt. Die Bestimmung des Anteils PCNA-positiver Zellen im Glomerulus erfolgte pro Gewebeschnitt anhand von 12 zufällig ausgewählten Glomeruli. Zur Bestimmung des Anteils PCNA-positiver Zellen der Tubuli und im Interstitium wurden pro Gewebeschnitt 5 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder im Bereich der Nierenrinde ausgezählt. Anhand der ermittelten Werte konnte zusätzlich die mittlere Gesamtzellzahl pro Glomerulus als Parameter für einen glomerulären Schaden und der Anteil der interstitiellen Zellzahl an der tubulointerstitiellen Gesamtzellzahl als Parameter für die interstitiellen Fibrosierung bestimmt werden.

2.6 Expressionsanalysen

2.6.1 Vorbereitung der Gewebeproben für die mRNA-Isolation

Zunächst wurde von dem kryokonservierten nativen Nierengewebe unter sterilen Bedingungen ein ca. 3 x 3 x 3 mm großes Stück abgetrennt und in ein Falconröhrchen mit 1 ml Lysis-Puffer überführt und anschließend mit dem Ultra-Turrax für ca. 1 min homogenisiert. Bevor eine neue Gewebeprobe homogenisiert wurde, erfolgte die Reinigung des Ultra-Turrax-Messers in 70 % EtOH und NFW. Die Suspension wurde 10 min auf Eis inkubiert.

2.6.2 Kombinations-Isolationsverfahren mit der Isolation nach Chomczynski und RNeasy® Mini Kit von Qiagen

Nach gründlicher Reinigung des Arbeitsplatzes mit Ethanol und RNase Zap® wurden zunächst 500 µl der Probe auf die lila Schreddersäule gegeben und bei 10.000 U/min für 2 min zentrifugiert. Die Schreddersäule wurde verworfen und dem Durchfluss 1 ml 70 % EtOH hinzugefügt. Die Suspension wurde anschließend in drei Schritten in eine rosa Spin-Säule überführt und bei 10.000 U/min für 15 Sekunden zentrifugiert, woraufhin der Durchfluss verworfen wurde. Es folgte ein Waschschriff mit 350 µl des Wasch-Puffers RW1 bei 10.000 U/min für 15 Sekunden. Im Anschluss erfolgte ein DNA-Verdau mittels DNase, wobei 80 µl DNase-Lösung (10 µl RNase-freie DNase + 70 µl RDD-Puffer, beides im RNase-free DNase Set) direkt auf den Filter der Spin-Säule gegeben wurden. Nach 45 Minuten Inkubation erfolgten weitere Waschschriffe zunächst mit 350 µl RW1 und danach zweimal mit 500 µl RPE, jeweils bei 10.000 U/min für 20 sec. Nach Trockenzentrifugation für 2 min bei 15.000 U/min erfolgte die Eluierung der DNA, indem 30 µl 43 °C heißes NFW auf den Filter der Spin-Säule pipettiert, für 5 min bei 43 °C stehen gelassen und schließlich für 3 min bei 14.000 U/min zentrifugiert wurden. Die Proben wurden anschließend auf Eis gelagert.

2.6.3 Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung des mRNA-Gehaltes der Proben erfolgte mit dem RNA/DNA-Calculator Gene Quant II. Zunächst wurde die Quarz-Küvette (QS1000) mit EtOH und mit Aqua bidest gespült. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Leerwertes, indem die Absorption von NFW gemessen wurde. 5 µl der Probe wurden mit 995 µl NFW verdünnt und anschließend kurz gevortext. Zur Messung der mRNA-Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm bestimmt.

2 Material und Methoden

2.6.4 Umschreiben der Gesamt-mRNA zu cDNA

Die Umschreibung der mRNA-Proben zu cDNA erfolgte mit Hilfe des Eppendorf-Mastercylers mit dem Programm KatRT. Zunächst wurde der Arbeitsplatz gründlich mit 70 % EtOH und RNase Zap® gereinigt. Für die Umschreibung wurden jeweils $m_{\text{Gesamt-mRNA}} = 3 \mu\text{g}$, bzw. das entsprechende Volumen eingesetzt, welches mit der folgenden Formel berechnet wurde:

$$V_{\text{Gesamt-mRNA}} = (m_{\text{Gesamt-mRNA}} \times 1000) / C_{\text{Gesamt-mRNA}}$$

Das eingesetzte Volumen wurde mit NFW auf 10 μl aufgefüllt. Anschließend wurden pro Tube 7 μl Mastermix I pipettiert.

Mastermix I für einen Ansatz:

- 5 μl NFW
- 1 μl Oligo dt
- 1 μl dNTP-Mix (10 mM)

Daraufhin wurden die Proben im Thermocycler für 10 min bei 70 °C erhitzt und für 3 min auf 4 °C abgekühlt. Anschließend wurden pro Tube 5,5 μl Mastermix II pipettiert.

Mastermix II für einen Ansatz:

- 4 μl First Strand Buffer
- 1 μl DTT
- 0,5 μl Ribonuklease Inhibitor RNaseOUT™

Daraufhin wurden die Proben im Thermocycler für 5 min bei 42 °C erwärmt. Anschließend wurde 1 μl der Reversen Transkriptase Superscript™ II hinzugefügt, bei 42 °C für 50 min ein mRNA-cDNA-Hybrid gebildet und daraufhin die Reverse Transkriptase bei 70 °C für 15 min inaktiviert. Nach Zugabe von 1 μl RNase H wurde bei 37 °C für 20 min der RNA-Strang des mRNA-cDNA-Hybrids verdaut und dann die Proben auf 4 °C heruntergekühlt. Im Anschluss wurde die Reaktion mit NFW auf 200 μl aufgefüllt, sodass die cDNA-Endkonzentration im Optimalfall 7,5 $\mu\text{g/ml}$ betrug. Um für die im Folgenden beschriebene RT-PCR eine NoRT-Kontrolle zu erhalten, wurde zusätzlich eine beliebige mRNA Probe wie beschrieben pipettiert, aber ohne Hinzufügen der Reversen Transkriptase, sodass diese Probe nicht in cDNA umgeschrieben wurde und demzufolge keine Amplifikation in der RT-PCR zu erwarten war.

2.6.5 Vorbereitung der RT-PCR-Ansätze

Zu Beginn wurde der Arbeitsplatz gründlich mit 70 % EtOH und RNase Zap® gereinigt. Die RT-PCR-Ansätze wurden auf Eis pipettiert. Dem SYBR® Green Supermix wurden zunächst 3,3 µl ROX Passive Reference Dye zugesetzt. Anschließend wurden jeweils der Mastermix für das untersuchte Gen und das Haushaltsgen wie folgt pipettiert, wobei die angegebenen Volumina mit der Ansatzanzahl multipliziert wurden.

Mastermix für das untersuchte Gen:

- 13 µl SYBR® Green Supermix (+ROX)
- 0,5 µl Primer fwd (10 pmol/µl)
- 0,5 µl Primer rev (10 pmol/µl)
- 11 µl NFW

Mastermix für das Haushaltsgen:

- 13 µl SYBR® Green Supermix (+ROX)
- 0,5 µl Primer mGAPDH fwd (10 pmol/µl)
- 0,5 µl Primer mGAPDH rev (10 pmol/µl)
- 11 µl NFW

Die Proben wurden nach einem festen Schema in 8-Tube-Streifen pipettiert (siehe Abb. 11), wobei sich in den letzten beiden Zeilen die NFW- und die NoRT-Probe als Kontrolle befanden. Nach dem Pipettieren wurden die 8-Tube-Streifen in der gleichen Anordnung wie auf der Halterung in die vorgesehenen Löcher der Heizplatte des Real-Time-PCR-Cyclers gestellt.

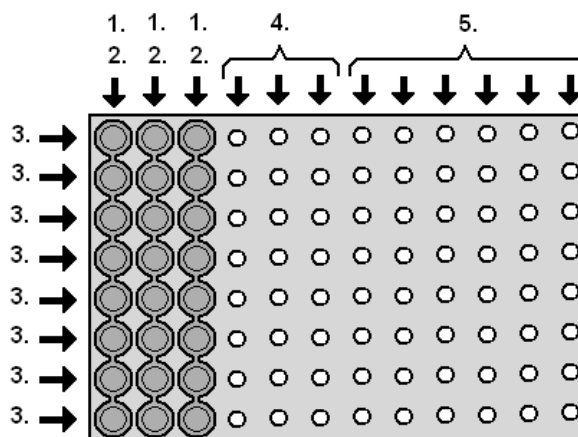


Abb. 11: RT-PCR-Pipettierschema

1. Platzieren der 8-Tube-Streifen in der Halterung
2. 23 µl Mastermixes des untersuchten Gens
3. 2 µl der cDNA-Proben jeweils in 3 Tubes
- 4.: Schritt 1.-3. (Schritt 2. mit GAPDH-Mastermix)
- 5.: Schritt 1.-4. für die restlichen cDNA Proben (maximal 14 cDNA-Proben pro RT-PCR)

2.6.6 Ablauf der RT-PCR

Die Steuerung des RT-PCR-Cyclers und die Auswertung der Messwerte erfolgten durch das Programm MxPro. Vor jedem RT-PCR-Lauf wurde die Belegung der Well-Plätze auf der Heizplatte in das Programm eingegeben und die Temperatur für die Primerhybridisierung festgelegt. Die jeweilige Temperatur für die Primerhybridisierung wurde so gewählt, dass sie zwischen den optimalen Temperaturen für die Primerhybridisierung der beiden Primer des untersuchten Gens und der beiden Primer des Haushaltsgens lag. Die Temperaturen für die Hybridisierung der Primer sind unter 2.1.5 (S. 26) angegeben. Der Ablauf einer RT-PCR ist in Tab. 7 dargestellt. Der Bio Rad Mastermix enthält SYBR® Green, einen Fluoreszenzfarbstoff, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Dadurch kommt es infolge der exponentiellen Zunahme des PCR-Produkts zu einer parallel verlaufenden Zunahme der Fluoreszenz, die am Ende der Elongationsphase gemessen wird.

Tab. 7: Ablauf der RT-PCR

	RT-PCR-Phase	Dauer	Temperatur	
1.	Aktivierung	10 min	95 °C	
2.	Denaturierung	30 sec	95 °C	
3.	Primerhybridisierung	1 min	RT-PCR: mCOL1A1	57 °C
			RT-PCR: mBMP-7	60 °C
			RT-PCR: mALK-3	60 °C
			RT-PCR: mPAI-1	58 °C
			RT-PCR: muPAR	60 °C
4.	Elongation	30 sec	72 °C	
5.	Messung der Fluoreszenz			
6.	Schritt 2. bis 5. 45x			

2.6.7 Berechnung der relativen Expression

Die gemessene Fluoreszenz einer RT-PCR nimmt proportional mit der Menge des PCR-Produkts zu. Aus den gemessenen Fluoreszenzwerten erstellt das Programm MxPro für jeden RT-PCR-Ansatz eine Fluoreszenzkurve des untersuchten Gens und eine Fluoreszenzkurve des Haushaltsgens mGAPDH. Die Kopienanzahl des PCR-Produkts und damit die Fluoreszenz zu einem bestimmten Zyklus der PCR verhalten sich direkt proportional zur Kopienanzahl der eingesetzten cDNA vor Beginn der PCR. Die Kopienanzahl der eingesetzten cDNA zu Beginn der Reaktion ist wiederum proportional zur relativen Expression dieses Gens, wenn man davon ausgeht, dass die Menge der eingesetzten Gesamt-cDNA für jede Probe konstant ist. Um die allerdings nicht

2 Material und Methoden

vermeidbaren Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten Gesamt-cDNA bei der Berechnung der relativen Expression auszugleichen, wird für jede Probe parallel eine RT-PCR für das Haushaltgen mGAPDH durchgeführt. Die mGAPDH-Expression wird nicht reguliert und ist daher in allen Zellen konstant, sodass die Kopienanzahl der mGAPDH-cDNA zu einem bestimmten Zyklus proportional zur Menge der eingesetzten Gesamt-cDNA ist.

Die Berechnung der Relativen Expression erfolgte mittels der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Ct steht für „Crossing treshold“. Der Ct-Wert gibt den x-Wert an, bei dem die Fluoreszenzkurve einen bestimmten Fluoreszenz-Schwellenwert kreuzt, d.h. übersteigt. Der Fluoreszenz-Schwellenwert wurde für alle Proben auf 2000 festgelegt, sodass dieser innerhalb des exponentiellen Bereichs der Kurve liegt. Durch Subtraktion des Ct-Wertes des untersuchten Gens einer Probe vom Ct-Wert des Haushaltgens derselben Probe ergibt sich der ΔCt -Wert. Der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert wurde berechnet, indem der Mittelwert der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der Wildtypgruppe vom $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert der jeweiligen Probe subtrahiert wurde. Die Relative Expression ergibt sich aus der Formel:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

2.6 Statistische Analysen

In den Ergebnistabellen wurden die Mittelwerte (MW), die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe (n), die Standardabweichung (SD), der Standardfehler (SEM) und die P-Werte der statistischen Auswertung angegeben. Die statistische Auswertung der Ergebnisse dieser Doktorarbeit erfolgte mit dem Programm Sigma Stat Version 3.5 von Systat Software.

Mittels ANOVA wurde untersucht, ob die Unterschiede der Mittelwerte zwischen den vier Gruppen signifikant sind. Der P-Wert dieses Globaltests wurde in den Ergebnistabellen als P_{ANOVA} angegeben. Lag allerdings keine Normalverteilung der Einzelwerte der jeweiligen Gruppen vor, erfolgte die Berechnung des P-Wertes mittels Kruskal-Wallis-Test und wurde als P_{KW} in den Ergebnistabellen angegeben.

Anschließend wurden die Gruppen paarweise miteinander verglichen und die Signifikanz des Unterschiedes der Mittelwerte zweier miteinander verglichener Gruppen mittels t-Test nach Bonferroni berechnet. War die Berechnung mittels Bonferroni-t-Test nicht möglich, erfolgte der Vergleich der Ergebnisse zweier Gruppen miteinander nach der Methode nach Dunn. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf $P = 0,05$ festgelegt.

In den Ergebnistabellen wurden die P-Werte des statistischen Vergleichs der Mittelwerte der EN-COL4A3^{-/-}-Gruppe und der IB-COL4A3^{-/-}-Gruppe miteinander $P(EN \text{ vs } IB)$ und jeweils mit den Mittelwerten der COL4A3^{+/+}-Gruppe $P(\text{vs } WT)$ und den Mittelwerten der COL4A3^{-/-}-Gruppe $P(\text{vs } COL4A3^{-/-})$ angegeben.

Die Balkendiagramme wurden mit dem Programm Sigma Plot erstellt. Die Sternchen in den Balkendiagrammen stellen die Signifikanz gegenüber der COL4A3^{-/-}-Gruppe dar. Bei knapp nicht signifikanten Unterschieden wurde der P-Wert im Diagramm angegeben. In den Balkendiagrammen ist der Standardfehler als Strichindikator oberhalb der Balken dargestellt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse dieser Dissertation erfolgte mit Hilfe statistischer Beratung durch Dr. Klaus Jung aus der Abteilung für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen.

3 Ergebnisse

3.1 Retentionswerte: Kreatinin und Harnstoff-N im Serum

Tab. 8: Konzentration von Kreatinin und Harnstoff-N im Serum

Gruppe	COL4A3 ^{+/+}	COL4A3 ^{-/-}	EN-COL4A3 ^{-/-}	IB-COL4A3 ^{-/-}
n	8	13	12	12
Kreatinin im Serum ($P_{KW} < 0,001$)				
MW [mg/dl]	0,50	1,20	0,54	0,43
SD	0,25	0,54	0,22	0,31
SEM	0,09	0,15	0,06	0,09
P(vs WT)	-	< 0,001	1,000	1,000
P(vs COL4A3 ^{-/-})	< 0,001	-	< 0,001	< 0,001
P(EN vs IB)	-		1,000	
Harnstoff-N im Serum ($P_{KW} < 0,001$)				
MW [mg/dl]	21,60	267,87	162,70	86,72
SD	4,98	129,32	76,80	75,37
SEM	1,76	35,87	22,17	21,76
P(vs WT)	-	< 0,001	0,008	0,711
P(vs COL4A3 ^{-/-})	< 0,001	-	0,033	< 0,001
P(EN vs IB)	-		0,263	

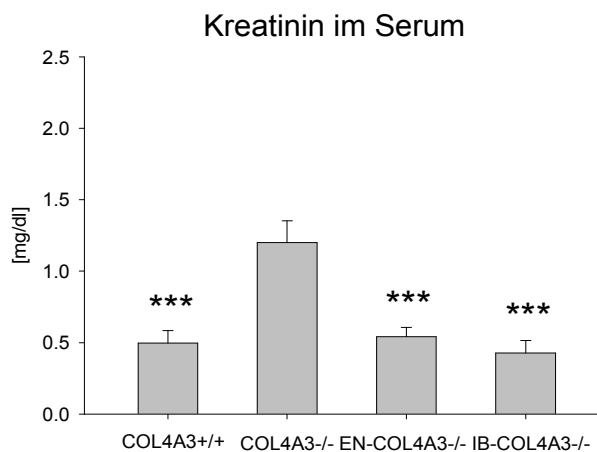


Abb. 12: Balkendiagramm zur Darstellung der Mittelwerte der Kreatinin-Konzentration im Serum in den einzelnen Gruppen.

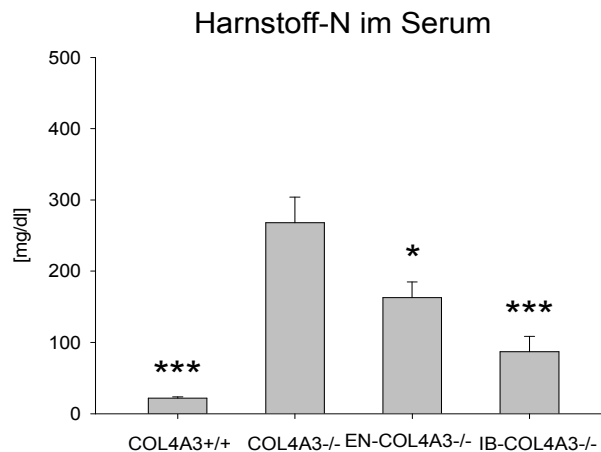


Abb. 13: Balkendiagramm zur Darstellung der Mittelwerte der Harnstoff-N-Konzentration im Serum in den einzelnen Gruppen.

Die Gruppe der Kollagen-4A3-defizienten Tiere zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant erhöhte Konzentration der Retentionswerte im Serum, bzgl. Kreatinin auf das Doppelte und bzgl. Harnstoff auf das Zehnfache (siehe Tab. 8, Abb. 12 und 13).

Mit Enalapril bzw. Irbesartan behandelte Kollagen-4A3-defiziente Tiere zeigen keine signifikanten Unterschiede der Kreatinin-Konzentration im Serum im Vergleich zum Wildtyp. EN-COL4A3^{-/-} und IB-COL4A3^{-/-} weisen im Vergleich zu unbehandelten Kollagen-4A3-

3 Ergebnisse

defizienten Tieren eine signifikant verminderte Kreatinin-Konzentration als auch eine signifikant verminderte Harnstoff-N-Konzentration im Serum auf. Die Unterschiede der Kreatinin-Konzentration bzw. der Harnstoff-N-Konzentration im Serum der EN-COL4A3^{-/-}-Gruppe und der IB-COL4A3^{-/-}-Gruppe im Vergleich miteinander zeigen keine Signifikanz.

3.2 Tubulointerstitielle Fibrosierung

3.2.1 Quantitative Bestimmung des Fibrosierungsgrades

Tab. 9: Flächenanteil mit Pikrosiriusrot gefärbter Kollagenfasern und Kollagengehalt

Gruppe	COL4A3 ^{+/+}	COL4A3 ^{-/-}	EN-COL4A3 ^{-/-}	IB-COL4A3 ^{-/-}
Methylgrün-Pikrosiriusrot-Färbung: Flächenanteil der Kollagenfasern (P _{KW} < 0,001)				
MW [%]	0,09	7,44	7,09	4,55
SD	0,10	4,53	4,09	5,60
SEM	0,04	1,10	1,09	1,62
n	8	17	14	12
P(vs WT)	-	0,002	0,004	0,177
P(vs COL4A3 ^{-/-})	0,002	-	1,000	0,507
P(EN vs IB)	-		0,872	
Hydroxyprolinassay: Kollagengehalt (P _{ANOVA} < 0,001)				
MW [mg/g]	1,96	4,27	3,30	2,94
SD	0,29	0,91	0,67	0,79
SEM	0,12	0,24	0,18	0,23
n	6	15	14	12
P(vs WT)	-	< 0,001	0,004	0,077
P(vs COL4A3 ^{-/-})	< 0,001	-	0,008	< 0,001
P(EN vs IB)	-		1,000	

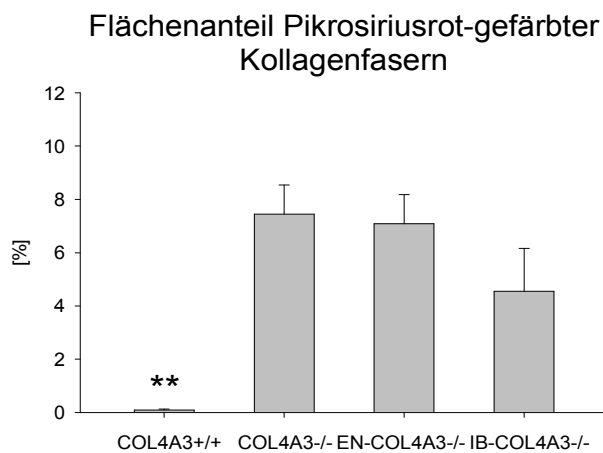


Abb. 14: Balkendiagramm zur Darstellung der Mittelwerte des mittels Farbeschwellenwertanalyse ermittelten Flächenanteils Pikrosiriusrot-gefärbter Kollagenfasern in den einzelnen Gruppen.

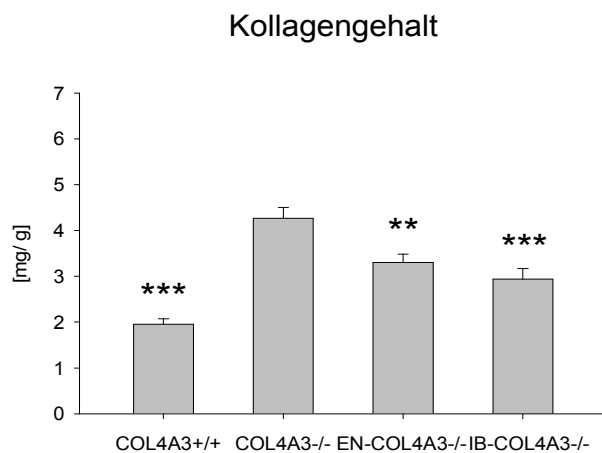


Abb. 15: Balkendiagramm zur Darstellung der Mittelwerte der mittels Hydroxyprolinassay ermittelten Kollagengehalte des Nierengewebes in den einzelnen Gruppen.

3 Ergebnisse

Die Gruppe der unbehandelten Kollagen-4A3-defizienten Tiere zeigt im Vergleich zum Wildtyp einen signifikant erhöhten Flächenanteil der mittels Pikrosiriusrot angefärbten Kollagenfasern sowie einen mittels HP-Assay gemessenen signifikant erhöhten Kollagengehalt des Nierengewebes (siehe Tab. 9, Abb. 14 und 15, S. 46).

Mit Enalapril behandelte Kollagen-4A3-defiziente Tiere zeigen einen signifikant niedrigeren Kollagengehalt im Vergleich zu unbehandelten Kollagen-4A3-defizienten Tieren. Mit Irbesartan behandelte Kollagen-4A3-defiziente Tiere weisen einen um 38 % niedrigeren Flächenanteil angefärbter Kollagenfasern und einen signifikant niedrigeren Kollagengehalt im Vergleich zu unbehandelten Kollagen-4A3-defizienten Tieren auf.

Die Unterschiede des Kollagengehaltes bzw. des Flächenanteils der mittels Pikrosiriusrot angefärbten Kollagenfasern der EN-COL4A3^{-/-}-Gruppe und der IB-COL4A3^{-/-}-Gruppe im Vergleich miteinander zeigen keine Signifikanz.

3.2.2 RT-PCR: Maus-Prokollagen Typ 1A1

Tab. 10: Relative Expression des mCOL1A1

Gruppe	COL4A3 ^{+/+}	COL4A3 ^{-/-}	EN-COL4A3 ^{-/-}	IB-COL4A3 ^{-/-}
n	8	17	14	11
RT-PCR: mCOL1A1 (P _{ANOVA} < 0,001)				
MW rel. Expr.	1,09	72,27	91,85	55,83
SD	0,47	33,79	61,36	53,15
SEM	0,17	8,20	16,40	16,03
P(vs WT)	-	0,004	< 0,001	0,078
P(vs COL4A3 ^{-/-})	0,004	-	1,000	1,000
P(EN vs IB)	-		0,335	

Kollagen-4A3-defiziente Tiere zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant um das fast 70-fache erhöhte relative Expression von Maus-Prokollagen Typ 1A1 im Nierengewebe (siehe Tab. 10). Die Gruppe der mit Enalapril bzw. Irbesartan behandelten Kollagen-4A3-defizienten Tiere zeigen keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Mittelwerte der relativen Expression von mCOL1A1 im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kollagen-4A3-defizienten Tiere und im Vergleich miteinander.

3.2.3 Exemplarische histologische Darstellung der Fibrosierung

Die Abbildungen 24 - 26 (S. 55 - 57) des Kapitels 3.6 des Ergebnisteils zeigen zur Darstellung der Unterschiede der tubulointerstitiellen Fibrosierung in den verschiedenen Versuchsgruppen Gewebeschnitte, bei denen Kollagenfasern mittels Pikrosiriusrot, Myofibroblasten durch α -Glattmuskelaktin-Immunhistochemie (α SMA-IH) und FSP-1-positve Fibroblasten durch S100A4-Immunhistochemie angefärbt wurden.

Dabei weisen Wildtyptiere (siehe Abb. 24, A, S. 55) keine Anfärbung von Kollagenfasern, Myofibroblasten (siehe Abb. 25, A, S. 56) und FSP-1-positven Fibroblasten (siehe Abb. 26, A, S. 57) im Interstitium auf. Im Gegensatz dazu zeigen unbehandelte Kollagen-4A3-defiziente Mäuse eine ausgeprägte Akkumulation von interstitieller Matrix (siehe Abb. 24, B, S. 55), α -Glattmuskelaktin-positiven Myofibroblasten (siehe Abb. 25, B, S. 56) und FSP-1-positven Fibroblasten (siehe Abb. 26, B, S. 57). Mit Enalapril behandelte Kollagen-4A3-defiziente Tiere zeigen ebenfalls eine deutliche Anfärbung von Kollagenfasern (siehe Abb. 24, C, S. 55), die bei einzelnen Tieren aber geringer ausfällt als bei unbehandelten Kollagen-4A3-defizienten Tieren (siehe Abb. 24, D, S. 55). Bei EN-COL4A3^{-/-}-Tiere lassen sich zahlreiche Myofibroblasten (siehe Abb. 25, C, S. 56) und FSP-1-positve Fibroblasten (siehe Abb. 26, C, S. 57) im Interstitium anfärben, wobei auch hier einzelne Tiere eine geringere Ausprägung zeigen (siehe Abb. 25, D, S. 56).

Nach Irbesartan-Medikation weisen Kollagen-4A3-defiziente Tiere im Vergleich zu unbehandelten Kollagen-4A3-defizienten Tieren eine deutlich geringere Anfärbung von Kollagenfasern mittels Pikrosiriusrot im Interstitium (siehe Abb. 24, E und F, S. 55), eine geringere Akkumulation von Myofibroblasten (siehe Abb. 25, E und F, S. 56) und FSP-1-positven Fibroblasten (siehe Abb. 26, D, S. 57) auf. Neben FSP-1-positven Fibroblasten im Interstitium lassen sich bei Kollagen-4A3-defizienten Tieren auch FSP-1-positve Tubuluszellen mittels S100A4-Immunhistochemie (siehe Abb. 26, E und F, S. 57) und S100A4-Immunfluoreszenzfärbung (siehe Abb. 27, D, S. 58) darstellen. Die α -Glattmuskelaktin-S100A4-Doppelimmunfluoreszenz des Nierengewebes Kollagen-4A3-defizienter Tiere stellt dar, dass die Fibroblasten keine Doppelsexpression von α -Glattmuskelaktin und S100A4 zeigen und daher die beiden Fibroblastenpopulationen der Myofibroblasten und FSP-1-positve Fibroblasten deutlich voneinander abgrenzbar sind (siehe Abb. 27, B, C, E und F, S. 58).

3.3 Proliferation tubulärer, interstitieller und glomerulärer Zellen

3.3.1 Quantitative Auswertung der PCNA-Immunhistochemie

Tab. 11: Ergebnisse der quantitativen Auswertung der PCNA-IH

Gruppe	COL4A3 ^{+/+}	COL4A3 ^{-/-}	EN-COL4A3 ^{-/-}	IB-COL4A3 ^{-/-}
n	9	17	14	12
Anteil PCNA-positiver glomerulärer Zellen an der glom. Gesamtzellzahl ($P_{ANOVA} = 0,422$)				
MW [%]	25,77	26,09	21,78	20,60
SD	9,37	8,43	11,41	11,79
SEM	3,12	2,05	3,05	3,40
P(vs WT)	-	-	-	-
P(vs COL4A3 ^{-/-})	-	-	-	-
P(EN vs IB)	-		-	
glomeruläre Gesamtzellzahl pro Glomerulus ($P_{KW} < 0,001$)				
MW	38,44	68,93	68,63	46,49
SD	4,61	8,95	15,10	18,10
SEM	1,54	2,17	4,04	5,22
P(vs WT)	-	< 0,001	< 0,001	0,986
P(vs COL4A3 ^{-/-})	< 0,001	-	1,000	< 0,001
P(EN vs IB)	-		< 0,001	
Anteil PCNA-positiver tubulärer Zellen an der tubulären Gesamtzellzahl ($P_{ANOVA} < 0,001$)				
MW [%]	2,01	11,52	10,04	6,90
SD	1,10	3,77	5,27	6,82
SEM	0,37	0,91	1,41	1,97
P(vs WT)	-	< 0,001	0,002	0,153
P(vs COL4A3 ^{-/-})	< 0,001	-	1,00	0,084
P(EN vs IB)	-		0,618	
Anteil PCNA-positiver interstitieller Zellen an der interst. Gesamtzellzahl ($P_{KW} = 0,039$)				
MW [%]	7,61	15,44	12,46	11,75
SD	2,71	5,86	8,53	9,62
SEM	0,90	1,42	2,28	2,78
P(vs WT)	-	< 0,050	> 0,050	-
P(vs COL4A3 ^{-/-})	< 0,050	-	-	> 0,050
P(EN vs IB)	-		-	
Anteil der interstitiellen Gesamtzellzahl an der tubulointerst. Gesamtzellzahl ($P_{KW} < 0,001$)				
MW	0,25	0,53	0,43	0,36
SD	0,01	0,05	0,06	0,12
SEM	0,00	0,01	0,02	0,03
P(vs WT)	-	< 0,001	< 0,001	< 0,007
P(vs COL4A3 ^{-/-})	< 0,001	-	0,002	< 0,001
P(EN vs IB)	-		0,130	

3 Ergebnisse

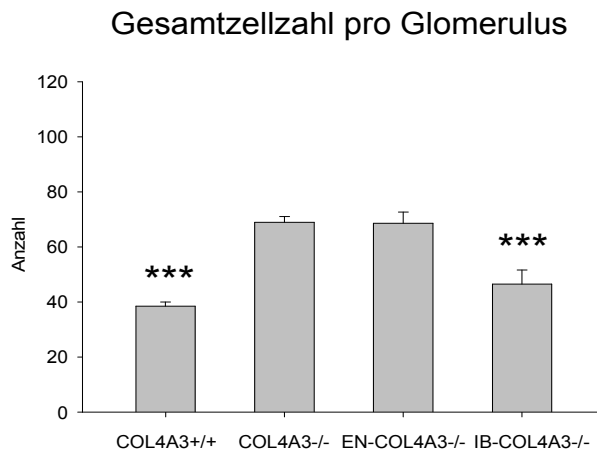


Abb. 16: Balkendiagramm zur Darstellung der Mittelwerte der durch Auszählung ermittelten glomerulären Gesamtzellzahl in den einzelnen Gruppen.

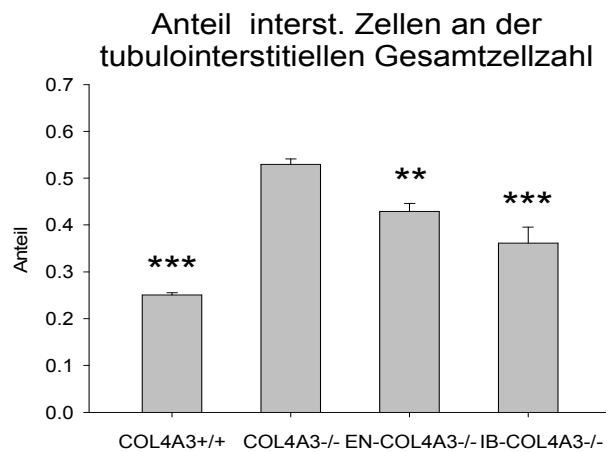


Abb. 17: Balkendiagramm zur Darstellung der Mittelwerte des durch Auszählung ermittelten Anteils der interstitiellen Gesamtzellzahl an der tubulointerstitiellen Gesamtzellzahl in den einzelnen Gruppen.

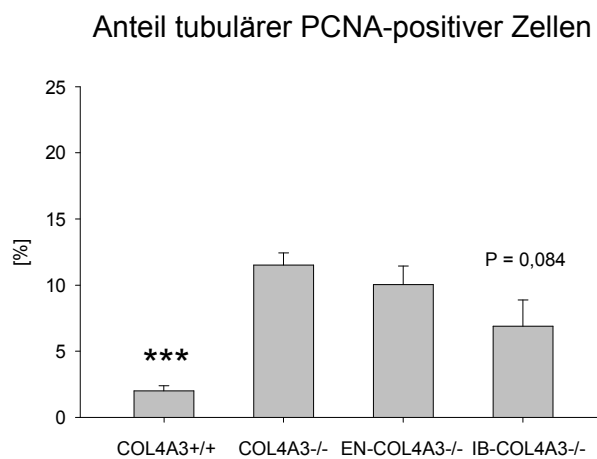


Abb. 18: Balkendiagramm zur Darstellung der Verteilung der Einzelwerte des durch Auszählung ermittelten Anteils PCNA-positiver tubulärer Zellen an der interstitiellen Gesamtzellzahl in den einzelnen Gruppen

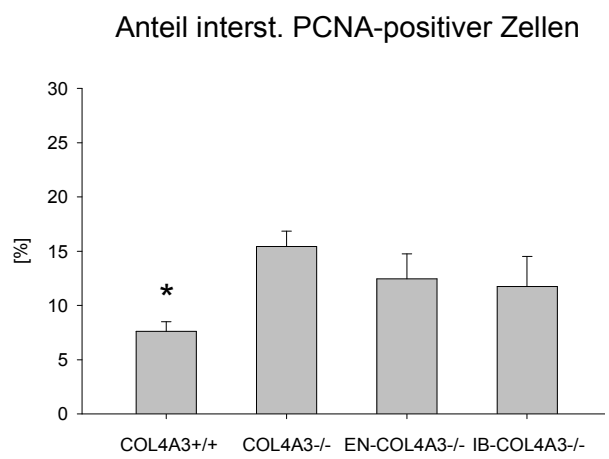


Abb. 19: Balkendiagramm zur Darstellung der Verteilung der Einzelwerte des durch Auszählung ermittelten Anteils PCNA-positiver interstitieller Zellen an der interstitiellen Gesamtzellzahl in den einzelnen Gruppen

Die quantitative Auswertung der PCNA-Immunhistochemie ergibt keine signifikanten Unterschiede des Anteils der PCNA-positiven glomerulären Zellen an der glomerulären Gesamtzellzahl zwischen den einzelnen Gruppen (siehe Tab. 11, S. 49, Diagramm nicht gezeigt), obwohl die PCNA-Immunhistochemie bei Kollagen-4A3-defizienten Tieren eine ausgeprägte Proliferation auch in den Glomeruli zeigt (siehe Abb. 28, B, S. 59). Aufgrund einer im Vergleich zu Wildtyp-Tieren signifikant erhöhten glomerulären Gesamtzellzahl pro Glomerulus bei Kollagen-4A3-defizienten Tieren ergibt sich daher trotz der absolut erhöhten Anzahl proliferierender glomerulärer Zellen rechnerisch kein Unterschied des Anteils der PCNA-positiven glomerulären Zellen. Nach Irbesartan-Behandlung findet sich wie bei Wildtyp-Tieren eine signifikant niedrigere glomeruläre Gesamtzellzahl pro Glomerulus im Vergleich zu unbehandelten Kollagen-4A3-defizienten Mäusen (siehe Tab. 11, S. 49; Abb. 16, S. 50). Kollagen-4A3-defiziente Tiere zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren einen

3 Ergebnisse

signifikant erhöhten Anteil PCNA-positiver Tubulus-Zellen und interstitieller Zellen (siehe Tab. 11, S. 49; Abb. 18 und 19, S. 50). Nach Enalapril-Medikation zeigt sich nur ein geringfügig verminderter Anteil PCNA-positiver Tubulus-Zellen und PCNA-positiver Zellen im Interstitium im Vergleich zu unbehandelten Kollagen-4A3-defizienten Tieren.

Die IB-COL4A3^{-/-}-Gruppe weist einen um 40 % geringeren Anteil PCNA-positiver Tubulus-Zellen und einen um 24 % geringeren Anteil PCNA-positiver interstitieller Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kollagen-4A3-defizienten Tieren auf. Allerdings zeigen die Unterschiede des Anteils tubulärer bzw. interstitieller PCNA-positiver Zellen zwischen den behandelten und unbehandelten COL4A3^{-/-}-Tieren und zwischen den EN- und IB-COL4A3^{-/-}-Tieren im Vergleich miteinander keine Signifikanz.

Die Auszählung von interstitiellen Zellen und Tubuluszellen im Nierenparenchym zeigt bei Kollagen-4A3-defizienten Tieren einen signifikant höheren Anteil interstitieller Zellen an der tubulointerstitiellen Gesamtzellzahl im Vergleich zu Wildtyptieren (siehe Tab. 11, S. 49; Abb. 17, S. 50). Die EN-COL4A3^{-/-}- und v.a. die IB-COL4A3^{-/-}-Gruppe weisen einen im Vergleich zu unbehandelten Kollagen-4A3-defizienten Tieren signifikant niedrigeren Anteil interstitieller Zellen an der tubulointerstitiellen Gesamtzellzahl auf. Zwischen EN- und IB-COL4A3^{-/-}-Tieren im Vergleich miteinander zeigt der Unterschied des Anteils interstitieller Zellen an der tubulointerstitiellen Gesamtzellzahl keine Signifikanz.

3.3.2 Exemplarische histologische Darstellung proliferierender Zellen

Die Abbildungen 28 - 30 des Kapitels 3.6 (S. 59 - 60) des Ergebnisteils zeigen zur Darstellung der Unterschiede der Zellproliferation in den verschiedenen Versuchsgruppen Gewebeschnitte, bei denen die Zellkerne proliferierender Zellen durch PCNA-Immunhistochemie angefärbt wurden.

Dabei weisen Wildtyptiere (siehe Abb. 28, A, S. 59) nur vereinzelt proliferierende Zellen in den Tubuli und im Interstitium auf. Im Gegensatz dazu zeigen unbehandelte Kollagen-4A3-defiziente Mäuse eine ausgeprägte Anfärbung sowohl tubulärer als auch interstitieller PCNA-positiver Zellen (siehe Abb. 28, B, S. 59).

Bei EN-COL4A3^{-/-}-Tieren finden sich ebenfalls zahlreiche proliferierende tubuläre und interstitielle Zellen (siehe Abb. 28, C, S. 59), wohingegen nach Irbesartan-Medikation Kollagen-4A3-defiziente Tiere im Vergleich zu unbehandelten Kollagen-4A3-defizienten Tieren einen geringeren Anteil PCNA-positiver Zellen in den Tubuli und im Interstitium aufweisen (siehe Abb. 28, D, S. 59).

Die α -Glattmuskelaktin-PCNA-Doppelimmunfluoreszenz und die S100A4-PCNA-Doppelimmunfluoreszenz des Nierengewebes Kollagen-4A3-defizienter Tiere zeigen, dass sowohl die Myofibroblasten als auch die FSP-1-positiven Fibroblasten in der fibrotischen Niere proliferieren (siehe Abb. 29 und 30, S. 60).

3.4 Expression des BMP-7 und des ALK-3

3.4.1 mBMP-7- und mALK-3-RT-PCR und BMP-7-Immunhistochemie

Tab. 12: Relative Expression von mBMP-7 und mALK-3

Gruppe	COL4A3 ^{+/+}	COL4A3 ^{-/-}	EN-COL4A3 ^{-/-}	IB-COL4A3 ^{-/-}
n	8	17	14	12
RT-PCR: mBMP-7 ($P_{ANOVA} < 0,001$)				
MW rel. Expr.	1,02	0,52	0,60	1,06
SD	0,21	0,34	0,44	0,36
SEM	0,08	0,08	0,12	0,10
P(vs WT)	-	0,014	0,076	1,000
P(vs COL4A3 ^{-/-})	0,014	-	1,000	0,001
P(EN vs IB)	-		0,014	
RT-PCR: mALK-3 ($P_{KW} = 0,011$)				
MW rel. Expr.	1,08	1,06	1,92	2,42
SD	0,49	0,84	1,41	1,02
SEM	0,17	0,20	0,38	0,29
P(vs WT)	-	1,000	0,438	0,039
P(vs COL4A3 ^{-/-})	1,000	-	0,158	0,006
P(EN vs IB)	-		1,000	

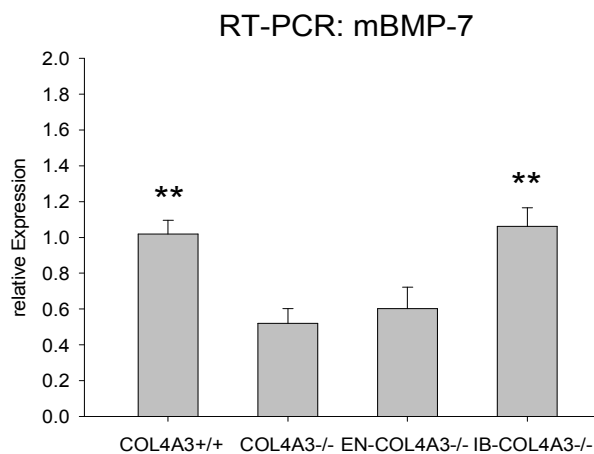


Abb. 20: Balkendiagramm zur Darstellung der Mittelwerte der mittels RT-PCR gemessenen relativen Expression von mBMP-7 in den einzelnen Gruppen.

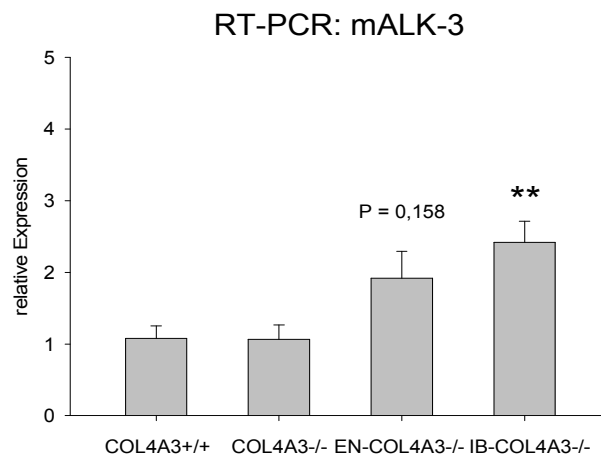


Abb. 21: Balkendiagramm zur Darstellung der Mittelwerte der mittels RT-PCR gemessenen relativen Expression von mALK-3 in den einzelnen Gruppen.

Die RT-PCR auf mBMP-7 zeigt eine signifikant verminderte relative Expression von mBMP-7 bei Kollagen-4A3-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp (siehe Tab. 12, Abb. 20 und 21). Der Unterschied ist nach Enalapril-Medikation weniger stark ausgeprägt. IB-COL4A3^{-/-}-Tiere weisen keinen Unterschied der relativen Expression von mBMP-7 im Vergleich zum Wildtyp auf, dagegen eine signifikant stärkere mBMP-7-Expression im Vergleich zu unbehandelten Tieren und im Vergleich zur EN-COL4A3^{-/-}-Gruppe.

3 Ergebnisse

Die geringere Expression von mBMP-7 lässt sich auch mittels Immunhistochemie darstellen (siehe Abb. 31, C - E, S. 61). Mittels RT-PCR auf mALK-3 stellt sich zwischen Wildtyp-Tieren und Kollagen-4A3-defizienten Tieren kein Unterschied der relativen Expression von mALK-3 dar, wohingegen diese bei EN-COL4A3^{-/-}- und IB-COL4A3^{-/-}-Tieren im Vergleich zu Wildtyp- und Kollagen-4A3-defizienten Tieren signifikant erhöht ist und keinen signifikanten Unterschied zwischen der EN- und der IB-COL4A3^{-/-}-Gruppe aufweist.

3.5 Expression des PAI-1 und des uPAR

3.5.1 mPAI-1- und muPAR-RT-PCR

Tab. 13: Relative Expression von mPAI-1 und muPAR

Gruppe	COL4A3 ^{+/+}	COL4A3 ^{-/-}	EN-COL4A3 ^{-/-}	IB-COL4A3 ^{-/-}
n	8	16	14	12
RT-PCR: mPAI-1 (P _{KW} < 0,001)				
MW rel. Expr.	1,19	39,21	17,84	13,61
SD	0,85	39,52	12,89	14,35
SEM	0,30	9,88	3,44	4,14
P(vs WT)	-	0,005	0,802	1,000
P(vs COL4A3 ^{-/-})	0,005	-	0,131	0,054
P(EN vs IB)	-		1,000	
RT-PCR: muPAR (P _{KW} < 0,001)				
MW rel. Expr.	1,17	7,53	9,21	5,55
SD	0,73	2,94	4,53	5,39
SEM	0,26	0,73	1,21	1,56
P(vs WT)	-	0,003	< 0,001	0,115
P(vs COL4A3 ^{-/-})	0,003	-	1,000	1,000
P(EN vs IB)	-		0,138	

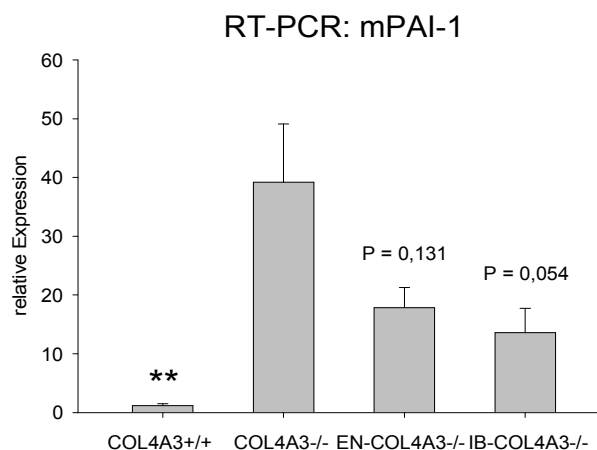


Abb. 22: Balkendiagramm zur Darstellung der Mittelwerte der mittels RT-PCR gemessenen relativen Expression von mPAI-1 in den einzelnen Gruppen.

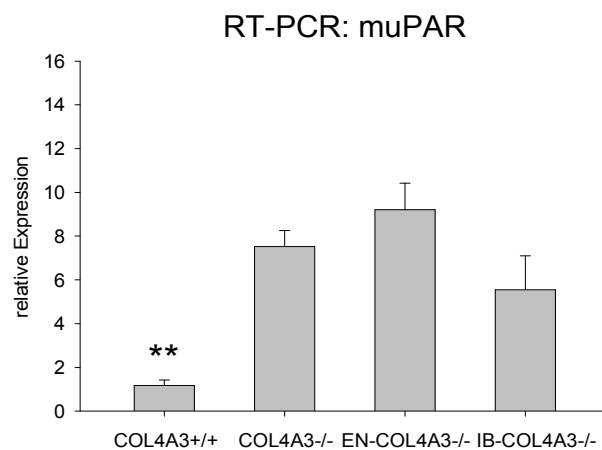


Abb. 23: Balkendiagramm zur Darstellung der Mittelwerte der mittels RT-PCR gemessenen relativen Expression von muPAR in den einzelnen Gruppen.

3 Ergebnisse

Kollagen-4A3-defiziente Tiere weisen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren in der RT-PCR eine signifikant um das Vielfache erhöhte relative Expression von mPAI-1 und muPAR auf (siehe Tab. 13, Abb. 22 und 23, S. 53). Im Vergleich zu unbehandelten Kollagen-4A3-defizienten Tieren zeigen EN-COL4A3^{-/-}-Tiere eine um 54 % und IB-COL4A3^{-/-}-Tiere eine um 65 % geringere mPAI-1-Expression knapp an der Signifikanzgrenze. Der Unterschied der mPAI-1-Expression der EN- und der IB-COL4A3^{-/-}-Gruppe im Vergleich miteinander weist keine Signifikanz auf. Die muPAR-Expression zeigt bei behandelten Kollagen-4A3-defizienten Tieren im Vergleich miteinander und im Vergleich zu unbehandelten keine signifikanten Unterschiede.

3.5.2 PAI-1-Immunfluoreszenz

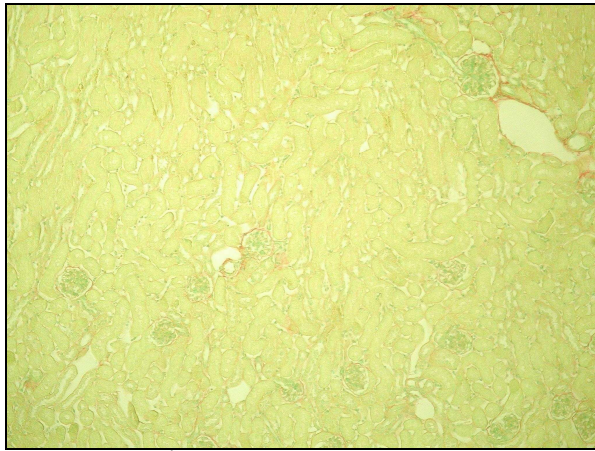
Die Abbildungen 32 und 33 des Kapitels 3.6 (S. 62 - 63) des Ergebnisteils zeigen Gewebeschnitte, die mittels PAI-1-Immunfluoreszenz und PAI-1- α -Glattmuskelaktin-Doppelimmunfluoreszenz zur Darstellung der Unterschiede der PAI-1-Expression zwischen den einzelnen Versuchsgruppen angefärbt wurden.

In der PAI-1-Immunfluoreszenz zeigt sich eine verstärkte Expression von PAI-1 im fibrotischen Nierenparenchym Kollagen-4A3-defizienter Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (siehe Abb. 32, B, S. 62), welche v.a. nach Irbesartan-Medikation geringer ausgeprägt ist (siehe Abb. 32, D, S. 62). Eine verstärkte PAI-1-Expression in fibrotischen Nieren Kollagen-4A3-defizienter Tiere wird auch durch die PAI-1- α -Glattmuskelaktin-Doppelimmunfluoreszenz dargestellt (siehe Abb. 32, F, S. 62).

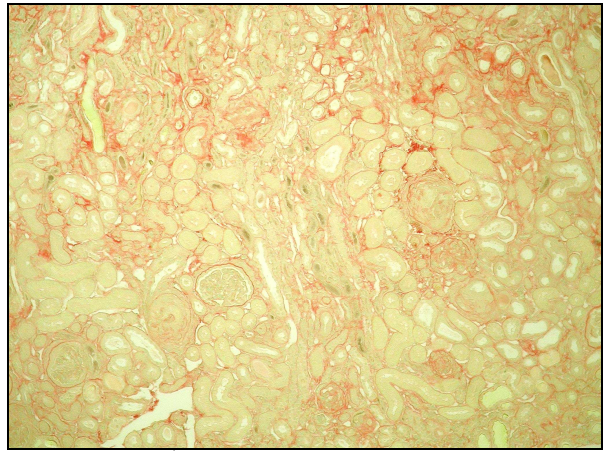
PAI-1- und AQP-1- bzw. AQP-2-IF angrenzender Schnitte zeigt, dass sich eine vermehrte PAI-1-Expression im fibrotischen Nierenparenchym Kollagen-4A3-defizienter Tiere v.a. in proximalen Tubuli findet (siehe Abb. 33, S. 63). Es zeigt sich außerdem, dass neben Tubuluszellen PAI-1 auch in randständigen, morphologisch Podozyten entsprechenden Zellen des Kapillarkonvolutes der Glomeruli exprimiert wird (siehe Abb. 32, E, S. 62).

3.6 Histologische Abbildungen

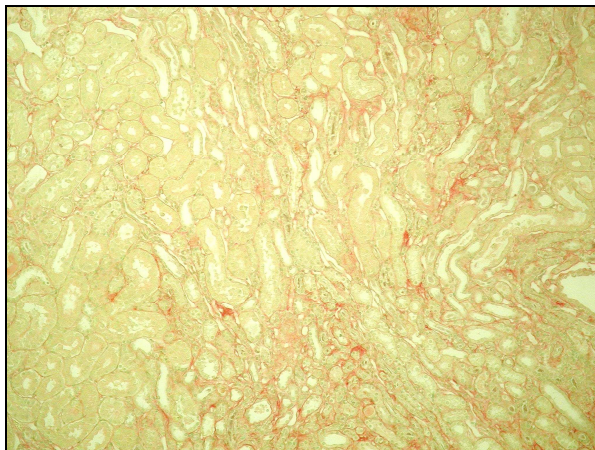
3.6.1 Methylgrün-Pikrosiriusrot-Färbung



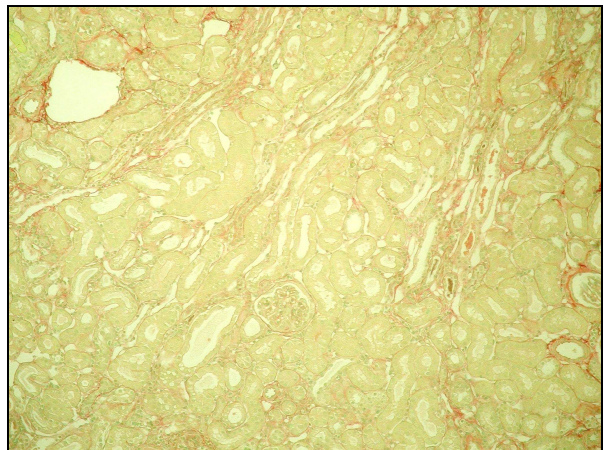
A: COL4A3^{+/+} (Tier 17)



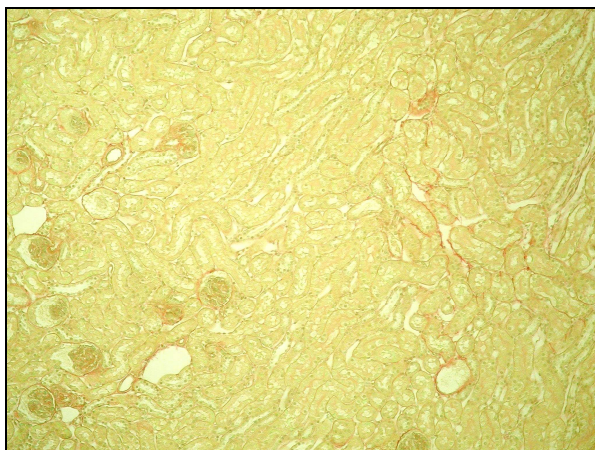
B: COL4A3^{-/-} (Tier 26)



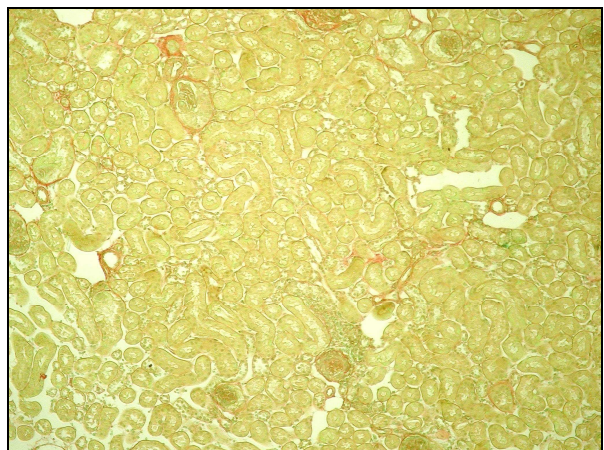
C: EN-COL4A3^{-/-} (Tier 83)



D: EN-COL4A3^{-/-} (Tier 88)



E: IB-COL4A3^{-/-} (Tier 77)



F: IB-COL4A3^{-/-} (Tier 79)

Abb. 24: Methylgrün-Pikrosiriusrot-Färbung

Vergrößerung: 100x. Kollagenfasern wurden rot angefärbt. Es findet sich bei Wildtyptieren (A) kaum eine Anfärbung von Kollagenfasern. Unbehandelte Kollagen-4A3-defiziente Mäuse zeigen eine ausgeprägte Akkumulation von interstitieller Matrix (B), nach Enalapril-Behandlung findet sich ebenfalls eine deutliche Anfärbung von Kollagenfasern (C, D), dagegen nur geringfügig nach Irbesartan-Gabe (E, F).

3.6.2 α -Glattmuskelaktin-Immunhistochemie (α SMA-IH)

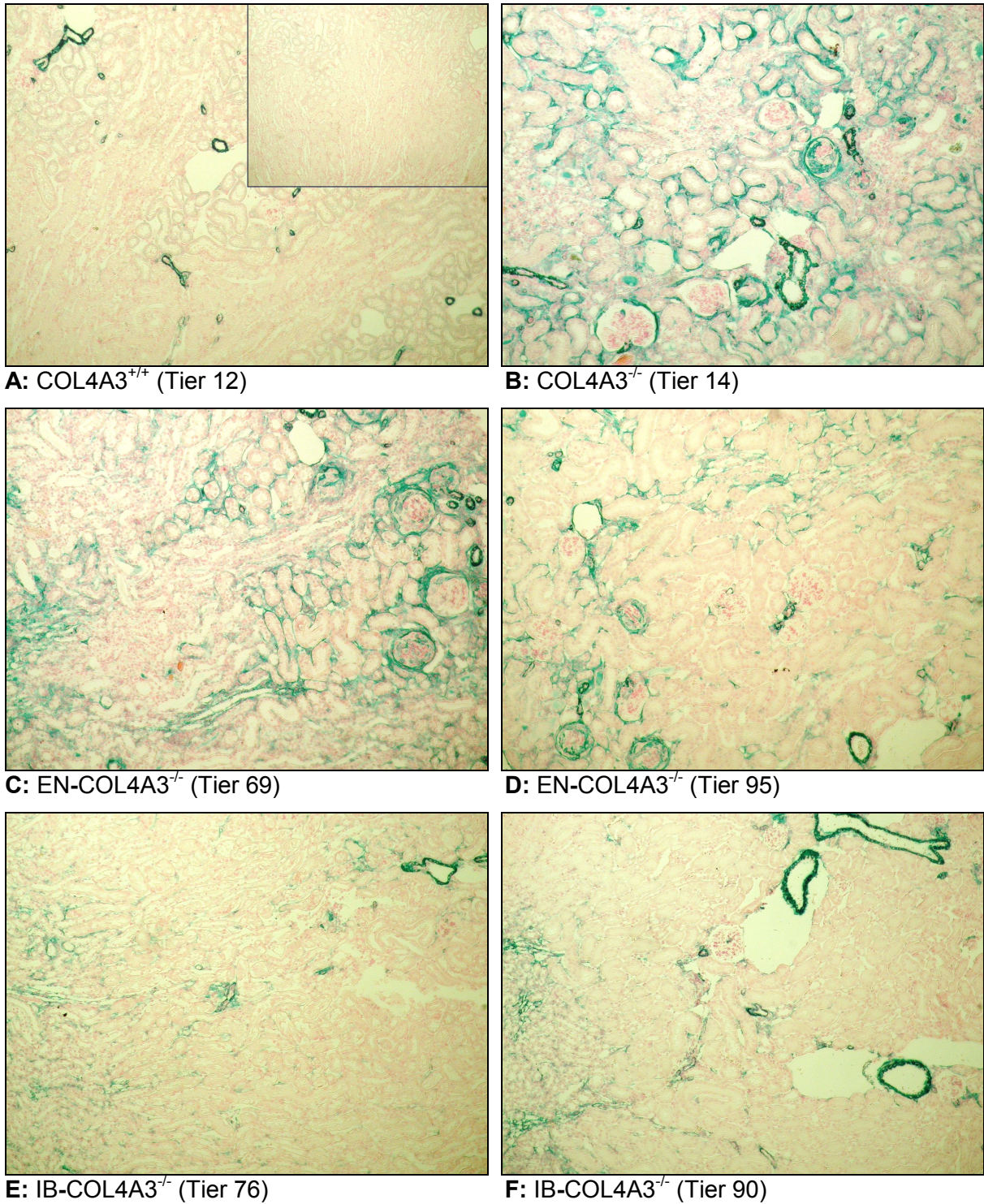
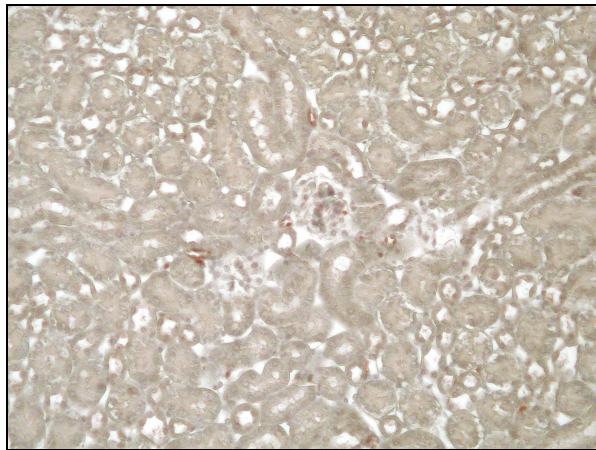


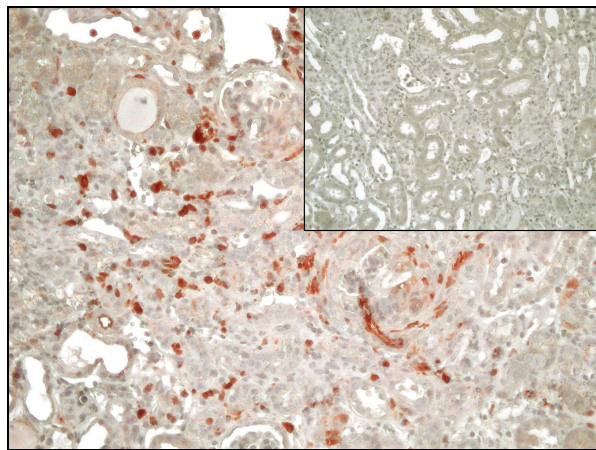
Abb. 25: α -Glattmuskelaktin-Immunhistochemie

Vergrößerung: 100x. α -Glattmuskelaktin exprimierende Zellen wurden grün angefärbt. Interstitielle Myofibroblasten stellen sich blassgrün und glatte Muskelzellen der Gefäße intensiv grün dar (= Positivkontrolle). Negativkontrolle in (A) gezeigt. Es finden sich bei Wildtyptieren (A) keine Myofibroblasten. Unbehandelte Kollagen-4A3-defiziente Mäuse zeigen eine deutliche Akkumulation von Myofibroblasten (B), die nach Enalapril-Medikation z.T. gleich stark (C), z.T. geringer (D) und nach Irbesartan-Gabe nur geringfügig ausgeprägt ist (E, F).

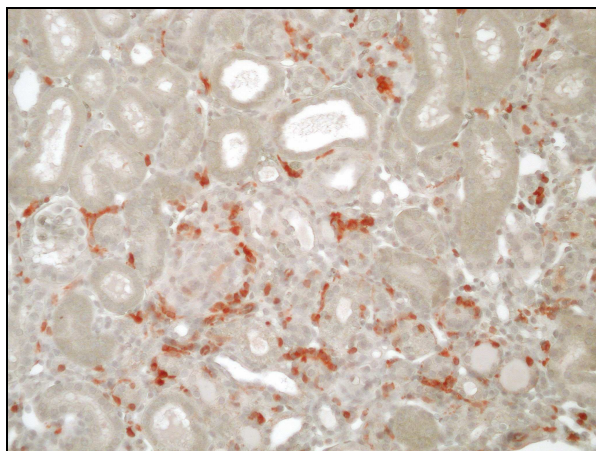
3.6.3 S100A4-Immunhistochemie



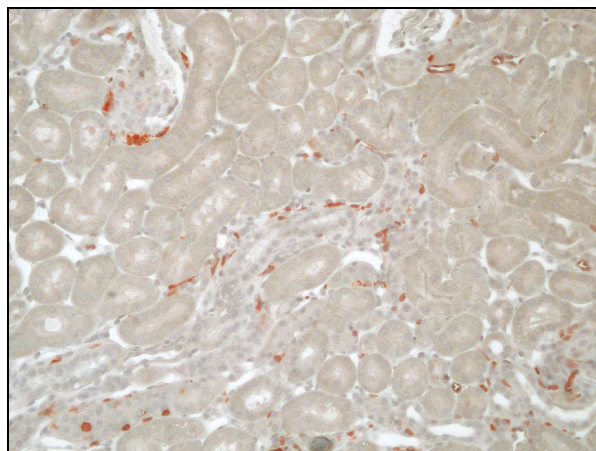
A: COL4A3^{+/+} (Tier 4)



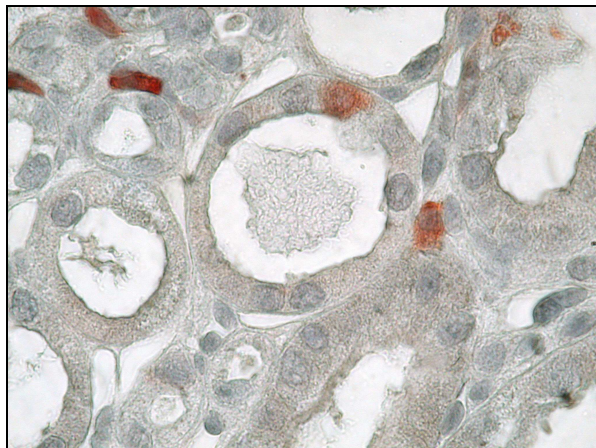
B: COL4A3^{-/-} (Tier 15)



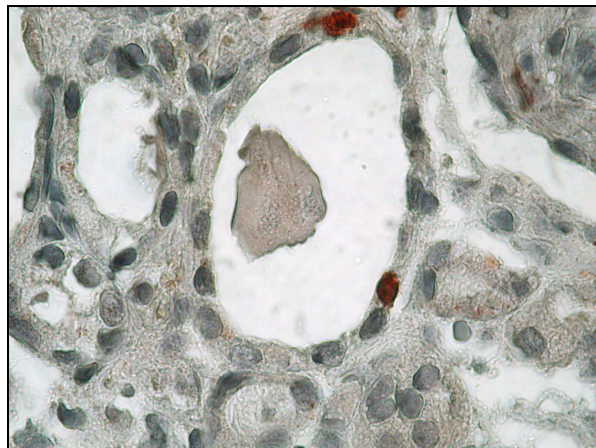
C: EN-COL4A3^{-/-} (Tier 87)



D: IB-COL4A3^{-/-} (Tier 97)



E: COL4A3^{-/-} (Tier 14)

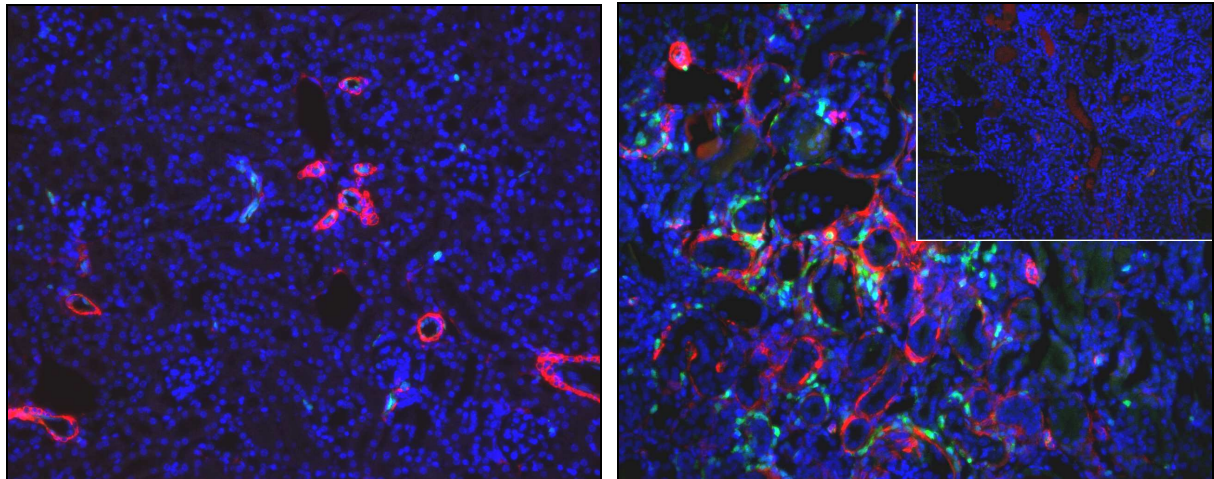


F: COL4A3^{-/-} (Tier 15)

Abb. 26: S100A4-Immunhistochemie

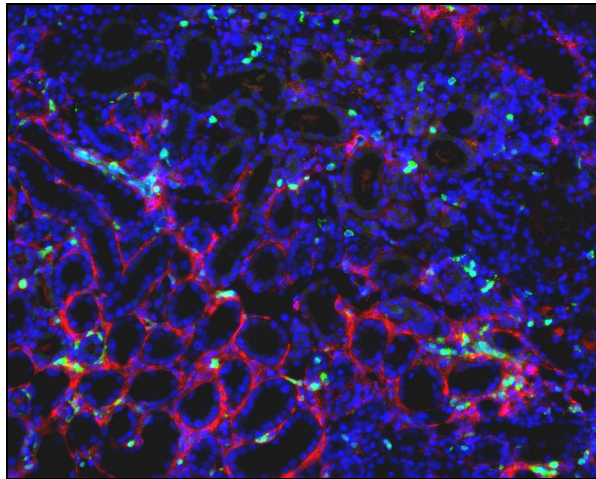
Vergrößerung: 200x (A - D) und 1000x (E, F). S100A4 exprimierende Zellen färben sich braunrot an. Negativkontrolle in (B) gezeigt. Es finden sich bei Wildtypmieren keine S100A4-positiven interstitiellen Zellen (A). Unbehandelte Kollagen-4A3-defiziente Tiere zeigen eine ausgeprägte Akkumulation S100A4 exprimierender Fibroblasten (B), ebenso nach Enalapril-Medikation (C). Nach Irbesartan-Gabe finden sich bei Kollagen-4A3-defizienten Tieren nur wenige S100A4 exprimierende Fibroblasten (D). Im fibrotischen Nierenparenchym Kollagen-4A3-defizienter Tiere lassen sich auch S100A4-positive Tubuluszellen darstellen (E, F).

3.6.4 α -Glattmuskelaktin-S100A4-Doppelimmunfluoreszenz

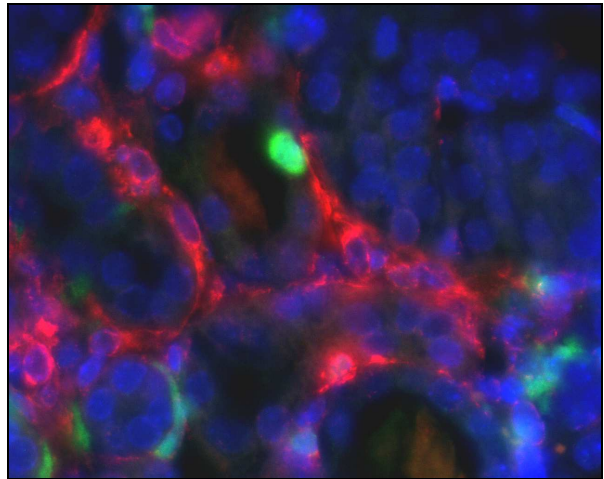


A: COL4A3^{+/+} (Tier 20)

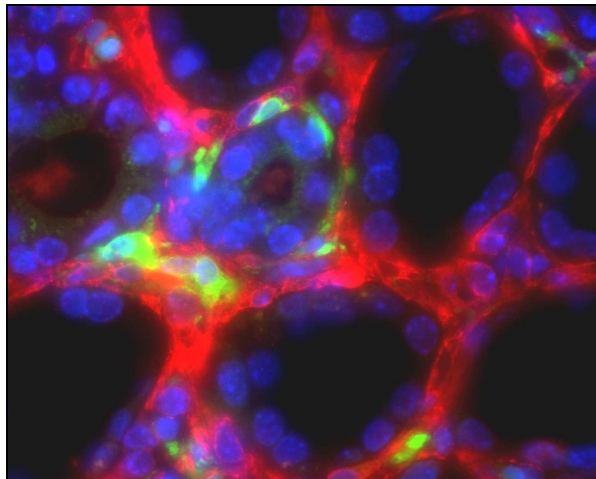
B: COL4A3^{-/-} (Tier 25)



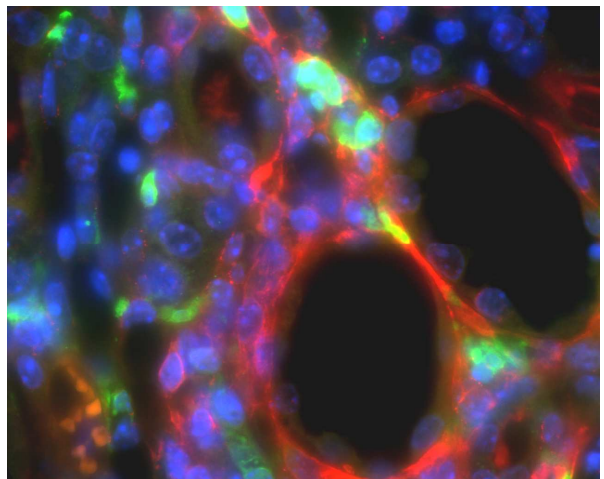
C: COL4A3^{-/-} (Tier 29)



D: COL4A3^{-/-} (Tier 25)



E: COL4A3^{-/-} (Tier 29)

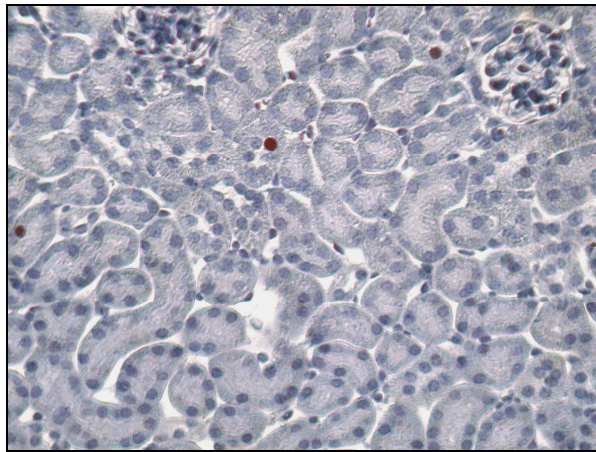


F: COL4A3^{-/-} (Tier 29)

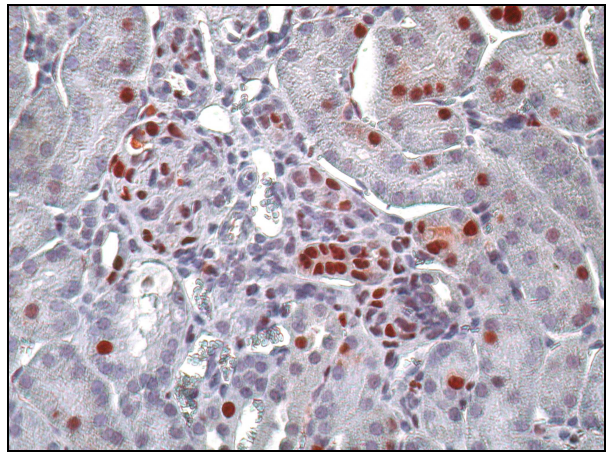
Abb. 27: α -Glattmuskelaktin-S100A4-Doppelimmunfluoreszenz

Vergrößerung: 200x (A, B, C) und 1000x (D, E, F). α -Glattmuskelaktin exprimierende Zellen zeigen eine rote und S100A4 exprimierende Zellen eine grüne Fluoreszenz. Negativkontrolle in (B) gezeigt. Es finden sich bei Wildtypieren kaum S100A4-positive interstitielle Zellen (A). Kollagen-4A3-defiziente Tiere zeigen eine ausgeprägte Akkumulation sowohl von α -Glattmuskelaktin exprimierenden Myofibroblasten als auch von S100A4 exprimierenden Fibroblasten, aber keine interstitiellen Zellen, die eine Doppelexpression beider Markerproteine aufweisen (B-F). Im fibrotischen Nierenparenchym Kollagen-4A3-defizienter Tiere lassen sich S100A4-positive Tubuluszellen darstellen (D).

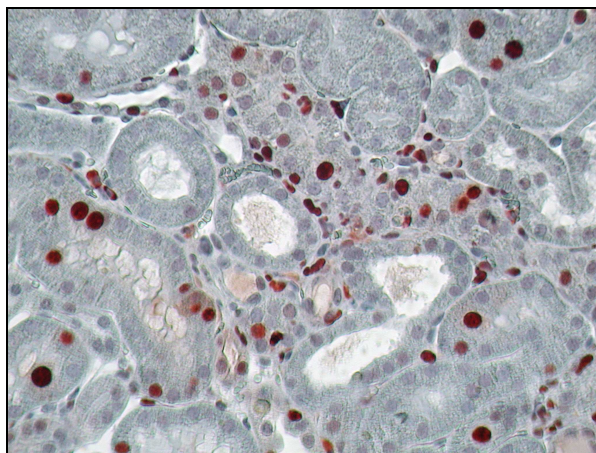
3.6.5 PCNA-Immunhistochemie



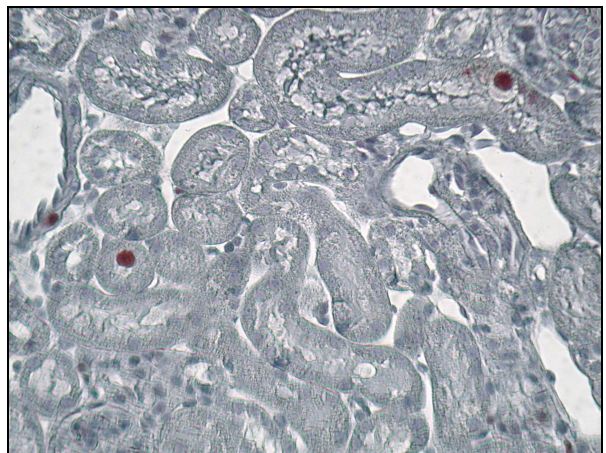
A: COL4A3^{+/+} (Tier 17)



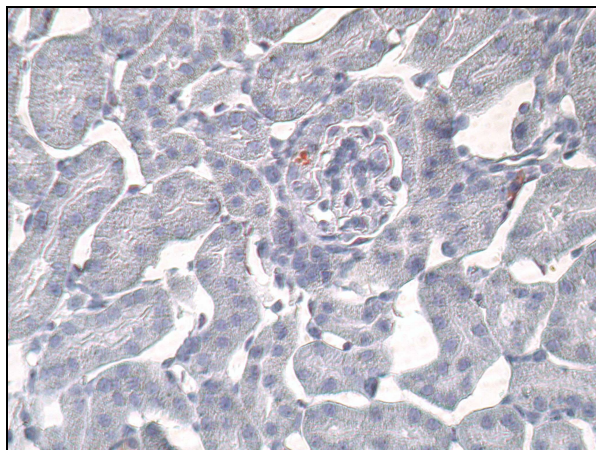
B: COL4A3^{-/-} (Tier 16)



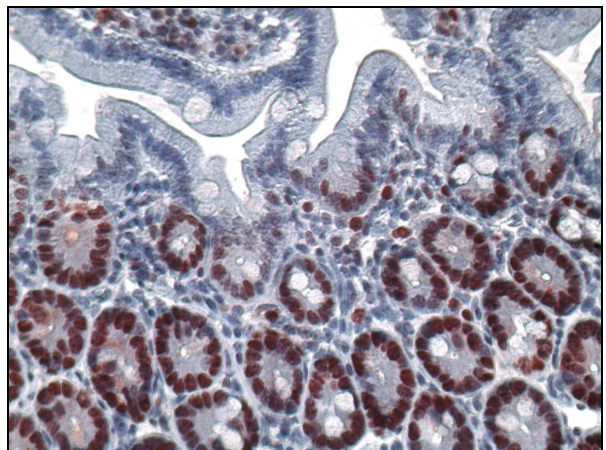
C: EN-COL4A3^{-/-} (Tier 95)



D: IB-COL4A3^{-/-} (Tier 79)



E: Negativkontrolle COL4A3^{-/-} (Tier 16)

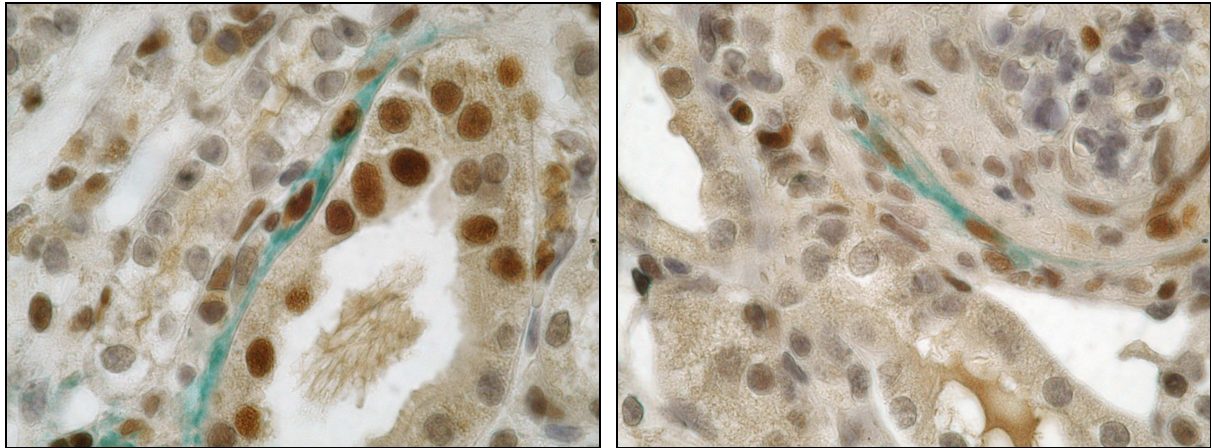


F: Positivkontrolle Jejunum (Tier 20)

Abb. 28: PCNA-Immunhistochemie

Vergrößerung: 400x. Zellkerne PCNA exprimierender, d.h. proliferierender Zellen stellen sich braunrot dar. Negativkontrolle (E) und Darmschleimhaut als Positivkontrolle (F). Im Gegensatz zu Wildtyptieren (A) finden sich bei unbehandelten Kollagen-4A3-defizienten Mäusen zahlreiche im Zellkern PCNA exprimierende, d.h. proliferierende tubuläre und interstitielle Zellen, ebenfalls nach Enalapril-Behandlung (C), dagegen nur vereinzelt nach Irbesartan-Gabe (D).

3.6.6 PCNA- α -Glattmuskelaktin-Doppelimmunhistochemie



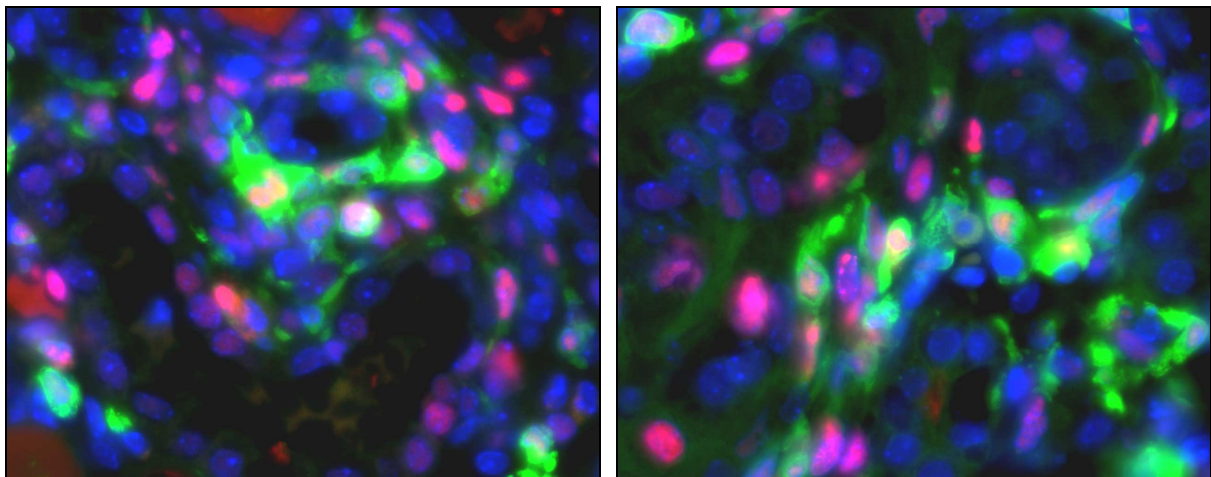
A: COL4A3^{-/-} (Tier 11)

B: COL4A3^{-/-} (Tier 11)

Abb. 29: PCNA- α -Glattmuskelaktin-Doppelimmunhistochemie

Vergrößerung: 1000x. Die Zellkerne proliferierender PCNA-positiver Zellen stellen sich braunrot, α -Glattmuskelaktin exprimierende Myofibroblasten stellen sich grün dar. Dabei zeigen einige interstitielle Zellen Doppelexpression von PCNA und α -Glattmuskelaktin.

3.6.7 PCNA-S100A4-Doppelimmunfluoreszenz



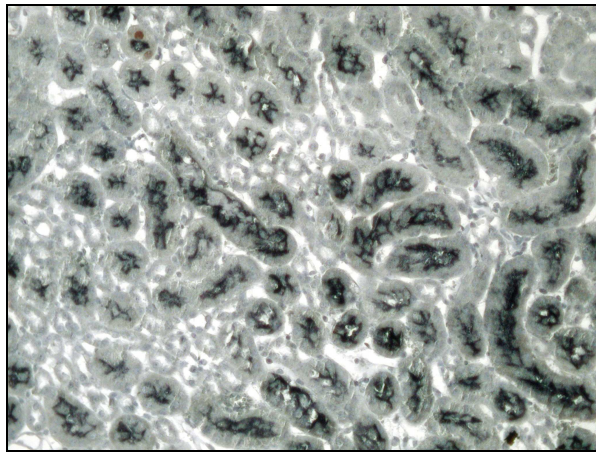
A: COL4A3^{-/-} (Tier 7)

B: COL4A3^{-/-} (Tier 7)

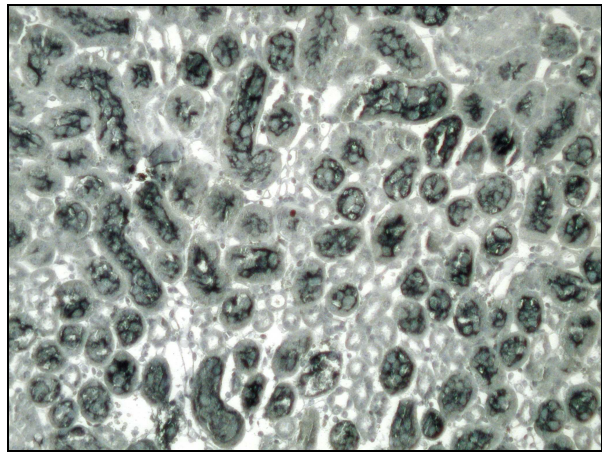
Abb. 30: PCNA-S100A4-Doppelimmunfluoreszenz

Vergrößerung: 1000x. Die Zellkerne proliferierender Zellen stellen sich rot, S100A4 exprimierende Fibroblasten stellen sich grün dar. Dabei zeigen einige interstitielle Zellen eine Doppelexpression von PCNA und S100A4.

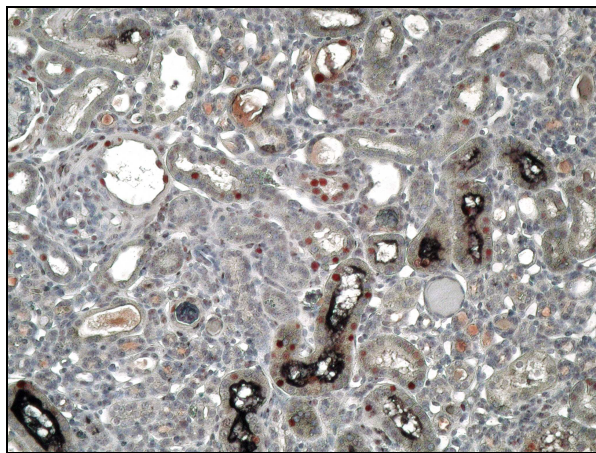
3.6.8 PCNA-BMP-7-Doppelimmunhistochemie



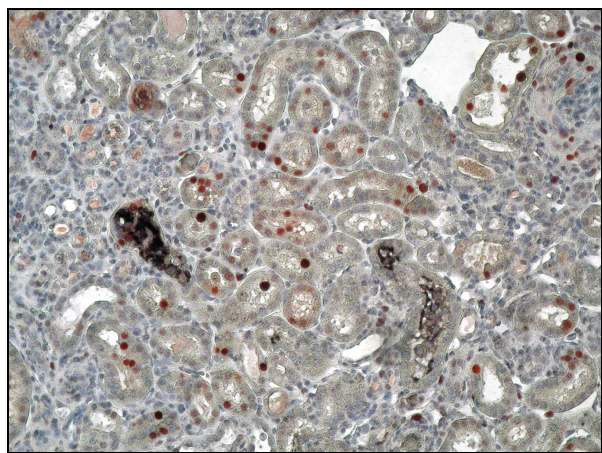
A: COL4A3^{+/+} (Tier 21)



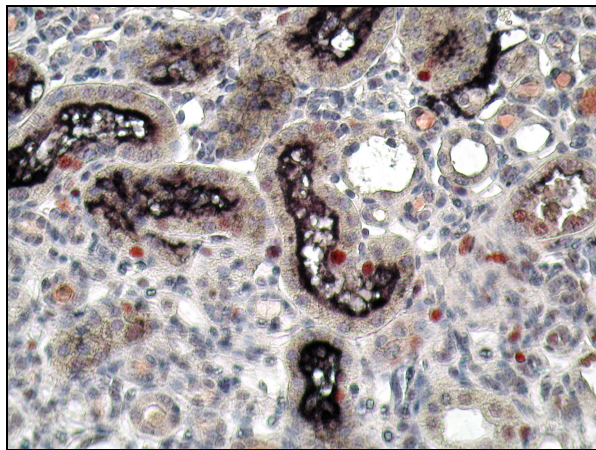
B: COL4A3^{+/+} (Tier 21)



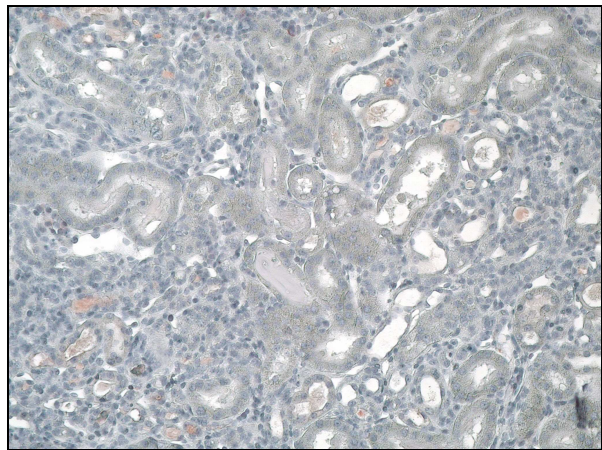
C: COL4A3^{-/-} (Tier 26)



D: COL4A3^{-/-} (Tier 26)



E: COL4A3^{-/-} (Tier 26)

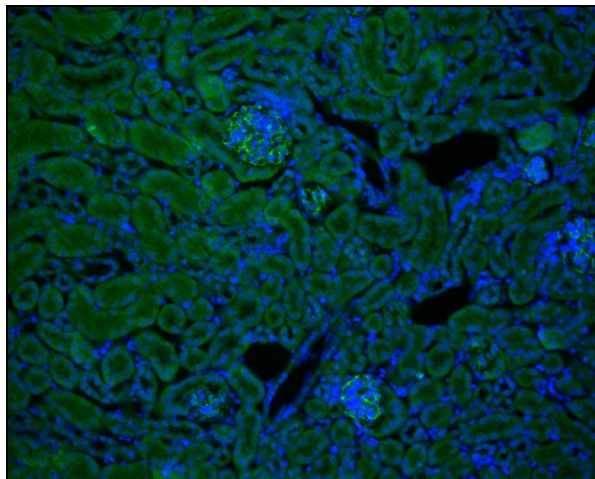


F: Negativkontrolle COL4A3^{-/-} (Tier 26)

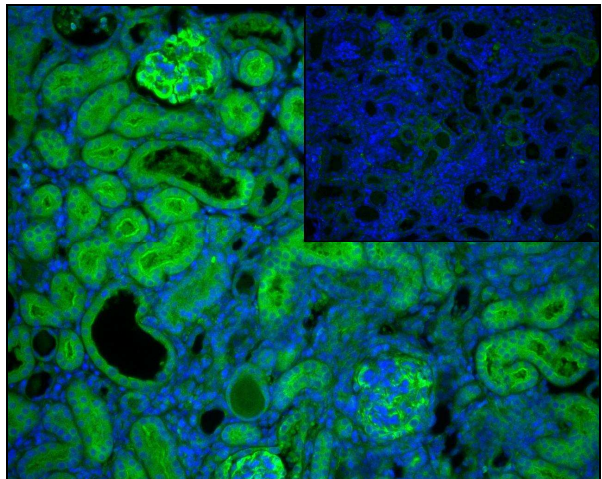
Abb. 31: BMP-7-PCNA-Doppelimmunhistochemie

Vergrößerung: 200x (A - D, F) und 400x (E). BMP-7 stellt sich schwarz, Zellkerne PCNA exprimierender, d.h. proliferierender Zellen stellen sich braunrot dar. Negativkontrolle (F). Bei Wildtyptieren finden sich zahlreiche luminal BMP-7 exprimierende Tubuli (A, B). Unbehandelte Kollagen-4A3-defiziente Tiere weisen eine deutlich geringere Anzahl BMP-7 exprimierender Tubuli auf (C, D), zeigen aber vereinzelt auch BMP-7-Expression im Interstitium (E).

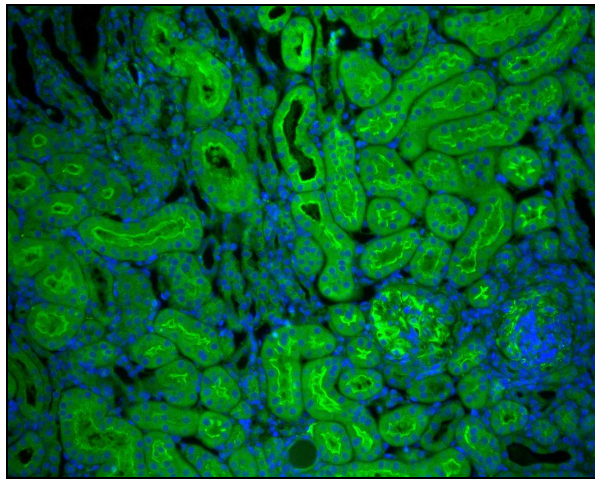
3.6.9 PAI-1-Immunfluoreszenz und PAI-1- α -Glattmuskelaktin-Doppelimmunfluoreszenz



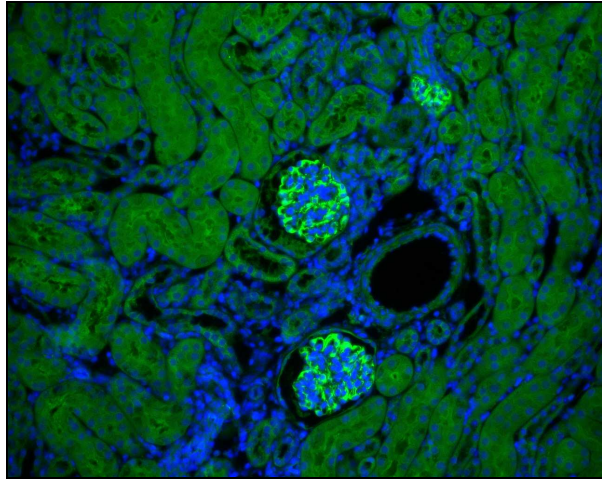
A: COL4A3^{+/+} (Tier 20)



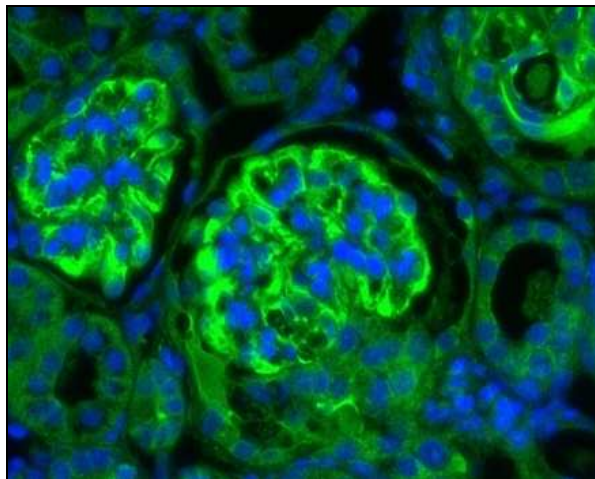
B: COL4A3^{-/-} (Tier 19)



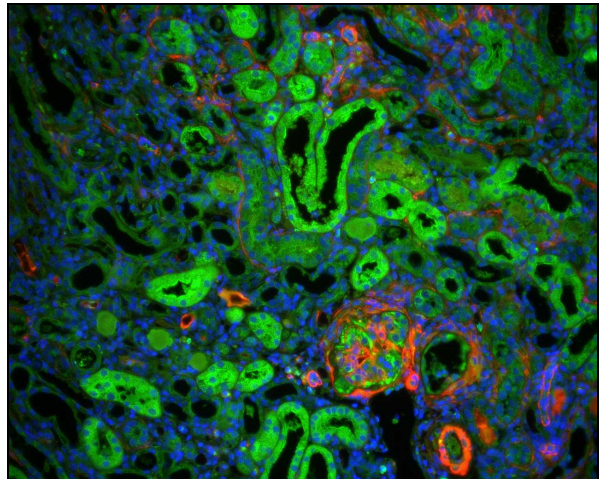
C: EN-COL4A3^{-/-} (Tier 93)



D: IB-COL4A3^{-/-} (Tier 77)



E: COL4A3^{-/-} (Tier 7) Glomeruli

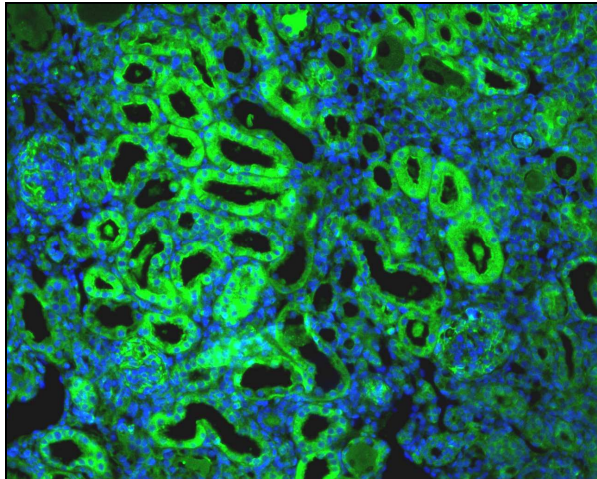


F: PAI-1- α SMA-DIF: COL4A3^{-/-} (Tier 15)

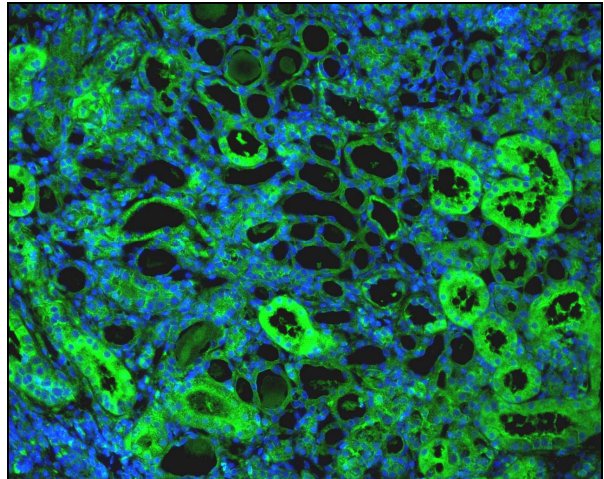
Abb. 32: PAI-1-Immunfluoreszenz (A - E) und PAI-1- α -Glattmuskelaktin-Doppelimmunfluoreszenz (F)

Vergrößerung: 200x (A - D, F) und 1000x (E). PAI-1 stellt sich leuchtend grün dar. Negativkontrolle in (B) gezeigt. Im Gegensatz zu Wildtyptieren (A) zeigen unbehandelte Kollagen-4A3-defiziente Tiere eine ausgeprägte Anfärbung von PAI-1 in den Glomeruli und luminal in den Tubuli, ebenfalls nach Enalapril-Behandlung (C), aber nur geringfügig nach Irbesartan-Medikation (D). In den Glomeruli Kollagen-4A3-defizienter Tiere wird PAI-1 in histomorphologisch Podozyten entsprechenden Zellen vermehrt exprimiert (E). Die PAI-1- α -Glattmuskelaktin-Doppelimmunfluoreszenz stellt ebenfalls die vermehrte PAI-1-Expression tubulärer Zellen im fibrotischen Nierenparenchym Kollagen-4A3-defizienter Tiere dar (F).

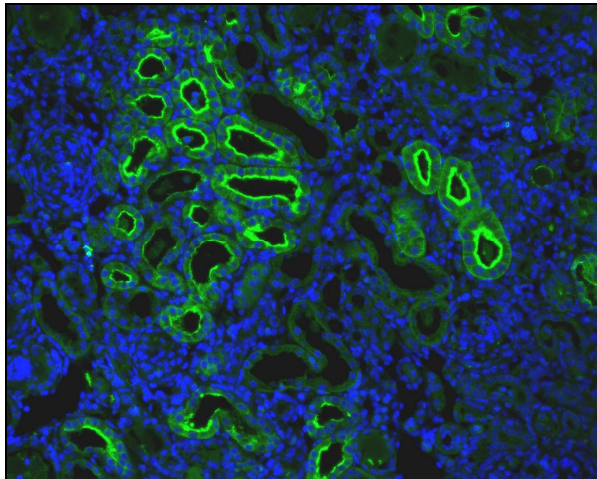
3.6.10 PAI-1-, AQP-1- und AQP-2-Immunfluoreszenz angrenzender Gewebeschnitte



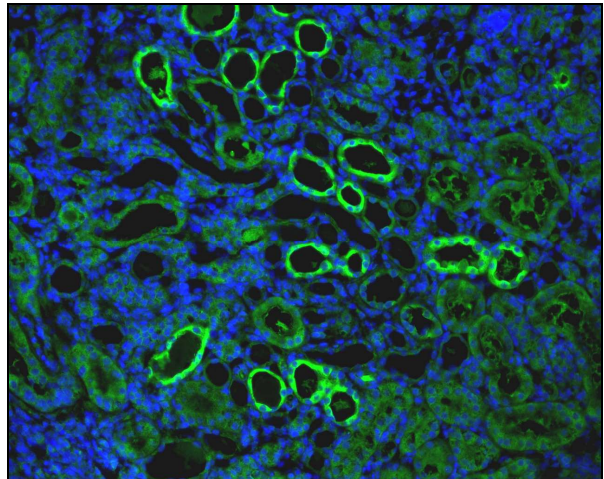
A1: PAI-1-IF COL4A3^{-/-} (Tier 14)



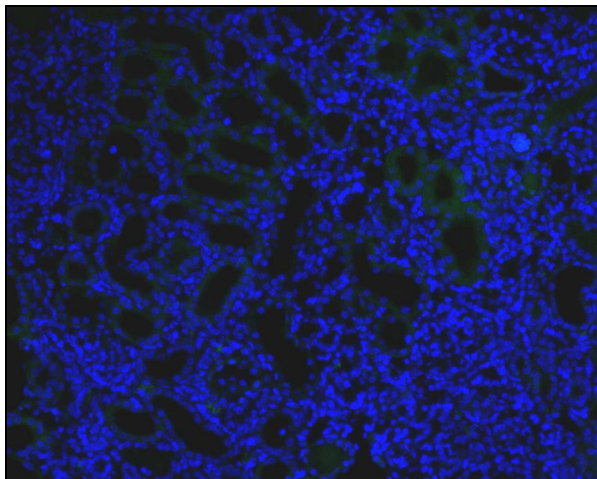
B1: PAI-1-IF COL4A3^{-/-} (Tier 11)



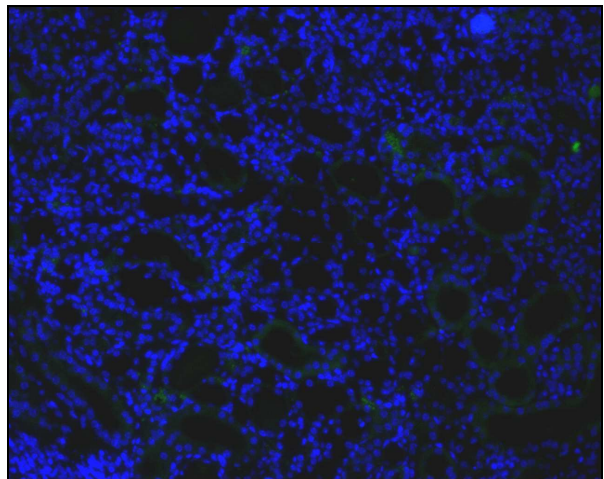
A2: AQP-1-IF COL4A3^{-/-} (Tier 14)



B2: AQP-2-IF COL4A3^{-/-} (Tier 11)



A3: Negativkontrolle COL4A3^{-/-} (Tier 14)



B3: Negativkontrolle COL4A3^{-/-} (Tier 11)

Abb. 33: PAI-1- und AQP-1- bzw. AQP-2-Immunfluoreszenz angrenzender Gewebeschnitte

Vergrößerung: 200x. PAI-1, AQP-1 und AQP-2 stellen sich leuchtend grün dar. Es wurden angrenzende Schnitte gefärbt (A1/2/3 und B1/2/3). Dabei zeigen sich eine PAI-1- und eine AQP-1-Expression in denselben Tubuli (A1/2), dagegen eine PAI-1- und AQP-2-Expression in verschiedenen Tubuli (B1/2).

4 Diskussion

4.1 Progressionsminderung der chronisch progredienten Niereninsuffizienz durch Blockade des lokalen Angiotensinsystems

Die ausgeprägten renoprotektiven Effekte infolge Blockade des Renin-Angiotensin-Systems bei Patienten mit chronisch progredienter Niereninsuffizienz sind seit den 1980er Jahren bekannt und mittlerweile unbestreitbar. Klinische randomisierte Studien innerhalb der letzten zehn Jahre, wie z.B. die REIN-Studie für Ramipril und die RENAAL-Studie für Losartan, konnten zeigen, dass die antihypertensiven Medikamentenklassen sowohl der ACE-Hemmer als auch der AT₁-Rezeptor-Antagonisten die klinischen Endpunkte, wie terminale Niereninsuffizienz oder Tod, hinauszögern (Brenner et al. 2001; Ruggenti et al. 2001). Allerdings lässt sich die Renoprotektion nicht allein durch die Blutdrucksenkung erklären. Vielmehr wirken diese Medikamente auch direkt antifibrotisch durch Blockade des lokalen Renin-Angiotensin-Systems der Nieren, wobei die genauen Mechanismen noch nicht komplett aufgeklärt sind. Klinische Studien, die das Potential beider Substanzgruppen zur Progressionsminderung des chronischen Nierenversagens direkt miteinander vergleichen, sind selten und legen das Hauptaugenmerk meist auf Surrogatparameter, wie Proteinurie und Retentionswerte. Einige Autoren berichten diesbezüglich keinen Unterschied (Gansevoort et al. 1994; Remuzzi et al. 1999), andere zeigen tendenziell eine etwas bessere Wirkung der ACE-Hemmer gegenüber AT₁-Rezeptor-Antagonisten (Lacourciere et al. 2000; Mogensen et al. 2000). Die ONTARGET-Studie, eine klinische Studie an über 20.000 Patienten, resultierte in einem vergleichbaren renalen Outcome nach Telmisartan- wie nach Ramipril-Medikation (Mann et al. 2008). Eine stärkere Progressionsminderung der chronischen Niereninsuffizienz durch die Medikation mit einem AT₁-Rezeptor-Inhibitor im Vergleich zu einem ACE-Hemmer konnte bei der diabetischen Nephropathie durch eine retrospektive klinische Studie gezeigt werden, wobei hier die Rate der Patienten vor Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz zu einem bestimmten Zeitpunkt analysiert wurde (Robles et al. 2009).

Es existieren allerdings nur wenige Studien, die die antifibrotischen Effekte beider Substanzgruppen anhand der Histologie direkt gegenüberstellen. In der vorliegenden Arbeit sollten der ACE-Hemmer Enalapril und der AT₁-Rezeptor-Antagonist Irbesartan miteinander verglichen werden bzgl. der Wirkung, die Progredienz des chronischen Nierenversagens und die renale Fibrosierung im Rahmen der Alport-Nephritis zu verlangsamen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Antagonisten in der Lage sind, eine Überlebenszeitverlängerung im Tiermodell der Kollagen-4A3-defizienten Tiere zu bewirken, wobei die Substanzen Ramipril und Candesartan angewandt wurden und der ACE-Hemmer Ramipril sich als effektiver erwies. In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass die

4 Diskussion

Unterschiede bei der Progressionsminderung der Alport-Nephritis durch ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Antagonisten nicht auf die antihypertensiven Effekte dieser Substanzklassen zurückzuführen sind (Gross et al. 2004), da sowohl behandelte als auch unbehandelte Kollagen-4A3-defiziente Tiere gleiche Blutdrucklevel zeigten und eine arterielle Hypertension beim Alport-Syndrom zu Beginn der Erkrankung im Allgemeinen nicht zu finden ist.

In der vorliegenden Studie wurde am Tiermodell der Kollagen-4A3-defizienten Mäuse bestätigt, dass eine Progressionsminderung der chronisch progredienten Niereninsuffizienz aufgrund einer Alport-Nephritis mittels Blockade des Angiotensinsystems erreichbar ist. Dabei zeigte sich zunächst, dass die Medikation sowohl mit dem ACE-Hemmer Enalapril als auch mit dem AT₁-Rezeptor-Antagonisten Irbesartan bei Kollagen-4A3-defizienten Mäusen zu einer signifikanten Verminderung der Retentionswerte Kreatinin und Harnstoff-N im Serum im Vergleich zu unbehandelten Tieren führt. Dies bestätigt, dass sich die Einschränkung der Nierenfunktion aufgrund der Alport-Nephritis durch Blockade des Angiotensinsystems verlangsamen lässt, wobei sich hier ein stärkerer Effekt des AT₁-Rezeptor-Antagonisten im Vergleich zum ACE-Hemmer zeigte. Neben der Nierenfunktionseinschränkung verzögert die Blockade des Angiotensinsystems im Tiermodell der Kollagen-4A3-defizienten Mäuse auch die renale Fibrosierung, welche als morphologisches Korrelat des chronischen Nierenversagens gilt. Im Rahmen der Alport-Nephritis wurde dies bereits für die Substanzen Ramipril und Candesartan eindrucksvoll gezeigt (Gross et al. 2004). Auch in der vorliegenden Dissertationsarbeit führte die Medikation mit dem AT₁-Rezeptor-Antagonisten Irbesartan zu einer deutlichen Reduktion der tubulointerstitiellen Fibrose bei Kollagen-4A3-defizienten Tieren, wohingegen der ACE-Hemmer Enalapril nur bei einzelnen Versuchstieren eine Verzögerung der Fibrosierung bewirkte. Dabei zeigte sich, dass es v.a. nach Irbesartan-Medikation neben der verminderten Anhäufung von Kollagenfasern im Interstitium auch zu einer Reduktion der Akkumulation von Myofibroblasten und FSP-1-positiven Fibroblasten sowie des Anteils interstitieller Zellen an der tubulointerstitiellen Gesamtzellzahl kommt. FSP-1-positve Fibroblasten zählen neben Myofibroblasten zu der für die Kollagenproduktion und damit für die Fibrosierung verantwortlichen interstitiellen Zellpopulation (Bruneval et al. 2005). Obwohl die Messung des Kollagengehaltes des Nierengewebes mittels Hydroxyprolinassay und die histologischen Methoden deutliche Unterschiede bzgl. des Fibrosierungsgrades zwischen den einzelnen Gruppen der Kollagen-4A3-defizienten Tiere zeigten, wies die RT-PCR keine signifikanten Unterschiede der Kollagenexpression, d.h. der Bildung von Kollagenfasern auf. Dies lässt den Schluss zu, dass in der EN- COL4A3^{-/-} bzw. IB-COL4A3^{-/-}-Gruppe der vermehrte Abbau von interstitieller Matrix durch verschiedene Proteinasen möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Progressionsminderung der renalen Fibrosierung spielt.

4 Diskussion

Obwohl glomeruläre Veränderungen weniger mit der Einschränkung der Nierenfunktion korrelieren als die renale Fibrosierung, führte die Blockade des Angiotensinsystems zu einer Reduktion des Ausmaßes der Glomerulosklerose und des Anteils sklerotischer Glomeruli bei Kollagen-4A3-defizienten Tieren (Gross et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wiesen Kollagen-4A4-defiziente Tiere eine deutlich erhöhte glomeruläre Gesamtzellzahl, die als Parameter für die glomeruläre Schädigung bestimmt wurde, auf. Die Irbesartan-Medikation Kollagen-4A3-defizienter Tiere bewirkte im Vergleich zu unbehandelten Knockout-Tieren eine Reduktion der glomerulären Gesamtzellzahl. Eine Studie der 5/6-Nephrektomie zeigte nach Monotherapie sowohl mit 80 mg Losartan als auch mit 200 mg Enalapril eine stärkere Reduktion der Glomerulosklerose im Vergleich zur Kombinationstherapie beider Substanzen in der gleichen Dosis wie bei der jeweiligen Monotherapie. Dabei wurde der kleinste Glomeruloskleroseindex durch den AT₁-Rezeptor-Antagonisten Losartan erreicht und nur der AT₁-Rezeptor-Antagonist führte zu einer Reduktion der Glomerulosklerose im Zeitraum zwischen der Biopsie nach 8 Wochen und der Autopsie nach 12 Wochen (Ma LJ et al. 2005). Allerdings war nach Kombinationstherapie mit beiden Substanzen der Unterschied der Proteinurie gegenüber unbehandelten Tieren zum Endpunkt der Studie am ausgeprägtesten, wobei sich auch die Losartan-Monotherapie, nicht aber die Enalapril-Monotherapie durch eine deutlich geringere Proteinurie gegenüber der Kontrolle auszeichnete.

Weitere charakteristische histomorphologische Kennzeichen der chronisch progredienten Niereninsuffizienz sind neben der tubulointerstitiellen Fibrosierung auch die Einwanderung von Entzündungszellen und eine verstärkte Proliferation sowohl interstitieller als auch tubulärer Zellen. In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass Kollagen-4A3-defiziente Tiere eine vermehrte Proliferation von Tubuluszellen und interstitieller Zellen aufweisen. Unter den interstitiellen Zellen zeigten sowohl Myofibroblasten als auch FSP-1-positiv Fibroblasten eine vermehrte Proliferation. Der Anteil proliferierender interstitieller Zellen im Nierenparenchym Kollagen-4A3-defizienter Tiere war sowohl nach Enalapril- als auch nach Irbesartan-Medikation geringfügig verringert im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Eine deutliche Reduktion des Anteils proliferierender Tubuluszellen bei Kollagen-4A3-defizienten Tieren fand sich dagegen nur nach Irbesartan-Medikation.

Die tubulointerstitielle Fibrosierung ist gekennzeichnet durch eine vermehrte Produktion von Bestandteilen interstitieller Matrix, wie v.a. Kollagen, durch aktivierte Fibroblasten. Dabei stellt sich die Frage nach der Herkunft dieser aktivierten Zellpopulation. Man fand, dass ungefähr ein Drittel der aktivierten Fibroblasten durch Epithelial-Mesenchymale Transformation entstehen (Iwano et al. 2002). Die EMT führt zur Umwandlung von Tubulusepithelzellen in Fibroblasten und ist durch die Expression von FSP-1 in Tubulusepithelzellen gekennzeichnet (Zeisberg und Neilson 2009), bzw. wird durch die Expression von FSP-1 ermöglicht (Strutz et al. 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte das

4 Diskussion

Fibroblast Specific Protein-1 mittels S100A4-Immunfluoreszenz und S100A4-Immunhistochemie in Tubulusepithelzellen nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Epithelial-Mesenchymale Transformation eine Rolle bei der tubulointerstitiellen Fibrosierung auch im Rahmen der Alport-Nephritis spielt.

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit unter den hier verwendeten Dosierungen und unter den hier zugrundeliegenden Bedingungen zeigte der AT₁-Rezeptor-Antagonist Irbesartan gegenüber dem ACE-Hemmer Enalapril eine stärkere Progressionsminderung des chronischen Nierenversagens im Rahmen der Alport-Nephritis anhand der Retentionswerte im Serum, der tubulointerstitiellen Fibrosierung und der Zellproliferation. Klinische und tierexperimentelle Studien, die beide Substanzgruppen direkt vergleichen bzgl. ihrer Wirkung das chronische Nierenversagen zu verzögern, sind selten und die Ergebnisse je nach Ätiologie verschieden. Eine frühere Studie, in der das antifibrotische Potential eines ACE-Hemmers mit dem eines AT₁-Rezeptor-Antagonisten anhand des Tiermodells der Kollagen-4A3-defizienten Mäuse verglichen wurde, zeigte eine deutlich bessere Renoprotektion mittels ACE-Hemmer (Gross et al. 2004). Allerdings wurden in dieser Studie Ramipril und Candesartan verglichen, während in der vorliegenden Dissertationsarbeit die Kollagen-4A3-defizienten Tiere mit Enalapril bzw. mit Irbesartan behandelt wurden. Wesentliche pharmakologische Unterschiede zwischen den beiden ACE-Hemmern bzw. zwischen den beiden AT₁-Rezeptor-Antagonisten bestehen bzgl. der Eliminations-Halbwertszeiten. Während Ramipril eine mittlere effektive HWZ von 15 h aufweist, ist das in der vorliegenden Studie verwendete Enalapril mit einer HWZ von 11 h kürzer wirksam als Ramipril. Dagegen ist das in der vorliegenden Arbeit verwendete Irbesartan mit einer mittleren effektiven HWZ von 13 h länger wirksam als Candesartan mit einer HWZ von 9 h. Des Weiteren unterscheiden sich beide Studien hinsichtlich der Applikationsform der ACE-Hemmer und der AT₁R-Antagonisten. Obwohl Candesartan praktisch wasserunlöslich ist (Merck 2006), wurde es mit dem Trinkwasser den Versuchstieren zugeführt (Gross et al. 2004). Das könnte möglicherweise die geringere Wirksamkeit des AT₁R-Antagonisten in dieser Studie mit hervorgerufen haben. Im Tierexperiment der vorliegenden Studie wurden der ACE-Hemmer Enalapril und der AT₁R-Antagonist Irbesartan mit dem Futter verabreicht.

Hypothesen, weshalb eine der beiden Substanzgruppen der ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Antagonisten einen Vorteil in der Verzögerung der chronisch progredienten Niereninsuffizienz gegenüber der anderen aufweisen könnte, sind vielfältig. Beide Medikamentenklassen führen hauptsächlich zu einer verminderten Stimulation des AT₁-Rezeptors durch Angiotensin II. Während ACE-Hemmer die verfügbare Konzentration von Angiotensin II reduzieren, hemmen AT₁-Rezeptor-Blocker komplementär die Bindung von Angiotensin II an dessen Rezeptor. Neben anderen Angiotensin II bildenden Enzymen, wie

4 Diskussion

die Mastzellchymase, sind auch die Effekte von Bradykinin und des AT_2 -Rezeptors als mögliche Faktoren, welche zu Unterschieden des renoprotektiven Potentials führen könnten, postuliert wurden.

Es wurde gezeigt, dass durch die Chymase im Herzgewebe mehr Angiotensin II gebildet wird als durch das Angiotensin Converting Enzyme (Urata et al. 1991). ACE-unabhängige Angiotensin-II-Synthese aufgrund erhöhter Chymase-Aktivität konnte auch tierexperimentell in ischämischem Nierengewebe nachgewiesen werden (Sadjadi et al. 2005) und eine erhöhte Chymase-Expression findet sich in Myofibroblasten bei der diabetischen Nephropathie (Huang XR et al. 2003) sowie bei der Glomerulonephritis (Togawa et al. 2009). Eine effektive Beteiligung der Chymase an der Angiotensin-II-Bildung in der Niere würde eine stärkere Blockade des Renin-Angiotensin-Systems durch AT_1 -Rezeptor-Blocker erwarten lassen im Vergleich zu ACE-Hemmern (Hollenberg et al. 1998). Eine Beteiligung der Chymase an der intrarenalen Angiotensin-II-Synthese konnte auch in einer Studie an Hamstern, die nach unilateraler Ureterobstruktion entweder einen Chymase-Inhibitor oder den AT_1 -Rezeptor-Blocker Olmesartan erhielten, gezeigt werden. Dabei führten beide Medikamente zu einer Reduktion der tubulointerstitiellen Fibrosierung (Fan et al. 2009). Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass die Konzentration des Angiotensin Converting Enzyme im fibrosierten Nierenparenchym vermindert ist.

ACE-Hemmer führen aufgrund der Hemmung des Angiotensin Converting Enzyme zu einem verminderten Abbau von Bradykinin, welches durch Bindung an den B_2 -Rezeptor eine verstärkte Vasodilatation zur Folge hat und dadurch die antihypertensive Wirkung der ACE-Hemmer unterstützt. Klinische Studien zeigten, dass bis zu 50 % der sofortigen antihypertensiven Wirkung einer ACE-Hemmer-Dosis auf die Wirkung von Kininen zurückzuführen ist (Gainer et al. 1998). Eine verstärkte Vasodilatation der efferenten Arteriole der Glomeruli durch ACE-Hemmer-Medikation aufgrund der Wirkung der Kinine konnte tierexperimentell, nicht aber am Menschen bestätigt werden (Gainer et al. 1998; Kon et al. 1993). Die Wirkung des Bradykinins könnte die in einigen klinischen Studien festgestellte stärkere Senkung der Proteinurie durch ACE-Hemmer im Vergleich zu AT_1 -Rezeptor-Antagonisten bei Patienten mit chronischem Nierenversagen erklären (Lacourciere et al. 2000; Mogensen et al. 2000). Allerdings konnte gezeigt werden, dass AT_1 -Rezeptor-Antagonisten, wenn auch in geringerem Maße, ebenfalls zu einer vermehrten Bradykinin-Freisetzung in Blutgefäßen und der Niere führen können (Siragy et al. 1999; Tsutsumi et al. 1999). Durch AT_1 R-Antagonisten bleibt im Gegensatz zu ACE-Inhibitoren die Bindung von Angiotensin II an den AT_2 -Rezeptor unbeeinflusst. Die Stimulation der Bradykinin-Synthese durch Bindung von Angiotensin II an den AT_2 -Rezeptor konnte an AT_2 R-defizienten bzw. überexprimierenden Tieren nachgewiesen werden (Siragy et al. 1999; Tsutsumi et al. 1999).

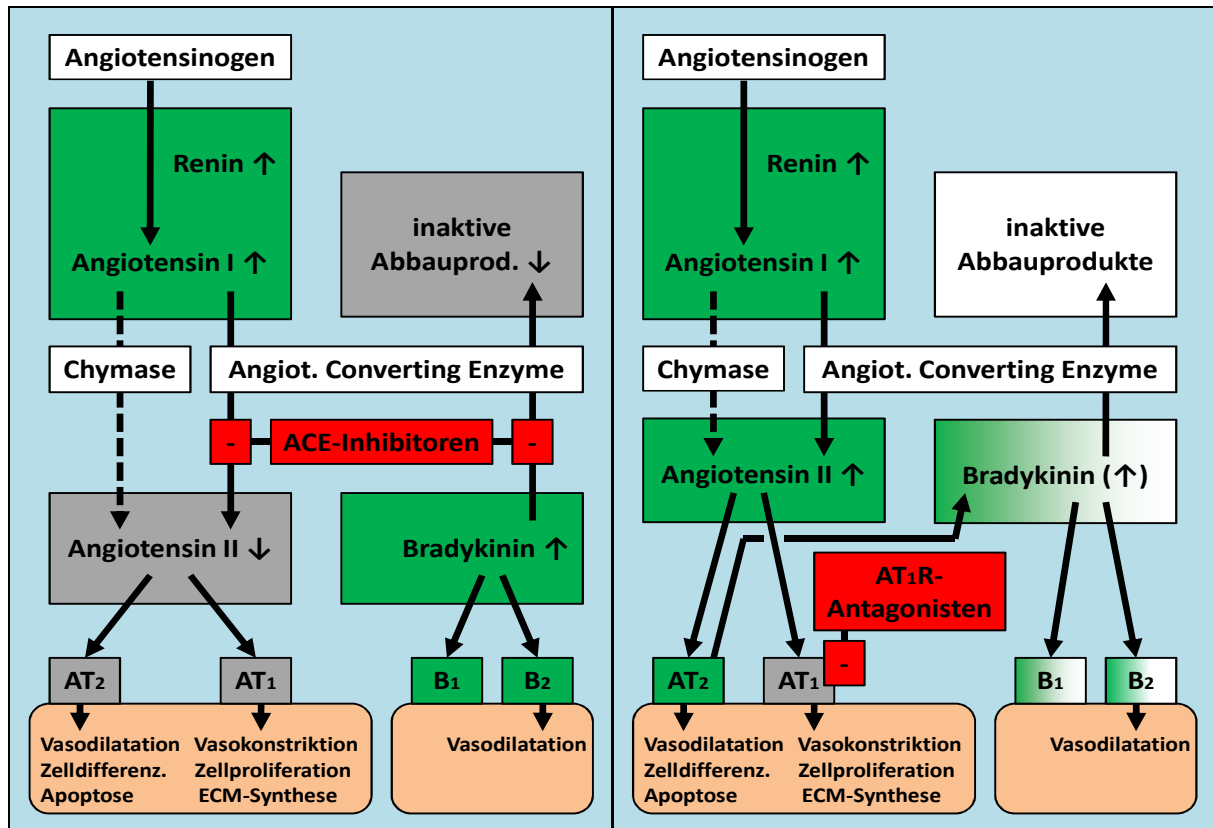


Abb. 34: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Effekte der ACE-Hemmer und der AT₁-Rezeptor-Antagonisten auf das Renin-Angiotensin- und das Bradykinin-System. Modifiziert nach Hilgers und Mann (2002, S. 1102). Verstärkt aktive Signalwege sind grün, weniger aktive grau dargestellt. ACE-Hemmer reduzieren die Angiotensin-II-Bildung und den Abbau von Bradykinin, wodurch AT₁- und AT₂-Rezeptoren weniger, B₁- und B₂-Rezeptoren dagegen vermehrt aktiviert werden. Sowohl durch AT₁-Rezeptor-Antagonisten als auch durch ACE-Hemmer kommt es zu einer reaktiven Zunahme der Renin- und Angiotensin-I-Konzentration im Plasma. Allerdings führen AT₁-Rezeptor-Antagonisten im Gegensatz zu ACE-Hemmern zu einer Zunahme der Angiotensin-II-Konzentration. Infolgedessen wird der AT₂-Rezeptor vermehrt aktiviert, da AT₁-Rezeptor-Antagonisten nur den AT₁-Rezeptor blockieren. Die AT₂-Aktivierung führt zu einer verstärkten Bradykinin-Freisetzung.

Ob dieser Effekt der AT₁R-Antagonisten auf den Menschen übertragbar ist und in welchem Verhältnis er zur vermehrten Bradykininsynthese infolge ACE-Hemmer-Medikation steht, ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Allerdings ist die AT₂-Rezeptor-vermittelte Vasodilatation nicht Bradykinin-abhängig. An Bradykinin-Rezeptor-B₂-defizienten Mäusen wurde nachgewiesen, dass die Vasodilatation infolge Stimulation des AT₂-Rezeptors auch durch NO-Freisetzung direkt hervorgerufen werden kann (Abadir et al. 2003). Aufgrund des kompetitiven Antagonismus der AT₁-Rezeptor-Blocker am AT₁-Rezeptor, nicht aber am AT₂-Rezeptor, stehen dem AT₂-Rezeptor sogar noch mehr Moleküle des Liganden Angiotensin II zur Verfügung. Tierexperimentelle Studien zeigten, dass der AT₂-Rezeptor die vasokonstriktiven und proliferativen Effekte des AT₁-Rezeptor antagonisiert (Siragy et al. 1999; Stoll et al. 1995). Es konnte nachgewiesen werden, dass der AT₂-Rezeptor den AT₁-Rezeptor direkt inhibiert (AbdAlla et al. 2001). Während die AT₁-Rezeptor-Aktivierung durch Proteinphosphorylierung bestimmte Signalkaskaden in Gang setzt, die u.a. zur vermehrten TGF-β1-Expression führen, führt der AT₂-Rezeptor zur Aktivierung von Phosphatasen, die diese Signalkaskaden durch Dephosphorylierung unterbrechen (Siragy 2007). In tierexperimentellen Studien führte die pharmakologische Blockade des AT₂-Rezeptors und

4 Diskussion

der Knockout des AT₂-Rezeptor-Gens zu einer verstärkten Fibrosierung nach unilateraler Ureterobstruktion (Ma J et al. 1998; Morrissey und Klahr 1999). Eine mögliche Ursache stellt die verringerte AT₂-Rezeptor-vermittelte Apoptose interstitieller Fibroblasten dar. Dies konnte am Tiermodell der AT₂-Rezeptor-defizienten Mäuse nachgewiesen werden (Ma J et al. 1998). Des Weiteren führte die pharmakologische Blockade des AT₂-Rezeptors im Tiermodell der 5/6-Nephrektomie zu einer Zunahme der Glomerulosklerose im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Naito et al.). Die genannten Studien zeigten, dass die Bindung von Angiotensin II an den AT₂-Rezeptor antifibrotische Effekte im Rahmen des chronisch progredienten Nierenversagens bewirkt, wodurch AT₁-Rezeptor-Antagonisten im Vergleich zu ACE-Hemmer möglicherweise ein höheres Potential, die tubulointerstitielle Fibrosierung im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz zu verlangsamen, aufweisen. Jedoch werden über den AT₂-Rezeptor möglicherweise auch proinflammatorische Signale vermittelt (Wolf et al. 1997).

Neben der Diskussion, welche der beiden Wirkstoffklassen zur Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz geeigneter ist, stellt sich auch die naheliegende Frage, ob eine Kombinationsmedikation aus ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Antagonist einen Vorteil gegenüber der Monotherapie ergibt. Kleinere klinische Studien zeigten, dass eine Kombinationstherapie aus ACE-Hemmer und AT₁R-Antagonist zu einer stärkeren Reduktion der Proteinurie im Vergleich zur Monotherapie im Rahmen des chronischen Nierenversagens führt (Krairittichai und Chaisuvannarat 2009; Tan et al.). Dies konnte auch durch tierexperimentelle Studien bestätigt werden, die allerdings bzgl. der histopathologischen Parameter, wie Glomerulosklerose, keinen Vorteil der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie aufzeigten (Ma LJ et al. 2005). Die ONTARGET-Studie zeigte, dass Patienten, die eine Kombinationstherapie erhielten, eine weitere Reduktion der Proteinurie im Vergleich zu jenen, die nur einen ACE-Hemmer verabreicht bekamen, aufwiesen. Trotzdem erreichte diese Patientengruppe eher einen der Endpunkte wie Tod oder Dialyse. Daher scheint die Kombinationstherapie keinen Benefit gegenüber der Monotherapie zu bringen (Messerli und Yuzefpolskaya 2009). Außerdem muss man bedenken, dass sich durch eine Kombinationstherapie das Risiko für das Auftreten bestimmter Nebenwirkungen, wie z.B. Hyperkaliämie oder Hypotonie, erhöhen kann. Daher sollte zunächst festgestellt werden, welche Substanzgruppe, d.h. ACE-Hemmer oder Angiotensin-Rezeptor-Blocker, je nach Ätiologie die optimale Monotherapie zur Verzögerung der chronisch progredienten Niereninsuffizienz darstellt.

Tatsache ist, dass tierexperimentelle und klinische Studien unterschiedliche Ergebnisse diesbezüglich lieferten, welche der beiden Substanzgruppen einen Vorteil gegenüber der anderen bringt. Um diese Frage zu klären, werden weitere tierexperimentelle sowie randomisierte klinische Studien an großen Patientenkollektiven benötigt. Außerdem ist es

4 Diskussion

fraglich, ob sich die Hypothese, dass generell ACE-Hemmer oder AT₁-Rezeptor-Antagonisten zu einer stärkeren Progressionsminderung führen, in dieser einfachen Form aufstellen lässt. Schließlich spielen zahlreiche weitere Faktoren eine Rolle, die das Ansprechen und die Wirksamkeit der beiden Substanzgruppen bei der chronisch progredienten Niereninsuffizienz beeinflussen. Neben der dem chronischen Nierenversagen zugrunde liegenden Ätiologie und den pharmakologischen Unterschieden der einzelnen Wirksubstanzen der beiden Medikamentenklassen sind auch genetische Varianten der Komponenten des RAS-Systems nicht außer Acht zu lassen, da diese die Unterschiede der Wirksamkeit der beiden Medikamentenklassen am einzelnen Individuum erklären können.

Der Insertion (I)/ Deletion (D)-Genpolymorphismus, welcher 1990 von Rigat et al. beschrieben wurde (Rigat et al. 1990), ist hauptverantwortlich für die phänotypische Varianz des ACE-Gens. Es zeigte sich, dass Patienten mit dem D-Allel im Vergleich zu homozygoten I-Allel-Trägern eine deutlich erhöhte ACE-Konzentration, sowohl im Blutkreislauf, als auch in der Niere aufweisen (Jacobsen 2005). Klinische Studien deuten darauf hin, dass sich der II-Genotyp protektiv gegenüber der Inzidenz einer Makroalbuminurie und dem Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz aufgrund einer diabetischen Nephropathie auswirkt, während hetero- und homozygote Träger des D-Allels mit Diabetes mellitus ein höheres Risiko für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie aufweisen (Ng DP et al. 2005; Wang Y et al. 2005). Auch bei der chronischen Niereninsuffizienz anderer Ursache zeigt sich ein schnelleres Voranschreiten der Erkrankung bei homozygoten Trägern des D-Allels (Lovati et al. 2001). Bei der IgA-Nephropathie besteht ebenfalls ein deutlicher Einfluss des ACE-Genpolymorphismus sowohl auf die Inzidenz als auch auf die Progression der Erkrankung (Yong et al. 2006). Der ACE-Genpolymorphismus beeinflusst neben der Inzidenz und der Progression der chronischen Niereninsuffizienz auch die Wirksamkeit der RAS-Blockade mittels ACE-Hemmern oder AT₁-Rezeptor-Antagonisten. Dabei zeigten zwei große randomisierte klinische Studien, dass bei homozygoten Trägern des I-Allels eine pharmakologische RAS-Blockade die Progression der chronischen Niereninsuffizienz nicht oder nur sehr geringfügig beeinflusst, während bei Patienten mit dem DD-Genotyp das Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz deutlich verzögert wird (Parving et al. 2008; Perna et al. 2000). Die fehlende therapeutische Effizienz der RAS-Blockade bei Patienten mit dem II-Genotyp findet sich sowohl bei der diabetischen Nephropathie als auch bei chronischem Nierenversagen infolge nichtdiabetischer Ursachen und zeigte sich unabhängig von der zur RAS-Blockade angewandten Medikamentenklassen der ACE-Hemmer oder AT₁-Rezeptor-Antagonisten (Ruggenenti et al. 2008). Die reduzierte Progression der chronischen Niereninsuffizienz einerseits und die fehlende therapeutische Effizienz der RAS-Blockade bei Individuen mit dem II-Genotyp lassen sich möglicherweise durch eine reduzierte ACE-Aktivität infolge des II-Genotyps bei diesen Patienten erklären (Ruggenenti et al. 2008).

4 Diskussion

Seit einigen Jahren existiert unter den RAS-Inhibitoren die neue Substanzklasse der Renin-Hemmer. Bisher existieren nur wenige Studien, die eine Progressionsminderung der chronischen Niereninsuffizienz infolge Medikation mit Renin-Hemmern belegen. Dabei stellt sich die Frage, ob sich durch die in der Signalkaskade frühere und umfassendere Blockade des Renin-Angiotensin-Systems infolge Renin-Inhibition eine vergleichbare oder sogar bessere renoprotektive Wirkung erreichen lässt wie durch ACE-Hemmer oder AT₁-Rezeptor-Antagonisten. Letztendlich stellen beide Substanzgruppen der ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Antagonisten zwar bewährte Medikamentenklassen dar, um das Voranschreiten des chronischen Nierenversagens zu verlangsamen, allerdings können beide trotz einer deutlichen Verzögerung das Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz und die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie nicht verhindern. Daher sind weitere tierexperimentelle Studien notwendig, um neue therapeutische Ansatzpunkte zu finden, die den Prozess der renalen Fibrosierung und damit verbundenen chronisch progredienten Niereninsuffizienz nicht nur verlangsamen, sondern gänzlich stoppen bzw. umkehren können.

4.2 Bedeutung des Bone Morphogenetic Protein-7 und dessen Rezeptor ALK-3 im Rahmen der chronisch progredienten Niereninsuffizienz

In der vorliegenden Studie konnte am Tiermodell der Kollagen-4A3-defizienten Mäuse bestätigt werden, dass die renale Fibrosierung im Rahmen der Alport-Nephritis mit einer verminderten BMP-7-Expression im Nierenparenchym assoziiert ist. Dieses Ergebnis zeigt sich sowohl mittels RT-PCR, als auch in der immunhistochemischen Färbung von Gewebeschnitten. Eine verminderte BMP-7-Expression in Tubulusepithelzellen infolge Nierenschädigung konnte bereits anhand verschiedener Tiermodelle des akuten und chronischen Nierenversagens nachgewiesen werden (Simon et al. 1999; Wang SN et al. 2001). Anhand der Tiermodelle der unilateralen Ureterobstruktion und der Streptozotocin-induzierten diabetischen Nephropathie wurde gezeigt, dass die exogene Zufuhr von rekombinantem BMP-7 die tubulointerstitielle Fibrosierung und damit die Progression des chronischen Nierenversagens hemmt bzw. zu einer Reparatur des geschädigten Nierenparenchyms durch Wiederherstellung der normalen Gewebearchitektur führt (Hruska et al. 2000; Wang S et al. 2003). Wie am Tiermodell der Kollagen-4A3-defizienten Mäuse nachgewiesen, ist die Niere durch die Verabreichung von rekombinantem BMP-7 auch im Rahmen der Alport-Nephritis vor der tubulointerstitiellen Fibrosierung geschützt (Zeisberg et al. 2003 a).

In der vorliegenden Arbeit ließ sich mittels RT-PCR zeigen, dass die Medikation Kollagen-4A3-defizienter Tiere mit dem ACE-Hemmer Enalapril oder dem AT₁-Rezeptor-Antagonisten Irbesartan zu einer vermehrten BMP-7-Expression im Nierenparenchym im Vergleich zu unbehandelten Tieren führt. Die relative BMP-7-Expression entsprach dabei nach Irbesartan-Medikation derjenigen in der Wildtypgruppe. Ob die Blockade des Renin-Angiotensin-Systems die tubuläre BMP-7-Expression direkt beeinflusst und dadurch die Gewebearchitektur des Nierenparenchyms schützt, oder die konstante BMP-7-Expression im Nierenparenchym der IB-COL4A3^{-/-}-Tiere eine Folge der verhinderten Tubulusatrophie darstellt, bleibt dabei unklar. Allerdings ist seit langem bekannt, dass Angiotensin II über den AT₁-Rezeptor zur vermehrten Expression von profibrotischen Wachstumsfaktoren, wie PDGF, CTGF und v.a. TGF-β1 führt (Border und Noble 1998; Mezzano et al. 2001). TGF-β1 wiederum kann über eine verminderte PAX-2-Expression die BMP-7-Expression reduzieren, da der Transkriptionsfaktor PAX-2 als Aktivator am BMP-7-Promotor wirkt und TGF-β1 die PAX-2-Expression in proximalen Tubuluszellen vermindert (Liu et al. 1997; Oxburgh 2009). Somit kann eine RAS-Blockade auch auf die BMP-7-Expression Einfluss nehmen und zur BMP-7-vermittelten Homöostase der Gewebearchitektur des Nierenparenchyms beitragen. Inwieweit dieser Mechanismus bei der Progressionsminderung des chronischen Nierenversagens infolge Blockade des Renin-Angiotensin-Systems mittels eines ACE-

4 Diskussion

Hemmers oder Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten eine Rolle spielt, ist ungeklärt und bedarf weiterer experimenteller Untersuchung.

Die Wirkungen des Morphogens BMP-7 auf die Zelle werden über einen Rezeptor-Komplex, bestehend aus zwei Typ-I- und zwei Typ-II-Rezeptoren, vermittelt, wobei der Typ-II-Rezeptor BMPRII konstitutiv exprimiert wird, die Expression des Typ-I-Rezeptors ALK-3 allerdings von verschiedenen Regulationsmechanismen abhängig ist (Bosukonda et al. 2000; Zeisberg 2006). Daher wurde in der vorliegenden Dissertationsarbeit die Expression des ALK-3-Rezeptors, auch BMP-Rezeptor-1A genannt, im Nierenparenchym Kollagen-4A3-defizienter Mäuse untersucht. Dabei zeigten die Wildtyp-Gruppe und die unbehandelten Kollagen-4A3-defizienten Tiere keinen Unterschied, während die mit Enalapril bzw. die mit Irbesartan behandelten Kollagen-4A3-defizienten Tiere eine signifikant höhere Expression des ALK-3-Rezeptors im Vergleich sowohl zu Wildtyptieren als auch zu unbehandelten Knockout-Mäusen aufwiesen. Die Expression des ALK-3-Rezeptors im Nierengewebe stellt einen wichtigen Bestandteil der BMP-7-Signalkaskade dar und ist daher entscheidend für die protektive Wirkung von BMP-7 auf das Nierenparenchym gegenüber akuten oder chronischen pathologischen Stimuli (Zeisberg und Kalluri 2004). Man nimmt an, dass die Wirkung von BMP-7 auf das Tubulusepithel über die Expression seines Rezeptors ALK-3 reguliert wird (Zeisberg 2006). Daher führt eine Überexpression des ALK-3-Rezeptors möglicherweise zu einer verstärkten protektiven Wirkung von bereits vorhandenem BMP-7 auf das Tubulusepithel und erhöht infolgedessen das regeneratorsche Potential des Nierenparenchyms. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine RAS-Blockade zu einer erhöhten ALK-3-Expression im Rahmen der Alport-Nephritis führt ohne die genauen dafür verantwortlichen Mechanismen zu kennen. Dies stellt möglicherweise einen weiteren Effekt der RAS-Blockade dar, der für die Progressionsminderung der tubulointerstitiellen Fibrosierung infolge ACE-Hemmer- bzw. AT₁R-Antagonisten-Medikation mitverantwortlich ist. Die Relevanz der erhöhten ALK-3-Expression für die renoprotektive Wirkung infolge RAS-Blockade bleibt allerdings unklar. Des Weiteren erfordert die Aufklärung der genauen Signalkaskade, über den die ALK-3-Überexpression ausgelöst wird, weitere experimentelle Studien.

4.3 Bedeutung des PAI-1 und des uPAR im Rahmen der chronisch progredienten Niereninsuffizienz

Neben der vermehrten Bildung von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix, wie Kollagen und Fibronectin, spielt auch der verminderte Abbau dieser Proteine eine wichtige Rolle für den Vorgang der Fibrosierung des Nierenparenchyms und Sklerosierung der Glomeruli (Schnaper 1995). Außer verschiedener Matrixmetalloproteasen ist das Plasmin-Plasminogen-System entscheidend daran beteiligt, da Plasmin nicht nur die Bestandteile der interstitiellen Matrix spalten kann, sondern auch Matrixmetalloproteasen proteolytisch aktiviert (Eddy 2002). Der Plasminogen Activator Inhibitor-1 PAI-1 und dessen Beitrag zur tubulointerstitiellen Fibrosierung haben in den letzten Jahren zunehmend das Interesse der Forschung erlangt. Im Rahmen verschiedener pathologischer Zustände der Niere kommt es zu einer vermehrten Expression dieses Inhibitors (Eddy und Fogo 2006). Eine Überexpression führt im Tiermodell zu einer Beschleunigung, ein Knockout dagegen zu einer Abschwächung der renalen Fibrosierung (Matsuo et al. 2005; Oda et al. 2001). Der Einsatz von ACE-Hemmern und AT₁R-Antagonisten ist ein wichtiger Bestandteil bei der Behandlung der chronisch-progredienten Niereninsuffizienz, allerdings ist wenig bekannt über den Einfluss der Blockade des Renin-Angiotensin-Systems auf das Plasminogen-Plasmin-System. Daher untersuchten wir die Expression von PAI-1 und dessen Rezeptor uPAR im Rahmen der Alport-Nephritis und den Effekt des ACE-Hemmers Enalapril und des AT₁-Rezeptor-Antagonisten Irbesartan auf die PAI-1- und uPAR-Expression im Tiermodell der Kollagen-4A3-defizienten Mäuse.

Im Vergleich zum Wildtyp zeigten COL4A3^{-/-}-Tiere eine signifikant erhöhte PAI-1- und uPAR-Expression. Diese Unterschiede waren auch mittels Immunfluoreszenz nachweisbar. Mittels PAI-1- und Aquaporin-1- und -2-Immunfluoreszenz konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in der fibrotischen Niere Kollagen-4A3-defizienter Mäuse PAI-1 v.a. in proximalen Tubuli und im Glomerulus in Podozyten exprimiert wird. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Studien, die eine PAI-1-Expression u.a. durch proximale Tubuluszellen und Podozyten berichteten (Huang Y und Noble 2007). Die verstärkte Expression von PAI-1 im Rahmen der Alport-Nephritis ist von Bedeutung, da es sich bei diesem Tiermodell um ein atraumatisches Tiermodell handelt und bei einer Traumatisierung, wie z.B. im Rahmen der 5/6-Nephrektomie, schon per se zu einer Erhöhung des PAI-1-Spiegels kommt.

Die Blockade des Renin-Angiotensin-Systems über 6 Wochen resultierte in der vorliegenden Studie in einem geringeren Expressionsanstieg von PAI-1 um 54 % nach Enalapril- und um 65 % nach Irbesartan-Medikation. Man sieht, dass die Reduktion der PAI-1-Expression nach Medikation mit dem AT₁-Rezeptor-Antagonisten stärker ausgeprägt war als bei den Tieren, die einen ACE-Hemmer erhielten. Die uPAR-Expression zeigte bei behandelten Kollagen-

4 Diskussion

4A3-defizienten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren keine signifikanten Unterschiede.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Blockade des Angiotensin-Systems im Tiermodell der chronisch-progredienten Niereninsuffizienz zu einer verminderten PAI-1-Expression führt. Der Einfluss der RAS-Blockade auf die PAI-1-Expression wurde bereits in einem Tiermodell der unilateralen Ureterobstruktion gezeigt, wobei die Reduktion der tubulointerstitiellen Fibrosierung infolge der Medikation mit einem AT₁-Rezeptor-Blocker ebenfalls mit einer verminderten PAI-1-Expression assoziiert war (Han et al. 2010). In einem Tiermodell der 5/6-Nephrektomie führte die Medikation mit Losartan und/oder Enalapril zu einer signifikanten Reduktion der Glomerulosklerose und zeigte gleichzeitig eine verminderte PAI-1-Expression in den Glomeruli (Ma LJ et al. 2005). Ähnliche Ergebnisse lieferten die Tiermodelle der strahlungsinduzierten und der altersbedingten Glomerulosklerose (Ma LJ et al. 2000; Oikawa et al. 1997). Des Weiteren kann Angiotensin II über den AT₁-Rezeptor die PAI-1-Expression direkt induzieren (Brown et al. 2002; Nakamura et al. 2000). Aufgrund dieser Tatsache und der Daten vorliegender und anderer tierexperimenteller Studien lässt sich die Hypothese untermauern, dass die mittels RAS-Blockade erreichte Progressionsminderung der tubulointerstitiellen Fibrosierung und der Glomerulosklerose nicht nur aufgrund einer verzögerten Produktion interstitieller Matrix, sondern auch durch einen vermehrten proteolytischen Um- und Abbau der Extrazellulärmatrix zustande kommt. Die Förderung des Abbaus der Extrazellulärmatrix durch Proteinasen infolge der Hemmung von PAI-1 scheint dabei eine Schlüsselrolle zu spielen und stellt daher eine weitere mögliche Ursache der antifibrotischen Wirkung von ACE-Hemmern und AT₁-Rezeptor-Antagonisten dar. Dies lässt den Schluss zu, dass Patienten mit chronisch progredienter Niereninsuffizienz von einer direkten pharmakologischen Hemmung des Plasminogen Activator Inhibitor-1 profitieren könnten. In den letzten Jahren konnten einige Moleküle, die eine PAI-1-antagonistische Wirkung aufweisen, synthetisiert werden (El-Ayache et al. 2010; Gorlatova et al. 2007; Miyazaki et al. 2009). Einige zeigten im Tiermodell ausgeprägte antithrombotische Effekte (Hennan et al. 2005; Hennan et al. 2008) und protektive Effekte gegenüber der Entwicklung eines metabolischen Syndroms (Lijnen et al. 2006; Schalkwijk und Stehouwer 2006). Die Wirkung auf die renale Fibrosierung wurde bisher nicht getestet. Allerdings ist es eine interessante Fragestellung, inwieweit diese Substanzen zur pharmakologischen Verzögerung der chronisch progredienten Niereninsuffizienz geeignet sind.

In der vorliegenden Arbeit fand sich neben der erhöhten PAI-1-Expression eine erhöhte uPAR-Expression im Nierenparenchym Kollagen-4A3-defizienter Mäuse, wobei die RAS-Blockade mittels ACE-Hemmer oder AT₁-Rezeptor-Antagonisten mit einer geringeren uPAR-Expression einherging. Knockout-Studien zeigten, dass die uPAR-Defizienz im Tiermodell die renale Fibrosierung beschleunigt und daher uPAR den Abbau der Extrazellulärmatrix

4 Diskussion

eher positiv beeinflusst (Zhang et al. 2003 a). Die antifibrotischen Mechanismen des uPAR-uPA-Komplexes umfassen neben Verstärkung der Zelladhäsion über Integrine und der Initialisierung einer perizellulären Proteolyse über Plasmin auch die Endozytose des Komplexes nach PAI-1-Bindung und damit die Clearance von PAI-1 (Czekay et al. 2003; Zhang et al. 2003 b). Die Mechanismen, die die Expression von uPAR regulieren, evtl. reaktiv über die hohe lokale PAI-1-Konzentration, sind allerdings noch weitgehend ungeklärt. Ebenfalls ungeklärt ist die Frage, inwieweit das Renin-Angiotensin-System die uPAR-Expression beeinflusst.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte am Tiermodell der Kollagen-4A3-defizienten Mäuse bestätigt werden, dass eine Verzögerung der chronisch progredienten Niereninsuffizienz im Rahmen der Alport-Nephritis mittels pharmakologischer Blockade des Renin-Angiotensin-Systems erreichbar ist. Die Medikation mit Enalapril oder Irbesartan führte zu einer Verzögerung der Nierenfunktionseinschränkung, welche anhand des geringeren Anstiegs der Retentionswerte Kreatinin und Harnstoff im Serum nachgewiesen werden konnte. Die quantitative Auswertung histologischer Färbungen zeigte bei behandelten Tieren eine weniger ausgeprägte tubulointerstitielle Fibrosierung und Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Kollagen-4A3-defizienten Tieren. Die renoprotektiven Effekte des AT₁-Rezeptor-Antagonisten Irbesartan waren im Vergleich zu dem ACE-Hemmer Enalapril in der vorliegenden Arbeit wesentlich ausgeprägter. Trotzdem lässt sich die Frage, welche der beiden Substanzklassen sich besser zur pharmakologischen Verzögerung der chronisch progredienten Niereninsuffizienz eignet, nicht beantworten. Selbst klinische Studien mit großen randomisierten Patientenkollektiven zeigten diesbezüglich unterschiedliche Ergebnisse.

Beide Substanzgruppen, die ACE-Hemmer und die AT₁-Rezeptor-Antagonisten, sind in der Lage, die Progression des chronischen Nierenversagens zu verlangsamen. Jedoch können beide langfristig das Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz und die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie nur verzögern, nicht aber verhindern. Um letztendlich den Prozess der renalen Fibrosierung gänzlich zu stoppen bzw. umzukehren und das terminale Nierenversagen zu verhindern, sind neue Therapiestrategien notwendig, die über eine reine RAS-Blockade hinausgehen.

Ein neuer Therapieansatz ist möglicherweise die Verabreichung von rekombinantem BMP-7. In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Alport-Nephritis mit einer verminderten BMP-7-Expression im Verlauf einhergeht. Nach RAS-Blockade zeigte sich die Reduktion der BMP-7-Expression signifikant weniger stark ausgeprägt. Des Weiteren führte die RAS-Blockade bei Kollagen-4A3-defizienten Tieren zu einer Überexpression des BMP-7-Rezeptors ALK-3. Die Signalwege, mittels derer Angiotensin II die BMP-7- und die ALK-3-Expression beeinflusst, und die Relevanz dieser Effekte für die Progressionsminderung der tubulointerstitiellen Fibrosierung infolge RAS-Blockade sind noch ungeklärt und bedürfen weiterer experimenteller Untersuchung.

Einen weiteren neuen Therapieansatz stellt die pharmakologische Inhibierung von PAI-1 dar. In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass die tubulointerstitielle Fibrosierung im Rahmen der Alport-Nephritis mit einer erhöhten PAI-1- und uPAR-Expression im Nierenparenchym einhergeht und die durch RAS-Blockade bewirkte Progressionsminderung der tubulointerstitiellen Fibrosierung mit einer verminderten

5 Zusammenfassung

Expression v.a. von PAI-1 assoziiert ist. Die Reduktion der PAI-1-Expression stellt einen möglichen antifibrotischen Effekt der ACE-Hemmer bzw. AT₁-Rezeptor-Antagonisten dar. Tierexperimentelle Studien, die den Effekt einer direkten pharmakologischen Hemmung des Plasminogen Activator Inhibitor-1 auf die Progredienz der renalen Fibrosierung untersuchen, fehlen bisher, wären aber eine interessante Möglichkeit, um die evtl. antifibrotische Wirkung einiger neuer PAI-1-antagonistischer Substanzen zu testen. Die Mechanismen, die die Expression von uPAR regulieren, sind noch weitgehend ungeklärt und bedürfen ebenfalls weiterer experimenteller Untersuchung.

6 Abkürzungsverzeichnis

A	Antagonist
Abb.	Abbildung
AB-Diluent	Antibody Diluent
Abs.	Absatz
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AGEs	Advanced Glycation Endproducts
ALK	Activin Receptor-Like Kinase
ANOVA	Analysis of Variance
AQP	Aquaporin
Aqua bidest	doppelt destilliertes Wasser
Aqua dest	einfach destilliertes Wasser
AS	Alport-Syndrom
α SMA	α -Smooth Muscle Actin = α -Glattmuskelaktin
AT ₁ R	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
AT ₂ R	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 2
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Receptor
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
COL4A3	Kollagen-4A3
Ct	Crossing Treshold
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DIF	Doppelimmunfluoreszenz
DIH	Doppelimmunhistochemie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamino-Tetraessigsäure

6 Abkürzungsverzeichnis

EMT	Epithelial-Mesenchymale Transformation
EN	Enalapril
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazellulärmatrix
FBH	Familiäre Benigne Hämaturie
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
FSP-1	Fibroblast Specific Protein-1
GDF	Growth Differentiation Factor
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HRP	Horseradish Peroxidase
HWZ	Halbwertszeit
IB	Irbesartan
Id	Inhibitor of DNA-binding
IF	Immunfluoreszenz
IH	Immunhistochemie
KO	Körperoberfläche
MMP	Matrixmetalloproteinase
mALK-3	Maus-ALK-3
mBMP-7	Maus-BMP-7
mPAI-1	Maus-PAI-1
mRNA	messenger RNA
muPAR	Maus-uPAR
MW	Mittelwert
NBT	4-Nitroblue Tetrazolium Chloride
NFW	Nukleasefreies Wasser
NNR	Nebennierenrinde
NO	Stickstoffmonoxid
NoRT	Probe ohne Reverse Transkriptase
Nr.	Nummer
ONTARGET	Ongoing Telmisartan alone and in combination with Ramipril Global Endpoint Trial
OP	Osteogenic Protein
OT	Objektträger
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAX	Paired Box
PBS	Phosphate Buffered Saline

6 Abkürzungsverzeichnis

PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
RAS	Renin-Angiotensin-System
REIN	Ramipril Efficacy in Nephropathy
RENAAL	Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SERPIN	Serine Protease Inhibitor
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TβR	Transforming Growth Factor-β Receptor
TBS	Tris Buffered Saline
TGF-β1	Transforming Growth Factor-β1
tPA	Tissue-type Plasminogen Activator
u.a.	unter anderem
uPA	Urokinase-type Plasminogen Activator
uPAR	Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UUO	Unilaterale Ureterobstruktion
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
ZO-1	Zonula-Occludens-Protein-1

7 Literaturverzeichnis

- Abadir PM, Carey RM, Siragy HM (2003): Angiotensin AT2 receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B2-receptor-null mice. *Hypertension* 42: 600-4
- AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U (2001): The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem* 276: 39721-6
- Alpers CE, Seifert RA, Hudkins KL, Johnson RJ, Bowen-Pope DF (1993): PDGF-receptor localizes to mesangial, parietal epithelial, and interstitial cells in human and primate kidneys. *Kidney Int* 43: 286-94
- Alport A (1927): Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *Br med Jr* 1: 504-506
- Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ (1997): The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72: 1-22
- Attisano L, Wrana JL (2002): Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296: 1646-7
- Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, Skobe M, Fusenig NE, Carmeliet P, Collen D (1998): Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 4: 923-8
- Baker JC, Harland RM (1997): From receptor to nucleus: the Smad pathway. *Curr Opin Genet Dev* 7: 467-73
- Bakris GL, Ritz E (2009): The message for World Kidney Day 2009: hypertension and kidney disease, a marriage that should be prevented. *Iran J Kidney Dis* 3: 7-10
- Barry JM, Murray JE (2006): The first human renal transplants. *J Urol* 176: 888-90
- Battaller R, Brenner DA (2005): Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115: 209-18
- Baum B, Settleman J, Quinlan MP (2008): Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Semin Cell Dev Biol* 19: 294-308
- Bechtel W, Zeisberg M (2009): Twist: a new link from hypoxia to fibrosis. *Kidney Int* 75: 1255-6
- Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Müller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Müller CA, Kalluri R, Zeisberg M (2010): Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med* 16: 544-551
- Bergstein JM, Riley M, Bang NU (1992): Role of plasminogen-activator inhibitor type 1 in the pathogenesis and outcome of the hemolytic uremic syndrome. *N Engl J Med* 327: 755-9
- Blasi F (1993): Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *Bioessays* 15: 105-11
- Blasi F, Vassalli JD, Dano K (1987): Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J Cell Biol* 104: 801-4

7 Literaturverzeichnis

- Boor P, Floege J (2011): Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38: 391-400
- Boor P, Ostendorf T, Floege J (2010): Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol* 6: 643-56
- Border WA, Noble NA (1994): Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331: 1286-92
- Border WA, Noble NA (1998): Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 31: 181-8
- Bosukonda D, Shih MS, Sampath KT, Vukicevic S (2000): Characterization of receptors for osteogenic protein-1/bone morphogenetic protein-7 (OP-1/BMP-7) in rat kidneys. *Kidney Int* 58: 1902-11
- Boyle JP, Honeycutt AA, Narayan KM, Hoerger TJ, Geiss LS, Chen H, Thompson TJ (2001): Projection of diabetes burden through 2050: impact of changing demography and disease prevalence in the U.S. *Diabetes Care* 24: 1936-40
- Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S (2001): Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 345: 861-9
- Brown NJ, Vaughan DE, Fogo AB (2002): The renin-angiotensin-aldosterone system and fibrinolysis in progressive renal disease. *Semin Nephrol* 22: 399-406
- Bruneval P, Rossert J, Bariety J (2005): Renewal of FSP1: a marker of fibrogenesis on human renal biopsies. *Kidney Int* 68: 1366-7
- Chandler WL, Jelacic S, Boster DR, Ciol MA, Williams GD, Watkins SL, Igarashi T, Tarr PI (2002): Prothrombotic coagulation abnormalities preceding the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 346: 23-32
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM (2002): Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 23: 787-823
- Chant ID, Milford DV, Rose PE (1994): Plasminogen activator inhibitor activity in diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. *Qjm* 87: 737-40
- Cohnheim JF (1867): Über Entzündung und Eiterung. *Virchows Arch* 40: 1-79
- Cosgrove D, Meehan DT, Grunkemeyer JA, Kornak JM, Sayers R, Hunter WJ, Samuelson GC (1996): Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev* 10: 2981-92
- Cushman DW, Cheung HS, Peterson AE (1971): Properties of the angiotensin-converting enzyme of lung. *Chest* 59: Suppl:10S+

7 Literaturverzeichnis

- Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ (2003): Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol* 160: 781-91
- Dear AE, Medcalf RL (1998): The urokinase-type-plasminogen-activator receptor (CD87) is a pleiotropic molecule. *Eur J Biochem* 252: 185-93
- Deng G, Curriden SA, Hu G, Czekay RP, Loskutoff DJ (2001): Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin. *J Cell Physiol* 189: 23-33
- Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ (1995): A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9: 2795-807
- Duffield JS, Humphreys BD (2011): Origin of new cells in the adult kidney: results from genetic labeling techniques. *Kidney Int* 79: 494-501
- Eddy AA (1996): Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 7: 2495-508
- Eddy AA (2002): Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F209-20
- Eddy AA, Fogo AB (2006): Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *J Am Soc Nephrol* 17: 2999-3012
- Edwards CA, O'Brien WD, Jr. (1980): Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate. *Clin Chim Acta* 104: 161-7
- Ei-Ayache NC, Li SH, Warnock M, Lawrence DA, Emal CD (2010): Novel bis-arylsulfonamides and aryl sulfonimides as inactivators of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). *Bioorg Med Chem Lett* 20: 966-70
- Enke U (2007): Georg Haas: Pionier der Hämodialyse. *Dtsch Arztebl* 33: 2252-2554
- Essawy M, Soylemezoglu O, Muchaneta-Kubara EC, Shortland J, Brown CB, el Nahas AM (1997): Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 12: 43-50
- Fan YY, Nishiyama A, Fujisawa Y, Kobori H, Nakano D, Matsuura J, Hase N, Hitomi H, Kiyomoto H, Urata H (2009): Contribution of chymase-dependent angiotensin II formation to the progression of tubulointerstitial fibrosis in obstructed kidneys in hamsters. *J Pharmacol Sci* 111: 82-90
- Faulkner JL, Szykalski LM, Springer F, Barnes JL (2005): Origin of interstitial fibroblasts in an accelerated model of angiotensin II-induced renal fibrosis. *Am J Pathol* 167: 1193-205
- Fogo AB (2007): Mechanisms of progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 22: 2011-22

7 Literaturverzeichnis

- Frei U, Schober-Halstenberg H-J: Nierenersatztherapie in Deutschland: Bericht über die Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. QuaSi-Niere gGmbH, Berlin 2008
- Gai Z, Zhou G, Itoh S, Morimoto Y, Tanishima H, Hatamura I, Uetani K, Ito M, Muragaki Y (2009): Trps1 functions downstream of Bmp7 in kidney development. *J Am Soc Nephrol* 20: 2403-11
- Gai Z, Zhou G, Gui T, Itoh S, Oikawa K, Uetani K, Muragaki Y (2010): Trps1 haploinsufficiency promotes renal fibrosis by increasing Arkadia expression. *J Am Soc Nephrol* 21: 1468-76
- Gainer JV, Morrow JD, Loveland A, King DJ, Brown NJ (1998): Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. *N Engl J Med* 339: 1285-92
- Gansevoort RT, de Zeeuw D, de Jong PE (1994): Is the antiproteinuric effect of ACE inhibition mediated by interference in the renin-angiotensin system? *Kidney Int* 45: 861-7
- Gold LI, Schwimmer R, Quigley JP (1989): Human plasma fibronectin as a substrate for human urokinase. *Biochem J* 262: 529-34
- Gonzalez-Avila G, Vadillo-Ortega F, Perez-Tamayo R (1988): Experimental diffuse interstitial renal fibrosis. A biochemical approach. *Lab Invest* 59: 245-52
- Gorlatova NV, Cale JM, Elokdah H, Li D, Fan K, Warnock M, Crandall DL, Lawrence DA (2007): Mechanism of inactivation of plasminogen activator inhibitor-1 by a small molecule inhibitor. *J Biol Chem* 282: 9288-96
- Gould SE, Day M, Jones SS, Dorai H (2002): BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney Int* 61: 51-60
- Greenburg G, Hay ED (1982): Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 95: 333-9
- Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, Savani RC, Gough J, McKenna RM, Stern E, Rush DN (2001): Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 345: 93-7
- Grinnell F (1994): Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 124: 401-4
- Gross O, Kashtan CE (2009): Treatment of Alport syndrome: beyond animal models. *Kidney Int* 76: 599-603
- Gross O, Beirowski B, Koepke ML, Kuck J, Reiner M, Addicks K, Smyth N, Schulze-Lohoff E, Weber M (2003): Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome. *Kidney Int* 63: 438-46

7 Literaturverzeichnis

- Gross O, Schulze-Lohoff E, Koepke ML, Beirowski B, Addicks K, Bloch W, Smyth N, Weber M (2004): Antifibrotic, nephroprotective potential of ACE inhibitor vs AT1 antagonist in a murine model of renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 19: 1716-23
- Gubler MC (2007): Diagnosis of Alport syndrome without biopsy? *Pediatr Nephrol* 22: 621-5
- Haas M (2006): Thin glomerular basement membrane nephropathy: incidence in 3471 consecutive renal biopsies examined by electron microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 130: 699-706
- Haas M (2009): Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy: a practical approach to diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 133: 224-32
- Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R (1990): Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70: 1067-116
- Hamano K, Iwano M, Akai Y, Sato H, Kubo A, Nishitani Y, Uyama H, Yoshida Y, Miyazaki M, Shiiki H (2002): Expression of glomerular plasminogen activator inhibitor type 1 in glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 39: 695-705
- Han JY, Kim YJ, Kim L, Choi SJ, Park IS, Kim JM, Chu YC, Cha DR (2010): PPARgamma agonist and angiotensin II receptor antagonist ameliorate renal tubulointerstitial fibrosis. *J Korean Med Sci* 25: 35-41
- Hao S, Shen H, Hou Y, Mars WM, Liu Y (2010): tPA is a potent mitogen for renal interstitial fibroblasts: role of beta1 integrin/focal adhesion kinase signaling. *Am J Pathol* 177: 1164-75
- Harris RC, Cheng HF (1996): The intrarenal renin-angiotensin system: a paracrine system for the local control of renal function separate from the systemic axis. *Exp Nephrol* 4 Suppl 1: 2-7
- Hauner H (2006): The costs of diabetes mellitus and its complications in Germany. *Dtsch Med Wochenschr* 131: S240-2
- Hay ED, Zuk A (1995): Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis* 26: 678-90
- He CS, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Goldberg GI (1989): Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2632-6
- Heeg MH, Koziolk MJ, Vasko R, Schaefer L, Sharma K, Müller GA, Strutz F (2005): The antifibrotic effects of relaxin in human renal fibroblasts are mediated in part by inhibition of the Smad2 pathway. *Kidney Int* 68: 96-109
- Heidet L, Arrondel C, Forestier L, Cohen-Solal L, Mollet G, Gutierrez B, Stavrou C, Gubler MC, Antignac C (2001): Structure of the human type IV collagen gene COL4A3 and mutations in autosomal Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 12: 97-106

7 Literaturverzeichnis

- Hekman CM, Loskutoff DJ (1985): Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants. *J Biol Chem* 260: 11581-7
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997): TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465-71
- Hennan JK, Elokda H, Leal M, Ji A, Friedrichs GS, Morgan GA, Swillo RE, Antrilli TM, Hreha A, Crandall DL (2005): Evaluation of PAI-039 [{1-benzyl-5-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-indol-3-yl}(oxo)acetic acid], a novel plasminogen activator inhibitor-1 inhibitor, in a canine model of coronary artery thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther* 314: 710-6
- Hennan JK, Morgan GA, Swillo RE, Antrilli TM, Mugford C, Vlasuk GP, Gardell SJ, Crandall DL (2008): Effect of tiplaxtinin (PAI-039), an orally bioavailable PAI-1 antagonist, in a rat model of thrombosis. *J Thromb Haemost* 6: 1558-64
- Henrion D, Kubis N, Levy BI (2001): Physiological and pathophysiological functions of the AT(2) subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation. *Hypertension* 38: 1150-7
- Hilgers KF, Mann JF (2002): ACE inhibitors versus AT(1) receptor antagonists in patients with chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 1100-8
- Hinz B (2007): Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 127: 526-37
- Hogan BL (1996): Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 6: 432-8
- Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA (1998): Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* 32: 387-92
- Hruska KA, Guo G, Wozniak M, Martin D, Miller S, Liapis H, Loveday K, Klahr S, Sampath TK, Morrissey J (2000): Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F130-43
- Huang XR, Chen WY, Truong LD, Lan HY (2003): Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease. *J Am Soc Nephrol* 14: 1738-47
- Huang Y, Noble NA (2007): PAI-1 as a target in kidney disease. *Curr Drug Targets* 8: 1007-15
- Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG (2003): Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 348: 2543-56
- Hugo C (2007): [Nephrology 2007]. *Dtsch Med Wochenschr* 132: 1373-5
- Ichihara A, Kobori H, Nishiyama A, Navar LG (2004): Renal renin-angiotensin system. *Contrib Nephrol* 143: 117-30

7 Literaturverzeichnis

- Ikeda Y, Jung YO, Kim H, Oda T, Lopez-Guisa J, Maruvada R, Diamond DL, Martin KJ, Wing D, Cai X (2004): Exogenous bone morphogenetic protein-7 fails to attenuate renal fibrosis in rats with overload proteinuria. *Nephron Exp Nephrol* 97: e123-35
- Ingert C, Grima M, Coquard C, Barthelmebs M, Imbs JL (2002): Contribution of angiotensin II internalization to intrarenal angiotensin II levels in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F1003-10
- Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y (1999): The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 56: 104-32
- Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG (2002): Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110: 341-50
- Izumi N, Mizuguchi S, Inagaki Y, Saika S, Kawada N, Nakajima Y, Inoue K, Suehiro S, Friedman SL, Ikeda K (2006): BMP-7 opposes TGF-beta1-mediated collagen induction in mouse pulmonary myofibroblasts through Id2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L120-6
- Jacobsen PK (2005): Preventing end stage renal disease in diabetic patients - genetic aspect (part I). *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 6: 1-14
- Jefferson JA, Lemmink HH, Hughes AE, Hill CM, Smeets HJ, Doherty CC, Maxwell AP (1997): Autosomal dominant Alport syndrome linked to the type IV collage alpha 3 and alpha 4 genes (COL4A3 and COL4A4). *Nephrol Dial Transplant* 12: 1595-9
- Jo M, Lester RD, Montel V, Eastman B, Takimoto S, Gonias SL (2009): Reversibility of epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced in breast cancer cells by activation of urokinase receptor-dependent cell signaling. *J Biol Chem* 284: 22825-33
- Johnsson LG, Arenberg IK (1981): Cochlear abnormalities in Alport's syndrome. *Arch Otolaryngol* 107: 340-9
- Kalluri R, Neilson EG (2003): Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112: 1776-84
- Kalluri R, Zeisberg M (2006): Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 392-401
- Kane KK (1984): Fibrinolysis--a review. *Ann Clin Lab Sci* 14: 443-9
- Kaplan B, Meier-Kriesche HU (2004): Renal transplantation: a half century of success and the long road ahead. *J Am Soc Nephrol* 15: 3270-1
- Kasai S, Arimura H, Nishida M, Suyama T (1985): Primary structure of single-chain pro-urokinase. *J Biol Chem* 260: 12382-9
- Kashtan CE, Michael AF (1996): Alport syndrome. *Kidney Int* 50: 1445-63
- Kawabata M, Imamura T, Miyazono K (1998): Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 9: 49-61
- Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG (2008): Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* 71: 357-70

7 Literaturverzeichnis

- Kingsley DM (1994): The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8: 133-46
- Kjoller L, Kanse SM, Kirkegaard T, Rodenburg KW, Ronne E, Goodman SL, Preissner KT, Ossowski L, Andreasen PA (1997): Plasminogen activator inhibitor-1 represses integrin- and vitronectin-mediated cell migration independently of its function as an inhibitor of plasminogen activation. *Exp Cell Res* 232: 420-9
- Knutsen R, Wergedal JE, Sampath TK, Baylink DJ, Mohan S (1993): Osteogenic protein-1 stimulates proliferation and differentiation of human bone cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 1352-8
- Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A (2007): The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 59: 251-87
- Kon V, Fogo A, Ichikawa I (1993): Bradykinin causes selective efferent arteriolar dilation during angiotensin I converting enzyme inhibition. *Kidney Int* 44: 545-50
- Krairittichai U, Chaisuvannarat V (2009): Effects of dual blockade of renin-angiotensin system in type 2 diabetes mellitus patients with diabetic nephropathy. *J Med Assoc Thai* 92: 611-7
- Krasniak A, Drozd M, Pasowicz M, Chmiel G, Michalek M, Szumilak D, Podolec P, Klimeczek P, Konieczynska M, Wicher-Muniak E (2007): Factors involved in vascular calcification and atherosclerosis in maintenance haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 22: 515-21
- Kundhal K, Lok CE (2005): Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract* 101: c47-52
- Lacourciere Y, Belanger A, Godin C, Halle JP, Ross S, Wright N, Marion J (2000): Long-term comparison of losartan and enalapril on kidney function in hypertensive type 2 diabetics with early nephropathy. *Kidney Int* 58: 762-9
- Langer RM, Kahan BD (2002): 100 years ago: Ullmann's pioneering operation--autotransplantation of the kidney. *Transplant Proc* 34: 429-33
- LeBleu V, Sugimoto H, Mundel TM, Gerami-Naini B, Finan E, Miller CA, Gattone VH, 2nd, Lu L, Shield CF, 3rd, Folkman J (2009): Stem cell therapies benefit Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 20: 2359-70
- Lemmink HH, Mochizuki T, van den Heuvel LP, Schroder CH, Barrientos A, Monnens LA, van Oost BA, Brunner HG, Reeders ST, Smeets HJ (1994): Mutations in the type IV collagen alpha 3 (COL4A3) gene in autosomal recessive Alport syndrome. *Hum Mol Genet* 3: 1269-73
- Lester RD, Jo M, Montel V, Takimoto S, Gonias SL (2007): uPAR induces epithelial-mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. *J Cell Biol* 178: 425-36

7 Literaturverzeichnis

- Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G (2003): National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 139: 137-47
- Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, De Zeeuw D, Hostetter TH, Lameire N, Eknoyan G (2005): Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 67: 2089-100
- Levin A (2003): Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease prior to dialysis. *Semin Dial* 16: 101-5
- Lijnen HR, Alessi MC, Frederix L, Collen D, Juhan-Vague I (2006): Tiplaxtinin impairs nutritionally induced obesity in mice. *Thromb Haemost* 96: 731-7
- Liu S, Cieslinski DA, Funke AJ, Humes HD (1997): Transforming growth factor-beta 1 regulates the expression of Pax-2, a developmental control gene, in renal tubule cells. *Exp Nephrol* 5: 295-300
- Loscalzo J, Braunwald E (1988): Tissue plasminogen activator. *N Engl J Med* 319: 925-31
- Loskutoff DJ, Edgington TS (1981): An inhibitor of plasminogen activator in rabbit endothelial cells. *J Biol Chem* 256: 4142-5
- Lovati E, Richard A, Frey BM, Frey FJ, Ferrari P (2001): Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in end-stage renal disease. *Kidney Int* 60: 46-54
- Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G (1995): BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* 9: 2808-20
- Lysaght MJ (2002): Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications. *J Am Soc Nephrol* 13 Suppl 1: S37-40
- Ma J, Nishimura H, Fogo A, Kon V, Inagami T, Ichikawa I (1998): Accelerated fibrosis and collagen deposition develop in the renal interstitium of angiotensin type 2 receptor null mutant mice during ureteral obstruction. *Kidney Int* 53: 937-44
- Ma LJ, Nakamura S, Whitsitt JS, Marcantoni C, Davidson JM, Fogo AB (2000): Regression of sclerosis in aging by an angiotensin inhibition-induced decrease in PAI-1. *Kidney Int* 58: 2425-36
- Ma LJ, Nakamura S, Aldigier JC, Rossini M, Yang H, Liang X, Nakamura I, Marcantoni C, Fogo AB (2005): Regression of glomerulosclerosis with high-dose angiotensin inhibition is linked to decreased plasminogen activator inhibitor-1. *J Am Soc Nephrol* 16: 966-76
- Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, Pogue J, Wang X, Maggioni A, Budaj A, Chaithiraphan S (2008): Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or

7 Literaturverzeichnis

- both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet* 372: 547-53
- Massague J (2000): How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 169-78
- Matsuo S, Lopez-Guisa JM, Cai X, Okamura DM, Alpers CE, Bumgarner RE, Peters MA, Zhang G, Eddy AA (2005): Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: evidence from obstructive nephropathy in PAI-1-overexpressing mice. *Kidney Int* 67: 2221-38
- Meran S, Steadman R (2011): Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol* 92: 158-67
- Merck: The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Merck & Co., Whitehouse Station NJ USA 2006
- Messerli FH, Yuzefpolskaya M (2009): Q: Is an ACE inhibitor plus an ARB more effective than either drug alone? *Cleve Clin J Med* 76: 693-6
- Methven S, MacGregor MS (2009): Clinical management of chronic kidney disease. *Clin Med* 9: 269-72
- Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J (2001): Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 38: 635-8
- Miyazaki H, Ogiku T, Sai H, Moritani Y, Ohtani A, Ohmizu H (2009): Synthesis and evaluation of pyrrolin-2-one compounds, a series of plasminogen activator inhibitor-1 inhibitors. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 57: 979-85
- Mochizuki T, Lemmink HH, Mariyama M, Antignac C, Gubler MC, Pirson Y, Verellen-Dumoulin C, Chan B, Schroder CH, Smeets HJ (1994): Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet* 8: 77-81
- Mogensen CE, Neldam S, Tikkanen I, Oren S, Viskoper R, Watts RW, Cooper ME (2000): Randomised controlled trial of dual blockade of renin-angiotensin system in patients with hypertension, microalbuminuria, and non-insulin dependent diabetes: the candesartan and lisinopril microalbuminuria (CALM) study. *Bmj* 321: 1440-4
- Morrissey JJ, Klahr S (1999): Effect of AT2 receptor blockade on the pathogenesis of renal fibrosis. *Am J Physiol* 276: F39-45
- Mottonen J, Strand A, Symersky J, Sweet RM, Danley DE, Geoghegan KF, Gerard RD, Goldsmith EJ (1992): Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature* 355: 270-3
- Moustakas A, Lin HY, Henis YI, Plamondon J, O'Connor-McCourt MD, Lodish HF (1993): The transforming growth factor beta receptors types I, II, and III form hetero-oligomeric complexes in the presence of ligand. *J Biol Chem* 268: 22215-8
- Müller GA, Rodemann HP (1991): Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: I. Immunophenotyping of cultured tubular epithelial cells and fibroblasts

7 Literaturverzeichnis

- derived from kidneys with histologically proven interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 17: 680-3
- Myers GJ, Tyler HR (1972): The etiology of deafness in Alport's syndrome. *Arch Otolaryngol* 96: 333-40
- Naito T, Ma LJ, Yang H, Zuo Y, Tang Y, Han JY, Kon V, Fogo AB Angiotensin type 2 receptor actions contribute to angiotensin type 1 receptor blocker effects on kidney fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F683-91
- Nakamura S, Nakamura I, Ma L, Vaughan DE, Fogo AB (2000): Plasminogen activator inhibitor-1 expression is regulated by the angiotensin type 1 receptor in vivo. *Kidney Int* 58: 251-9
- Navar LG (1997): The kidney in blood pressure regulation and development of hypertension. *Med Clin North Am* 81: 1165-98
- Ng DP, Tai BC, Koh D, Tan KW, Chia KS (2005): Angiotensin-I converting enzyme insertion/deletion polymorphism and its association with diabetic nephropathy: a meta-analysis of studies reported between 1994 and 2004 and comprising 14,727 subjects. *Diabetologia* 48: 1008-16
- Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Lan HY (1998): Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int* 54: 864-76
- Ninichuk V, Gross O, Segerer S, Hoffmann R, Radomska E, Buchstaller A, Huss R, Akis N, Schlondorff D, Anders HJ (2006): Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney Int* 70: 121-9
- Oda T, Jung YO, Kim HS, Cai X, Lopez-Guisa JM, Ikeda Y, Eddy AA (2001): PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney Int* 60: 587-96
- Oikawa T, Freeman M, Lo W, Vaughan DE, Fogo A (1997): Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 in vivo: a new mechanism for the anti-fibrotic effect of renin-angiotensin inhibition. *Kidney Int* 51: 164-72
- Oka T, Yoshimura N (1996): Immunosuppression in organ transplantation. *Jpn J Pharmacol* 71: 89-100
- Okada H, Ban S, Nagao S, Takahashi H, Suzuki H, Neilson EG (2000): Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation. *Kidney Int* 58: 587-97
- Okada H, Inoue T, Kanno Y, Kobayashi T, Watanabe Y, Kopp JB, Carey RM, Suzuki H (2002): Interstitial fibroblast-like cells express renin-angiotensin system components in a fibrosing murine kidney. *Am J Pathol* 160: 765-72

7 Literaturverzeichnis

- Olson D, Pollanen J, Hoyer-Hansen G, Ronne E, Sakaguchi K, Wun TC, Appella E, Dano K, Blasi F (1992): Internalization of the urokinase-plasminogen activator inhibitor type-1 complex is mediated by the urokinase receptor. *J Biol Chem* 267: 9129-33
- Oreopoulos DG, Ossareh S, Thodis E (2008): Peritoneal dialysis: past, present, and future. *Iran J Kidney Dis* 2: 171-82
- Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA (2005): Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121: 335-48
- Ots M, Mackenzie HS, Troy JL, Rennke HG, Brenner BM (1998): Effects of combination therapy with enalapril and losartan on the rate of progression of renal injury in rats with 5/6 renal mass ablation. *J Am Soc Nephrol* 9: 224-30
- Oxburgh L (2009): Control of the bone morphogenetic protein 7 gene in developmental and adult life. *Curr Genomics* 10: 223-30
- Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK, Oppermann H (1990): OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. *Embo J* 9: 2085-93
- Parving HH, de Zeeuw D, Cooper ME, Remuzzi G, Liu N, Linceford J, Shahinfar S, Wong PH, Lyle PA, Rossing P (2008): ACE gene polymorphism and losartan treatment in type 2 diabetic patients with nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 19: 771-9
- Paueksakon P, Revelo MP, Ma LJ, Marcantoni C, Fogo AB (2002): Microangiopathic injury and augmented PAI-1 in human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 61: 2142-8
- Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R (2006): Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86: 747-803
- Perna A, Ruggenti P, Testa A, Spoto B, Benini R, Misefari V, Remuzzi G, Zoccali C (2000): ACE genotype and ACE inhibitors induced renoprotection in chronic proteinuric nephropathies. *Kidney Int* 57: 274-81
- Pinkau T, Hilgers KF, Veelken R, Mann JF (2004): How does minor renal dysfunction influence cardiovascular risk and the management of cardiovascular disease? *J Am Soc Nephrol* 15: 517-23
- Popovich RP, Moncrief JW, Nolph KD, Ghods AJ, Twardowski ZJ, Pyle WK (1978): Continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann Intern Med* 88: 449-56
- Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarajah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T (2001): Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 195: 229-35
- Qi W, Chen X, Poronnik P, Pollock CA (2006): The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1-5

7 Literaturverzeichnis

- Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP (1999): Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 274: 13066-76
- Remuzzi A, Perico N, Sangalli F, Vendramin G, Moriggi M, Ruggenti P, Remuzzi G (1999): ACE inhibition and ANG II receptor blockade improve glomerular size-selectivity in IgA nephropathy. *Am J Physiol* 276: F457-66
- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F (1990): An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86: 1343-6
- Roberts AB, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, De Larco JE, Todaro GJ (1980): Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 3494-8
- Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB (1981): New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 5339-43
- Robles NR, Romero B, Fernandez-Carbonero E, Sanchez-Casado E, Cubero JJ (2009): Angiotensin-converting enzyme inhibitors versus angiotensin receptor blockers for diabetic nephropathy: a retrospective comparison. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 10: 195-200
- Rodemann HP, Müller GA (1991): Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 17: 684-6
- Ross R, Everett NB, Tyler R (1970): Wound healing and collagen formation. VI. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. *J Cell Biol* 44: 645-54
- Roufosse C, Bou-Gharios G, Prodromidi E, Alexakis C, Jeffery R, Khan S, Otto WR, Alter J, Poulos R, Cook HT (2006): Bone marrow-derived cells do not contribute significantly to collagen I synthesis in a murine model of renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 17: 775-82
- Ruggenti P, Perna A, Remuzzi G (2001): ACE inhibitors to prevent end-stage renal disease: when to start and why possibly never to stop: a post hoc analysis of the REIN trial results. *Ramipril Efficacy in Nephropathy. J Am Soc Nephrol* 12: 2832-7
- Ruggenti P, Bettinaglio P, Pinares F, Remuzzi G (2008): Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism and renoprotection in diabetic and nondiabetic nephropathies. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: 1511-25

7 Literaturverzeichnis

- Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J (2006): Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant* 21: 16-20
- Ruzinova MB, Benezra R (2003): Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol* 13: 410-8
- Ryan GB, Cliff WJ, Gabbiani G, Irle C, Montandon D, Statkov PR, Majno G (1974): Myofibroblasts in human granulation tissue. *Hum Pathol* 5: 55-67
- Sadjadi J, Kramer GL, Yu CH, Burrell Welborn M, 3rd, Chappell MC, Gregory Modrall J (2005): Angiotensin converting enzyme-independent angiotensin ii production by chymase is up-regulated in the ischemic kidney in renovascular hypertension. *J Surg Res* 127: 65-9
- Savigne J, Rana K, Tonna S, Buzzza M, Dagher H, Wang YY (2003): Thin basement membrane nephropathy. *Kidney Int* 64: 1169-78
- Schalkwijk CG, Stehouwer CD (2006): PAI-1 inhibition in obesity and the metabolic syndrome: a promising therapeutic strategy. *Thromb Haemost* 96: 698-9
- Schnaper HW (1995): Balance between matrix synthesis and degradation: a determinant of glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 9: 104-11
- Seiffert D, Loskutoff DJ (1991): Evidence that type 1 plasminogen activator inhibitor binds to the somatomedin B domain of vitronectin. *J Biol Chem* 266: 2824-30
- Shi Y, Massague J (2003): Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700
- Simon M, Maresh JG, Harris SE, Hernandez JD, Arar M, Olson MS, Abboud HE (1999): Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney. *Am J Physiol* 276: F382-9
- Siragy HM (2007): Angiotensin AT1 and AT2 receptors - the battle for health and disease. *Nephrol Dial Transplant* 22: 3128-30
- Siragy HM, Inagami T, Ichiki T, Carey RM (1999): Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT2) angiotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6506-10
- Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK (1986): Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science* 233: 532-4
- St Peter WL (2007): Introduction: chronic kidney disease: a burgeoning health epidemic. *J Manag Care Pharm* 13: S2-5
- Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T (1995): The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 95: 651-7
- Strutz F (2009): EMT and proteinuria as progression factors. *Kidney Int* 75: 475-81

7 Literaturverzeichnis

- Strutz F, Neilson EG (2003): New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. Springer Semin Immunopathol 24: 459-76
- Strutz F, Müller GA (2006): Renal fibrosis and the origin of the renal fibroblast. Nephrol Dial Transplant 21: 3368-70
- Strutz F, Zeisberg M (2006): Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. J Am Soc Nephrol 17: 2992-8
- Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG (1995): Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. J Cell Biol 130: 393-405
- Strutz F, Heeg M, Kochsiek T, Siemers G, Zeisberg M, Müller GA (2000 a): Effects of pentoxifylline, pentifylline and gamma-interferon on proliferation, differentiation, and matrix synthesis of human renal fibroblasts. Nephrol Dial Transplant 15: 1535-46
- Strutz F, Zeisberg M, Hemmerlein B, Sattler B, Hummel K, Becker V, Müller GA (2000 b): Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. Kidney Int 57: 1521-38
- Strutz F, Renziehausen A, Dietrich M, Amin J, Becker V, Heeg M, Rastaldi MP, Müller GA (2001 a): Cortical fibroblast culture from human biopsies. J Nephrol 14: 190-7
- Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, van Kooten C, Müller GA (2001 b): TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). Kidney Int 59: 579-92
- Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Müller GA, Neilson EG (2002): Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. Kidney Int 61: 1714-28
- Tan F, Mukherjee JJ, Lee KO, Lim P, Liew CF Dual blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system is safe and effective in reducing albuminuria in Asian type 2 diabetic patients with nephropathy. Singapore Med J 51: 151-6
- Tang WW, Ulich TR, Lacey DL, Hill DC, Qi M, Kaufman SA, Van GY, Tarpley JE, Yee JS (1996): Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. Am J Pathol 148: 1169-80
- ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH, Miyazono K (1994): Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. J Biol Chem 269: 16985-8
- Thilly N, Boini S, Kessler M, Briancon S, Frimat L (2009): Management and control of hypertension and proteinuria in patients with advanced chronic kidney disease under nephrologist care or not: data from the AVENIR study (AVantagE de la Nephroprotection dans l'Insuffisance Renale). Nephrol Dial Transplant 24: 934-9

7 Literaturverzeichnis

- Thompson SM, Deady JP, Willshaw HE, White RH (1987): Ocular signs in Alport's syndrome. *Eye (Lond)* 1 (Pt 1): 146-53
- Togawa H, Nakanishi K, Shima Y, Obana M, Sako M, Nozu K, Tanaka R, Iijima K, Yoshikawa N (2009): Increased chymase-positive mast cells in children with crescentic glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol* 24: 1071-5
- Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C (2005): Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F31-42
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002): Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 349-63
- Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K (1999): Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest* 104: 925-35
- Turner AN, Rees AJ (1996): Goodpasture's disease and Alport's syndromes. *Annu Rev Med* 47: 377-86
- Urata H, Kinoshita A, Perez DM, Misono KS, Bumpus FM, Graham RM, Husain A (1991): Cloning of the gene and cDNA for human heart chymase. *J Biol Chem* 266: 17173-9
- van der Loop FT, Heidet L, Timmer ED, van den Bosch BJ, Leinonen A, Antignac C, Jefferson JA, Maxwell AP, Monnens LA, Schroder CH (2000): Autosomal dominant Alport syndrome caused by a COL4A3 splice site mutation. *Kidney Int* 58: 1870-5
- Vanholder R, Van Laecke S, Glorieux G (2008): What is new in uremic toxicity? *Pediatr Nephrol* 23: 1211-21
- Vaughan DE (2005): PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 3: 1879-83
- Voskarides K, Damianou L, Neocleous V, Zouvani I, Christodoulidou S, Hadjiconstantinou V, Ioannou K, Athanasiou Y, Patsias C, Alexopoulos E (2007): COL4A3/COL4A4 mutations producing focal segmental glomerulosclerosis and renal failure in thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 18: 3004-16
- Wada T, Sakai N, Sakai Y, Matsushima K, Kaneko S, Furuichi K (2010): Involvement of bone-marrow-derived cells in kidney fibrosis. *Clin Exp Nephrol* 15: 8-13
- Wang S, Chen Q, Simon TC, Strebeck F, Chaudhary L, Morrissey J, Liapis H, Klahr S, Hruska KA (2003): Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int* 63: 2037-49
- Wang SN, Lapage J, Hirschberg R (2001): Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 12: 2392-9
- Wang Y, Harris DC (2011): Macrophages in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 22: 21-7

7 Literaturverzeichnis

- Wang Y, Ng MC, So WY, Tong PC, Ma RC, Chow CC, Cockram CS, Chan JC (2005): Prognostic effect of insertion/deletion polymorphism of the ace gene on renal and cardiovascular clinical outcomes in Chinese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 28: 348-54
- Weiskirchen R, Meurer SK (2007): Bone morphogenetic protein-7 in focus: a member of the transforming growth factor-beta superfamily is implicated in the maintenance of liver health. *Hepatology* 45: 1324-5
- Whaley-Connell A, Sowers JR, McCullough PA, Roberts T, McFarlane SI, Chen SC, Li S, Wang C, Collins AJ, Bakris GL (2009): Diabetes mellitus and CKD awareness: the Kidney Early Evaluation Program (KEEP) and National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Am J Kidney Dis* 53: S11-21
- Wiggins R, Goyal M, Merritt S, Killen PD (1993): Vascular adventitial cell expression of collagen I messenger ribonucleic acid in anti-glomerular basement membrane antibody-induced crescentic nephritis in the rabbit. A cellular source for interstitial collagen synthesis in inflammatory renal disease. *Lab Invest* 68: 557-65
- Wizemann V, Benedum J (1994): Nephrology dialysis transplantation 70th anniversary of haemodialysis--the pioneering contribution of Georg Haas (1886-1971). *Nephrol Dial Transplant* 9: 1829-31
- Wolf G, Neilson EG (1993): Angiotensin II as a hypertrophogenic cytokine for proximal tubular cells. *Kidney Int Suppl* 39: S100-7
- Wolf G, Ziyadeh FN, Thaïss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, Zahner G, Helmchen U, Stahl RA (1997): Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. Role of the angiotensin type 2 receptor. *J Clin Invest* 100: 1047-58
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988): Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-34
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J (1994): Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370: 341-7
- Yamashita H, ten Dijke P, Franzen P, Miyazono K, Heldin CH (1994): Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 269: 20172-8
- Yang J, Liu Y (2002): Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 13: 96-107
- Yang J, Shultz RW, Mars WM, Wegner RE, Li Y, Dai C, Nejak K, Liu Y (2002): Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Clin Invest* 110: 1525-38

7 Literaturverzeichnis

- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA (2004): Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117: 927-39
- Yavuz A, Tetta C, Ersoy FF, D'Intini V, Ratanarat R, De Cal M, Bonello M, Bordoni V, Salvatori G, Andrikos E (2005): Uremic toxins: a new focus on an old subject. *Semin Dial* 18: 203-11
- Yong D, Qing WQ, Hua L, Kan JJ, Xi CJ, Jin QQ, Chao SH (2006): Association of angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and IgA nephropathy: a meta-analysis. *Am J Nephrol* 26: 511-8
- Zeisberg M (2006): Bone morphogenic protein-7 and the kidney: current concepts and open questions. *Nephrol Dial Transplant* 21: 568-73
- Zeisberg M, Kalluri R (2004): The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* 82: 175-81
- Zeisberg M, Neilson EG (2009): Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119: 1429-37
- Zeisberg M, Strutz F, Müller GA (2000): Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *J Nephrol* 13 Suppl 3: S111-20
- Zeisberg M, Strutz F, Müller GA (2001): Renal fibrosis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10: 315-20
- Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, Maeshima Y, Strutz F, Müller GA, Kalluri R (2003 a): Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F1060-7
- Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R (2003 b): BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 9: 964-8
- Zhang G, Kim H, Cai X, Lopez-Guisa JM, Alpers CE, Liu Y, Carmeliet P, Eddy AA (2003 a): Urokinase receptor deficiency accelerates renal fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14: 1254-71
- Zhang G, Kim H, Cai X, Lopez-Guisa JM, Carmeliet P, Eddy AA (2003 b): Urokinase receptor modulates cellular and angiogenic responses in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14: 1234-53
- Zhou A, Huntington JA, Pannu NS, Carrell RW, Read RJ (2003): How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat Struct Biol* 10: 541-4
- Zidek W (2010): Strategie bei Niereninsuffizienz. *ARS Medici* 17: 680-682

Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Dabei gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. Frank Strutz, KfH-Nierenzentrum Wiesbaden, für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die kontinuierliche Betreuung und die Unterstützung bei der Lösung auftretender Probleme. Ich danke Herrn Prof. Strutz für die Bereitstellung der finanziellen Mittel, der Materialien und des Laborarbeitsplatzes, wodurch die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglicht wurde.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. med. Stefan Koschnick für die Einarbeitung in die Thematik und Methodik und v.a. für die zahlreichen Hilfestellungen im Umgang mit den Versuchstieren. Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Oliver Gross aus der Abteilung für Nephrologie und Rheumatologie der Universitätsmedizin Göttingen für die zur Verfügung gestellten Versuchstiere und seiner Arbeitsgruppe für die Durchführung der Genotypisierung. Frau Christina Stanischa aus der Abteilung für Nephrologie und Rheumatologie der Universitätsmedizin Göttingen möchte ich für die Einarbeitung in die angewandten histologischen und molekularbiologischen Methoden danken, für die Unterstützung bei der Konservierung der Organproben und die tatkräftige Hilfe bei den PCR-Ansätzen, v.a. aber für die gute Arbeitsatmosphäre im Labor. Ich danke Frau Regina Waldmann-Beushausen aus der Abteilung für Thorax-Herz-Gefäßchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen, deren Ratschlägen und Tipps ich die Qualität der histologischen Färbungen zu verdanken habe. Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Klaus Jung aus der Abteilung für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen für die Beratung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten dieser Dissertation.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Michael Zeisberg aus der Abteilung für Nephrologie und Rheumatologie der Universitätsmedizin Göttingen, der mir ermöglichte im Rahmen der Dissertation 3 Monate in seiner Arbeitsgruppe am Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, mitzuwirken, wodurch ich ebenfalls zahlreiche konstruktive und hilfreiche Anregungen für meine Dissertation erhielt.

Lebenslauf

Am 13.12.1983 wurde ich in Rodewisch als Sohn von Viola Ulrike Bemme und Frank Bemme geboren. Nach der Grundschulzeit setzte ich meine schulische Ausbildung von 1994 bis 2002 am J.-H.-Pestalozzi-Gymnasium in Rodewisch fort und beendete diese im Juni 2002 mit dem Abitur. Den Zivildienst leistete ich in der Abteilung für Traumatologie und Gelenkchirurgie des Klinikums Obergöltzsch in Rodewisch ab. Im Oktober 2003 nahm ich das Medizinstudium an der Georg-August-Universität in Göttingen auf. Im September 2005 bestand ich den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Im Zeitraum von 2006 bis 2008 absolvierte ich verschiedene Famulaturen, u.a. in der Abteilung für Kardiologie der Universitätsklinik Tübingen, in der Abteilung für Traumatologie und Gelenkchirurgie des Klinikums Obergöltzsch in Rodewisch, in der Universitäts-Augenklinik in Tübingen und am Vajira Hospital in Bangkok in der Abteilung für Herz-Thorax-Chirurgie und Neurochirurgie. Seit März 2007 bin ich Doktorand in der AG von Prof. Dr. Frank Strutz, Abteilung für Nephrologie und Rheumatologie der Universitätsmedizin Göttingen, und von November 2008 bis Februar 2009 absolvierte ich ein Laborpraktikum in der AG von Dr. Michael Zeisberg der Division of Matrix Biology am Deaconess Medical Center, Harvard Medical School in Boston. Das 1. Tertial des Praktischen Jahres absolvierte ich in den Abteilungen für Nephrologie und Rheumatologie sowie für Hämatologie und Onkologie der Universitätsmedizin Göttingen. Das 2. Tertial des Praktischen Jahres absolvierte ich in der Abteilung für Augenheilkunde der Universitätsmedizin Göttingen. Das 3. Tertial des Praktischen Jahres absolvierte ich am Spitalzentrum Oberwallis in der Schweiz in den Abteilungen für Chirurgie, Unfallchirurgie und Orthopädie. Am 23. Juni 2010 bestand ich den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Am 1. Dezember 2010 begann ich die Facharztausbildung zum Facharzt für Augenheilkunde in der Klinik für Ophthalmologie der Universitätsmedizin Göttingen.