

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Hypertensiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Berlin-Buch

DISSERTATION

Die Rolle von *growth arrest specific protein 6* im Aldosteron induzierten Endorganschaden

– Untersuchungen an einem Knockout-Mausmodell –

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefanie Theuer geb. Wresche

Ärztin aus Wriezen

Datum der Promotion: 25.10.2013

Abstract

Growth arrest specific protein 6 (Gas 6) is involved in inflammatory kidney diseases, vascular remodeling, cell adhesion, and thrombus formation. We explored a role for Gas 6 in aldosterone-induced target organ damage. We observed that Gas 6 was upregulated in rats with high aldosterone levels. Mineralocorticoid receptor blockade prevented target organ damage and decreased the elevated Gas 6 expression. Vascular smooth muscle cells given aldosterone increased their Gas 6 expression in vitro. To test the pathophysiological relevance, we investigated the effects of deoxycorticosterone acetate (DOCA) on Gas 6 gene-deleted ($^{-/-}$) mice. After 6 weeks DOCA, Gas 6 $^{-/-}$ mice developed similar telemetric blood pressure elevations compared to wild-type mice but were protected from cardiac hypertrophy. Cardiac expression of interleukin 6 and collagen IV was blunted in Gas 6 $^{-/-}$ mice, indicating reduced inflammation and fibrosis. Gas 6 $^{-/-}$ mice also had an improved renal function with reduced albuminuria, compared to wild-type mice. Renal fibrosis and fibronectin deposition in the kidney were also reduced. Gas 6 deficiency reduces the detrimental effects of aldosterone on cardiac and renal remodeling independent of blood pressure reduction. Gas 6 appears to play a role in mineralocorticoid receptor-mediated target organ damage. Furthermore, because warfarin interferes with Gas 6 protein expression, the findings could be of clinical relevance for anticoagulant choices.

Growth arrest specific protein 6 (Gas 6) spielt eine Rolle bei inflammatorischen Niereerkrankungen, Gefäßremodeling, Zelladhäsion und Thrombusbildung. Wir untersuchten die Beteiligung von Gas 6 im Aldosteron induzierten Endorganschaden, nachdem wir feststellten, dass die Gas 6 Expression in Ratten mit hohen Aldosteron-Spiegeln angestiegen ist. Eine Mineralokortikoid-Rezeptor-Blockade schützte diese Ratten vor Endorganschäden und senkte die Gas 6 Spiegel. Das selbe Verhalten wurde in Versuchen in der Zellkultur beobachtet. Glatte Gefäßmuskelzellen, die mit Aldosteron inkubiert wurden erhöhten die Gas6 Expression. Um nun die pathophysiologische Relevanz zu untersuchen, erhielten Gas6 Knockoutmäuse (-/-) und Mäuse ohne einen Knockout für Gas 6 (+/+), nach einer Uninephrektomie, Deoxycorticosteronacetat (DOCA). Hier handelt es sich um eine Vorstufe von Aldosteron, für die Nager besonders sensibel sind. Nach sechs Wochen zeigten die Knockoutmäuse den gleichen Blutdruckanstieg wie die Wildtypmäuse. Jedoch waren die Gas 6 $^{-/-}$ Mäuse vor einer Herzhypertrophie geschützt, im Gegensatz zu den Gas 6 $^{+/+}$ Mäusen. Die histologischen Untersuchungen von Interleukin 6 und Collagen IV zeigten zudem eine verminderte Inflammation und Fibrosierung der Gas 6 $^{-/-}$. Die Untersuchung der Nieren und Nierenfunktion zeigte ähnliches. Gas 6 $^{-/-}$ Mäuse hatten eine geringere Albuminurie und eine reduzierte renale Entzündung und Fibrose. Die Abwesenheit von Gas 6 bewirkte eine Verringerung der Effekte von Aldosteron auf das kardiale und renale Remodeling, wobei der Blutdruck dabei keine Rolle spielt. Gas 6 scheint eine Rolle zu spielen in der Entwicklung einer Aldosteron induzierten Endorganschädigung. Da Gas 6 zudem Vitamin K- abhängig gebildet wird, könnte es eine klinische Relevanz in Bezug auf den Einsatz von Antikoagulantien wie z.B. Warfarin geben.

Meinem lieben Ehemann Jürgen Theuer

Unserem Sohn Friedrich

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.01 Aldosteron und die Erhebung aus dem Wasser	7
– Ein historischer Überblick	
1.02 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	8
1.03 RAAS und Endorganschaden	9
1.04 Aldosteron	10
1.05 Aldosteron und seine Rolle bei der Entwicklung von Organschäden	13
1.06 Gas6 und seine Rezeptoren	18
1.07 Die Aufgaben von Gas6 im Organismus	22
1.08 Gas6 und seine Beteiligung an renalen Erkrankungen	23
1.09 Gas6 im Herzgewebe	25
1.10 Gas6 und das RAAS	26
1.11 Ziel der Versuche	27
1.12 Fragestellung	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Materialien	28
2.1.1 Übersicht der verwendeten Chemikalien und Wirkstoffe	28
2.1.2 Übersicht der verwendeten Primer	29
2.1.3 Übersicht der verwendeten Antikörper (Immunhistochemie)	29
2.2 Tierversuch	30
2.2.1 Tiere und Tierhaltung	30
2.2.2 Tierzucht	30
2.2.3 Behandlungsprotokolle	31
2.2.4 Uninephrectomie	33
2.2.5 Verabreichung der DOCA-Pellets	33
2.2.6 Transthorakale Echokardiographie	33
2.2.7 Telemetrische Messung des systemischen Blutdruckes	34
2.2.8 Opferung und Organentnahme	35

Inhaltsverzeichnis

2.3 Genotypisierung der Mäuse	36
2.3.1 DNA- Extraktion	36
2.3.2 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)	36
2.3.3 Gel- Elektrophorese	37
2.4 Biochemische Messungen	40
2.4.1 Messung der renalen Albuminausscheidung	40
2.4.2 Messungen von Kreatinin im Urin	40
2.4.3 Der Albumin-Kreatinin-Quotient	41
2.5 Vorbereitende histologische Techniken	41
2.5.1 Gewebefixierung	41
2.5.2 Paraffineinbettung und Schneiden	42
2.5.3 Entparaffinieren	43
2.5.4 Gefrierschnitte	43
2.6 Konventionelle Färbung	44
2.6.1 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung	44
2.6.2 Auswertung der konventionellen Histologie	46
2.7 Immunhistochemische Färbungen	46
2.7.1 Indirekte Immunfluoreszenz- Methode	46
2.7.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	47
2.7.3 Dokumentation der histologischen Ergebnisse	48
2.8 Statistik	48
3 Ergebnisse	49
3.1 Betrachtung der Mauszucht und der Mortalität	49
3.2 Entwicklung des systemischen Blutdruckes	50
3.3 Morphologische und funktionelle Veränderungen am Herzen	52
3.3.1 Der Heart/Body Index und die linksventrikuläre Masse	52
3.3.2 Inflammation und Proliferation in der Histologie	54
3.3.3 Auswertung der Herzfunktion	58
3.3.4 Zusammenfassung	59
3.4 Morphologische und funktionelle Veränderungen an den Nieren	61
3.4.1 Die Albumin-Ausscheidung und der Albumin-Kreatinin-Quotient	61
3.4.2 Histopathologische Auswertung der Nieren	63
3.4.3 Inflammation und Proliferation in der Histologie	64
3.4.4 Zusammenfassung	67

4 Diskussion	69
4.1 Diskussion der Nierenfunktion und Morphologie	71
4.2 Diskussion der Funktion und Morphologie des Herzens	74
4.3 Ausblick	77
5 Zusammenfassung	79
6 Literaturverzeichnis	81
7 Abbildungen und Tabellen	87
8 Abkürzungsverzeichnis	89
9 Eidesstattliche Versicherung	91
10 Publikationen	92
11 Danksagung	93
12 Lebenslauf	94

1 Einleitung

1.01 Aldosteron und die Erhebung aus dem Wasser

– Ein historischer Überblick –

Obwohl die genauen Wirkungsmechanismen von Aldosteron noch immer nicht vollständig geklärt werden konnten, handelt es sich bei dem Mineralokortikoid nicht um ein phylogenetisch junges Hormon. Vielmehr ist Aldosteron ein interessantes Beispiel für die Evolution. Bereits vor ca. 400 Millionen Jahren, im Zeitalter des Devons, entstand das Gen für die Aldosteronsynthese. Dies geschah zu der Zeit, als sich Fleischflosser von den Strahlenflossern trennten und die Kolonisation des Festlandes begann. Aldosteron wurde bereits in Lungenfischen, die einen evolutionären Übergang von der Wasserbesiedelung zu der Landbesiedelung darstellten, gefunden. Diese Fische besaßen Kiemen für die Wasseratmung und einfache Lungen für die Atmung an der Wasseroberfläche. Interessanterweise bestand die Aufgabe von Aldosteron nicht vorwiegend darin, den Wasser- und Elektrolythaushalt zu regulieren, sondern das Stresshormon Kortikosteron zu unterstützen. Mit dem Übergang aus dem Meer auf das Land wurden auch die Binnengewässer besiedelt, welche bei Dürreperioden nur wenig Wasser trugen. Um eine Hypoxie durch fehlendes Wasser zu verarbeiten, wurde Kortikosteron benötigt. Kortikosteron und Aldosteron interagierten mit einem identischen Rezeptor [1] Erst viel später, mit der Entwicklung der Säuger, erhielt Aldosteron seine spezifischen Funktionen, die sich von den Aufgaben des Glukokorticoids unterschieden. Dies wurde möglich durch die Entwicklung der *11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase*, die Kortisol und Kortikosteron inaktivieren. Dabei wurde die Ausschüttung von Aldosteron vom zirkulierenden Angiotensin II (Ang II) sowie von der Konzentration an Kalium und Natrium reguliert. Es ist somit ein Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Weiteren phylogenetischen Studien zur Folge ist der Mineralocorticoidrezeptor noch viel älter als Aldosteron. Er entstand aus einem vorzeitlichen Glukokorticoidrezeptor vor mehr als 450 Millionen Jahren. [1-2]

1.02 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt eine fundamentale Rolle bei der Aufrechterhaltung der hämodynamischen Stabilität. Durch das Zusammenspiel zwischen zahlreichen Peptiden steuert es das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen und die Elektrolyt- Balance, und nimmt so Einfluss auf das kardiovaskuläre System. Zudem interagiert das RAAS mit anderen vasomotorischen Komponenten, wie zum Beispiel dem sympathischen Nervensystem und anderen vasoaktiven Hormonen, und vermittelt dadurch Effekte auf den Gefäßtonus in unterschiedlichen Organen. Dabei kommt es zu einer Erhöhung des peripheren Widerstands mit Anstieg des arteriellen Blutdrucks und über eine gesteigerte renale Natrium- und Flüssigkeitsretention zur Erhöhung des zirkulierenden Plasmavolumens und der Vorlast. Über diese Mechanismen kann die Organperfusion aufrecht erhalten werden, beispielsweise bei akuten Blutverlusten. [3] Das RAAS besteht aus einer Kaskade von Hormonen. Schematisch wird diese Kaskade in Abb.1 dargestellt.

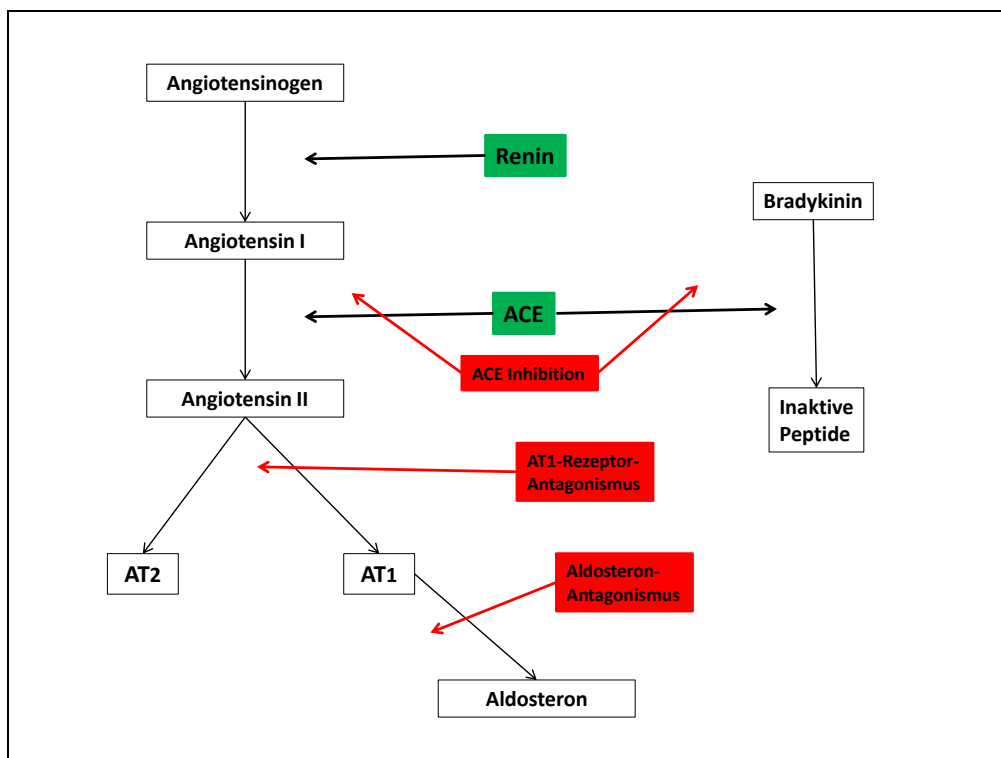


Abb. 1: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System mit seinen Inhibitoren. AT1 = Angiotensin II Typ1 Rezeptor; AT2 = Angiotensin II Typ 2 Rezeptor; ACE = angiotensin converting enzyme [4]

Das Hormon Renin wird im juxtaglomerulären Apparat der Niere freigesetzt.[4-5] Es wirkt lokal und systemisch, und spaltet das u.a. in der Leber gebildete Peptid Angiotensinogen in Angiotensin I. Das proteolytische Angiotensin-converting enzyme (ACE) konvertiert das biologisch inaktive Angiotensin I in das aktive Angiotensin II (Ang II) durch Abspaltung von Peptiden. Das ACE wird von verschiedenen Zellen gebildet. Dazu gehören Endothelzellen in der Lunge und den Gefäßen sowie Zellen in der Niere, im Herzen und im Gehirn. Ang II ist Ligand für die Rezeptoren Angiotensin-Typ1 (AT1) und Angiotensin-Typ2 (AT2), die antagonistisch wirken. Dabei übt Ang II seine physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen hauptsächlich über den AT1-Rezeptor aus. Der AT1-Rezeptor gehört zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Er befindet sich an Gefäßmuskelzellen, in renalen Gefäß- und Mesangialzellen, Nebennierenzellen und im Gehirn. Über diesen Rezeptor werden eine Vasokonstriktion, eine Erhöhung der renalen Na-Resorption sowie die ADH-Ausschüttung vermittelt. Zudem stellt Ang II einen wichtigen Stimulus für die Aldosteronausschüttung aus der Nebennierenrinde dar. Ang II kann aber auch unabhängig von der systemischen Aktivierung des RAAS lokal in Geweben gebildet werden. Z. B. wird ein Teil des biologisch aktiven Ang II lokal im Herzmuskel produziert. Angiotensinogen wird in Kardiomyozyten gebildet, während Endothelzellen ACE synthetisieren.[6] Dort vermittelt es Vorgänge im Rahmen von Entzündung und Proliferation durch die Aktivierung von Zytokinen. [5]

1.03 RAAS und Endorganschaden

So wichtig das RAAS bei der Aufrechterhaltung der normalen Hämodynamik und Elektrolytbalance ist und damit zur Aufrechterhaltung des Lebens, so kann eine exzessive oder inadäquate Aktivierung dieser hormonellen Kaskade zur Entstehung von pathologischen Veränderungen in verschiedenen Organen führen. Unreguliertes und übermäßig gebildetes Ang II ist assoziiert mit einer Schädigung des Herzens, der Nieren und der Gefäße, die progressiv und irreversibel ist. Obwohl das RAAS initial protektiv wirkt, indem es eine Aufrechterhaltung der Herz- und Nierenfunktion sichert, kann es über lange Zeit zum Untergang von Nierengewebe mit der Entstehung einer Glomerulosklerose und tubulointerstitiellen Fibrose kommen. Im

Herzen verursacht ein lang andauernder Overload eine kompensatorische Hypertrophie, die sich in der Dilatation des linken Ventrikels und der progressiven kontraktile Dysfunktion zeigt. [7] Nicht zuletzt ist dies auch auf die direkten mitogenen Effekte von Ang II zurückzuführen. Durch die vermehrte Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie z. B. *platelet derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor beta* (TGF- β) und *Nuclear factor- κ B* (NF- κ B) induziert Ang II Entzündungsvorgänge, Zellproliferation und Geweberemodeling. [8-9] Die Hemmung einzelner Komponenten des RAAS ist ein Standardtherapiekonzept bei der Behandlung einer Hypertonie und Hemmung des Voranschreitens von kardiovaskulären Endorganschäden. [10-12]

1.04 Aldosteron

Ang II ist neben einer Hyperkaliämie ein wichtiger Stimulus für die Bildung von Aldosteron in der Nebenniere. Das Mineralokortikoid Aldosteron wurde in den frühen 1950er Jahren, als ein wichtiges Mitglied der Steroidhormonfamilie, das in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde (NNR) gebildet wird identifiziert. [13] Die Biosynthese von Aldosteron geht vom Cholesterin aus. Dabei entsteht über die Zwischenprodukte Pregnenolon und Progesteron das Desoxycorticosteron (DOCA). Die einzelnen Zwischenstufen sind in Abb. 2 zu sehen.

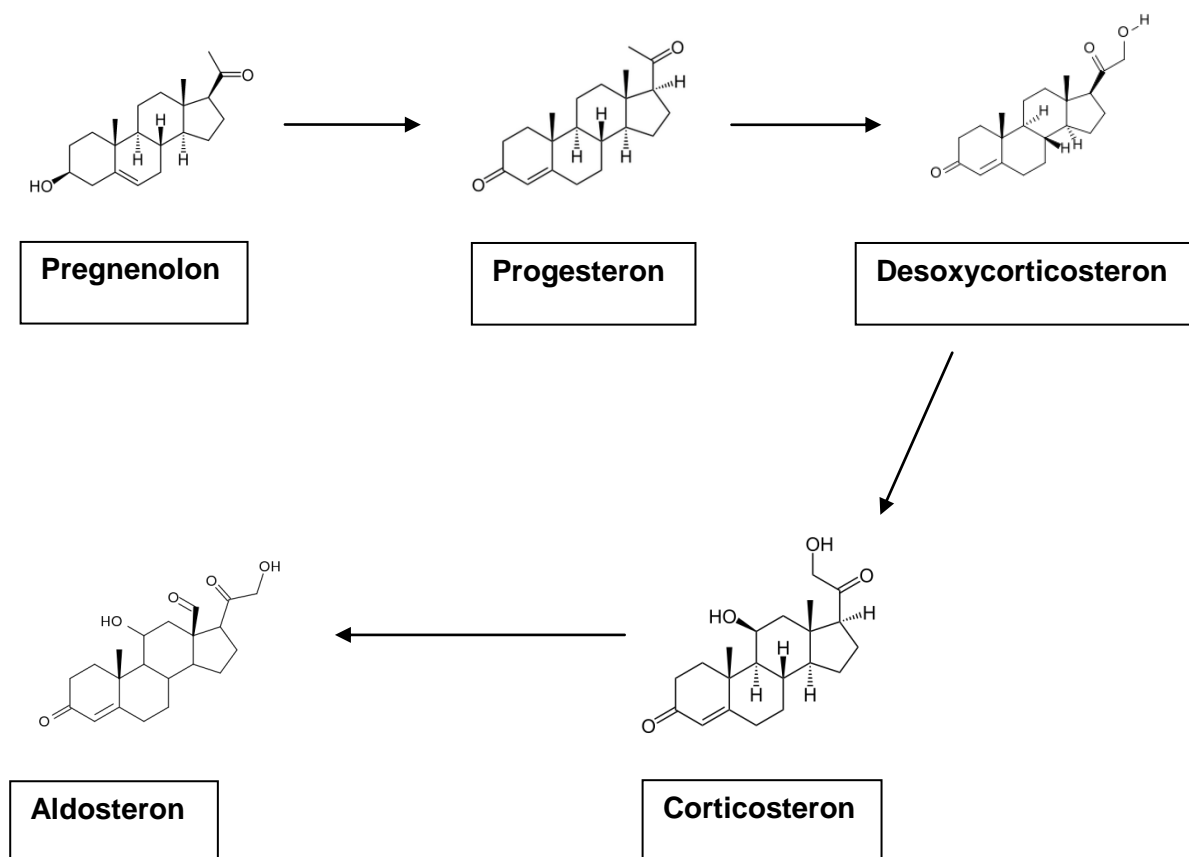


Abb. 2: Schema zur Bildung von Aldosteron. Aus Cholesterin (hier nicht gezeigt) entsteht über Pregnenolon, Progesteron, DOCA und Corticosteron dann das Aldosteron.

DOCA stellt neben Aldosteron einen wichtigen Liganden für den MR dar. Aus dem DOCA entsteht über Corticosteron dann das Aldosteron. Aldosteron ist Ligand des Mineralokortikoidrezeptors (MR), der in der Niere im distalen Nephron exprimiert wird. Zudem wird der MR auch in anderen Geweben, wie z. B. Schweißdrüsen,

Retina, Harnblase und rektale Mukosa aber auch Myokard, Endothel, glatte Gefäßmuskelzellen und Gehirn gebildet. [14] Nicht nur Aldosteron ist Ligand des MR. Auch Glukokortikoide sind in der Lage mit gleicher Affinität am MR zu binden.[15] Da diese in vielen Geweben in hoher Konzentration vorkommen, könnten sie die Bindung von Aldosteron am MR verhindern. Dies verhindert das Enzym 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-2. Es inaktiviert Kortisol, indem es in Kortison überführt wird. Somit kann Aldosteron leichter binden. [16-17]Die klassischen Wirkungen von Aldosteron wie Natriumresorption und Kaliumsekretion werden über die Epithelien des distalen Nierentubulus und über die Epithelien der Schweißdrüsen und des distalen Kolons vermittelt. [18] Aldosteron bindet an intrazellulär gelegene MR. Der Hormon-Rezeptor-Komplex bindet anschließend im Zellkern spezifische „hormon responsive elements“ (HRE) und induziert die Biosynthese der Na⁺/K⁺-ATPase, von Na⁺- und K⁺-Kanalproteinen und des Na⁺/H⁺-Austauschers. Neben diesen genomischen Effekten wurde auch mehrfach eine Wirkungsweise von Aldosteron beschrieben, die u.a. aufgrund der kurzen Dauer oder der Abwesenheit eines Zellkerns nicht genomisch sein kann.[19-21] Diese nicht-genomischen Effekte sind beteiligt sowohl an der Natrium/Kalium Homöostase als auch bei der Entstehung von kardiovaskulären Schäden.[20, 22] Die beteiligten Proteine bzw. Rezeptoren der Signaltransduktionskaskade sind noch nicht vollständig geklärt. Einige Versuche weisen darauf hin, dass ein Teil der nichtgenomischen Effekte über einen mutmaßlichen Membranrezeptor, der hochspezifisch für Aldosteron ist, ausgelöst wird. Teilweise spielt der MR eine Rolle bei der Signaltransduktion der nichtgenomischen Effekte. [20, 22-24] Es konnten aber auch Interaktionen mit Ang II demonstriert werden. [24-26]

Aldosteron führt zu einer Retention von Na⁺ und damit zu einer Steigerung des Blutvolumens. Zudem steigert es die H⁺-Sekretion und führt somit zu einer Erhöhung des pH-Wertes in der Zelle. Die Zielzellen befinden sich im Wesentlichen in der Niere, dem Darm sowie Speichel- und Schweißdrüsen. Die Produktion und die Abgabe von Aldosteron, das im Blut überwiegend an Albumin gebunden ist, werden durch unterschiedliche Mechanismen geregelt. Wirksame Reize für die Aldosteronbildung sind ein Anstieg an extrazellulärem K⁺ und ein Abfall an extrazellulärem Na⁺. Dabei stimuliert die hohe K⁺-Konzentration direkt die Zellen in der Zona glomerulosa der NNR. Eine Abnahme der Na⁺-Konzentration und eine

Abnahme des Blutvolumens und die dadurch verminderte renale Durchblutung stimuliert die Freisetzung von Renin aus den Zellen des juxtaglomerulären Apparates. Die anschließende Bildung von Ang II fördert die Synthese und Sekretion von Aldosteron. (siehe Abb. 3)

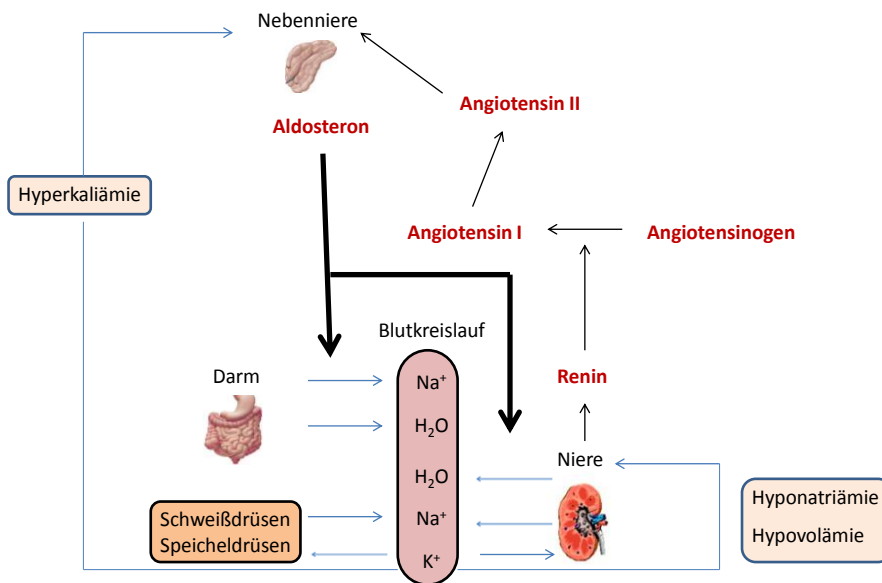


Abb. 3 :Wirkungen von Aldosteron und Einflüsse auf die Hormonfreisetzung. Aldosteron wird von der Nebennierenrinde ausgeschüttet. Es führt im Darm, in den Schweißdrüsen und in den Nieren zu einer Natriumrückresorption und damit zu einer Rückresorption von Wasser. In den Nieren und in den Schweiß- und Speicheldrüsen wird Kalium sezerniert. Stimulatoren von Aldosteron sind Hyperkaliämie, Hypovolämie und Hyponatriämie. Renin, das in den Nieren gebildet wird, reguliert über die Bildung von Angiotensin II, ebenfalls die Aldosteronausschüttung.

Neben der Regulation des Salz-Wasser-Haushaltes nimmt Aldosteron auch Einfluss auf die Kalzium- und Magnesium-Homöostase und damit auch auf den Auf- und Abbau von Knochengewebe. In einer Tierstudie von Chhokar et al. konnte gezeigt werden, dass nach einer Verabreichung von Aldosteron an Ratten die Konzentrationen von Kalzium und Magnesium sowohl im Urin, als auch im Stuhl anstiegen. Zudem stieg die Konzentration von Parathormon im Blut an, wobei die Knochendichte abnahm.[27] Vidal et al. konnten diese Beobachtungen bestätigen

und ergänzend zeigen, dass eine Parathyroidektomie zu einem Auslösen der Aldosteronwirkung führt.[28]

Der Mineralokortikoidrezeptorantagonist (MR-Antagonist) Spironolakton wurde 1958 erstmalig in der Medizin eingesetzt. Durch die Blockade des MR und damit der Hemmung der Aldosteronwirkung wird die Natriuresis und Diuresis induziert. Seit der Einführung der Therapie mit ACE-Inhibitoren in den 1980er Jahren, hatte die Therapie mit MR-Antagonisten an Stellenwert verloren.[29-31] Aktuelle Studien zur therapeutischen Wirksamkeit von MR-Antagonisten bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz bzw. nach akutem Myokardinfarkt haben diese Einstellung grundlegend verändert.[32-34] In experimentellen Modellen hemmen MR-Antagonisten die kardiale Fibrosierung und die Expression inflammatorischer Zytokine und beeinflussen das strukturelle Remodeling des linken Ventrikels nach Infarkt günstig. [35]

1.05 Aldosteron und seine Rolle bei der Entwicklung von Organschäden

Lange wurde Aldosteron eine untergeordnete Rolle in der Entwicklung von Endorganschäden zugeordnet. Die ungünstigen Auswirkungen von Aldosteron auf Herz und Gefäße wurden lange Zeit als sekundäre Effekte der renalen Elektrolyt- und Volumenregulation gedeutet. Man ging außerdem davon aus, dass durch eine Therapie mit ACE-Hemmern oder AT1-Blockern zusätzlich zur Inhibierung von Ang II und dessen Effekten auch die Aldosteronausschüttung verhindert wird, da ja Ang II einen entscheidenden Stimulus dafür darstellt. Interessanterweise musste man dann feststellen, dass nach einer gewissen Zeit unter Ang II-blockierender Therapie die Aldosteronspiegel bei einem Teil der Patienten wieder anstiegen. Dieses Phänomen wurde *aldosterone escape* genannt.[36] Eine Ursache hierfür konnte jedoch noch nicht endgültig gefunden werden. Eine frühe Erklärung war, dass unter ACE-hemmender Therapie nicht nur Aldosteron wieder ansteigt, sondern auch Ang II. Dies führt dann wieder zu einer Stimulation der Nebennierenrinde. [37] Leider kann diese Hypothese nicht erklären, warum es auch bei einer Therapie mit Angiotensin-Rezeptor-Blockern zu einem Anstieg von Aldosteron kommt. Dies konnte in der RESOLVED-Studie beobachtet werden. [38] Ein weiterer Erklärungsansatz könnte der Kaliumanstieg unter Therapie mit Angiotensin-Rezeptor-Blockade sein. In

Tierversuchen konnte zudem ein möglicher Beitrag des AT₂-Rezeptors zum *aldosterone escape* gezeigt werden, da Angiotensin-Rezeptor-Blocker vorwiegend den AT₁ inhibieren. [39] Mit den beiden großen Endpunktstudien RALES und EPHEsus rückte Aldosteron in seiner Rolle bei der Entwicklung von kardiovaskulären Endorganschäden in den Vordergrund.[32-33] RALES schloss Patienten ein mit schwerer Herzinsuffizienz und verabreichte ihnen, zusätzlich zur üblichen Standardtherapie, Spironolaktone. Bei diesen Patienten wurde eine signifikante Senkung der Mortalität festgestellt. [33] Da der MR-Blocker Spironolaktone sehr unspezifisch ist und auch an andere Hormonrezeptoren bindet und diese hemmt, ist er nicht sehr gut verträglich. Nach Entwicklung des weitaus spezifischeren MR-Blockers Eplerenon wurde dann 2003 die zweite große Studie EPHEsus durchgeführt. Hier erhielten Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion nach einem Myokardinfarkt Eplerenon. Ebenfalls wurde eine signifikante Senkung der Mortalität und Morbidität festgestellt. [32] Nun rückte Aldosteron in den Vordergrund sowohl in der pharmakologischen Therapie als auch in der kardiovaskulären Forschung. Aldosteron besitzt mitogene profibrotische und proinflammatorische Eigenschaften, die direkt auf das kardiovaskuläre System wirken und unabhängig von der hämodynamischen Funktion sind. Dies konnte in Kohortenstudien an Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus beobachtet werden. Diese Patienten wiesen, im Vergleich zu Patienten mit essentieller Hypertonie und gleich hohen Blutdruckwerten, signifikant mehr vaskuläre Schäden auf. [40] In Aldosteron-abhängigen Hypertoniemodellen und bei der Herzinsuffizienz konnte eine vermehrte interstitielle und perivaskuläre sowie eine kardiale Fibrose nachgewiesen werden. [41-42] Bei Patienten nach Myokardinfarkt und bei Herzinsuffizienz konnten erhöhte Konzentrationen von Aldosteron sowohl im Herzen als auch im Plasma nachgewiesen werden. Diese erhöhten Spiegel korrelierten mit der Schwere der Erkrankung.[43-45] Eine medikamentöse Therapie mit einem Aldosteronrezeptorblocker zeigte, dass es zu einer Abnahme der kardialen Fibrose bei ischämischen Herzerkrankungen führt. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass eine langandauernde Aldosteronblockade mittels Eplerenon zu einer Reduktion der kardialen Fibrose und der Aktivierung von Matrixmetalloproteasen und zu einer Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion führt. [46-47] Nicht nur direkt am Herzen führt Aldosteron zu Veränderungen, sondern auch an den Gefäßen. So ist Aldosteron beteiligt an der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion und der

Entstehung der Atherosklerose.[48-49] Außerdem spielt es eine Rolle bei der Aktivierung der Thrombozyten.[50] Im Folgenden sind die eben genannten Effekte von Aldosteron zusammengefasst schematisch dargestellt.

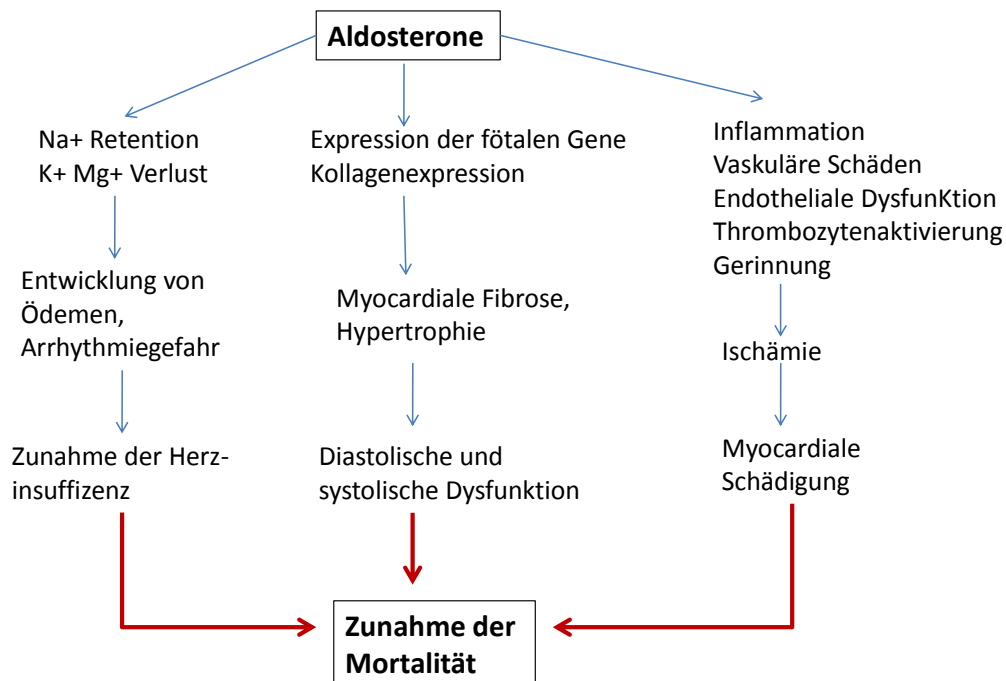


Abb. 4: Schema für die Effekte von Aldosteron auf das kardiovaskuläre und renale System und seine Auswirkungen. Nach Bauersachs 2004.[51]

In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurden die Effekte der alleinigen MR-Blockade bei Ang II induzierten Endorganschäden untersucht. Die Versuche fanden an einem speziellen Rattenmodell (dTGR) statt, das transgen für das humane Renin und das humane Angiotensinogen ist. Diese Tiere entwickeln schwere kardiovaskuläre und renale Schäden und haben lediglich eine Lebensdauer von acht bis neun Wochen. Diese Schäden sind blutdruckunabhängig und können durch alleinige Blutdrucksenkung nicht verhindert werden. [52-53] In diesen Versuchen erhielten die Ratten Spironolaktone. Dieses führte zu einer Reduktion der Herzhypertrophie sowie der Albuminurie. Außerdem konnte die Mortalität bis zu 90% gesenkt werden. [54] In weiteren Untersuchungen in der Zellkultur an glatten Gefäßmuskelzellen konnte zudem gezeigt werden, dass Aldosteron die

Signaltransduktion von Ang II verstärkt und eine Inkubation mit Spironolakton diese Effekte wieder auslöscht. [26]

Albuminurie ist ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen sowohl für die Morbidität als auch für die Mortalität. [55] Bereits 1964 beschrieb Conn bei seinen Untersuchungen an Patienten mit einem Hyperaldosteronismus, dass erhöhte Plasmakonzentrationen von Aldosteron mit der Entwicklung einer Proteinurie vergesellschaftet sein können. [56] Der Einsatz von MR-Blockern scheint die Albuminurie zu senken. So wurden in einer großen randomisierten Doppelblindstudie Patienten mit einer diabetischen Nephropathie zusätzlich zu ACE-Hemmern oder AT1-Inhibitoren Spironolakton verabreicht. Man konnte eine signifikante Senkung der Proteinurie beobachten. [57] Ähnliche Ergebnisse wurden auch in weiteren Studien bei Glomerulonephritiden anderer Genese festgestellt. Dabei waren die Effekte der MR-Blockade auf die Proteinurie immer blutdruckunabhängig. [58] Bei der Pathogenese der Proteinurie spielt eine gestörte Filtrationsbarriere in den Glomeruli, die die Blutharnschanke bilden eine entscheidende Rolle. Teil der Barriere sind die Podozyten. Sie bilden mit ihren Ausläufern ein hochselektives Netz, was die Passage von Albumin verhindern soll. In mehreren Tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass eine hohe Belastung mit Aldosteron zu einer Schädigung der Podozyten führt. Eine Therapie mit MR-Blockern verhinderte die Schäden. [59-60] Neben der Schädigung der Podozyten kommt es auch zu einer Nierenschädigung durch Aktivierung von Zytokinen wie z.B. *transforming growth factor β* (TGF- β), die zu einer vermehrten Bildung von Bindegewebe, Entstehung von Nierenfibrose und damit dem Verlust der Filtrationsbarriere führen. [61-62] Nicht zuletzt kommt es auch zu einer vermehrten Einwanderung von Zellen des Immunsystems, wie z. B. Makrophagen. Da diese wiederum zu einer Ausschüttung von Zytokinen führen, kommt es zum Voranschreiten der renalen Endorganschädigung. [63]

1.06 Gas6 und seine Rezeptoren

Gas6, das Produkt des *growth arrest-specific gene 6* (gas6), wurde das erste Mal aus wachstumsarretierten Fibroblasten isoliert. [64] Bei dem Protein handelt es sich um einen Wachstumsfaktor, der der Apoptose entgegen wirkt, wichtig ist bei der Zelldifferenzierung und eine Rolle spielt bei Migration und Adhäsion im Rahmen von Entzündungsprozessen. Gas6 hat eine große Ähnlichkeit mit dem Protein S, welches der Blutgerinnung entgegenwirkt, in dem es als Co-Faktor für Protein C die aktivierten Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa inaktiviert. Wie Protein S wird auch Gas6 Vitamin K-abhängig gebildet. [64] Gas6 liegt auf dem Chromosom 13q34 und besteht aus 678 Aminosäuren, die in fünf Domänen aufgeteilt sind. Am NH₂-terminalen Ende des Proteins befindet sich eine Domäne, die reich an γ -carboxyliertem Glutamat ist, und wird deshalb Gla-Domäne genannt. Die γ -Carboxylierung (siehe Abb. 5), bei der Vitamin K benötigt wird, ermöglicht eine Ca⁺-abhängige Bindung an negativ geladene Phospholipidmembranen. Dem entsprechend kann Gas6 durch Vitamin K-Antagonisten wie Warfarin gehemmt werden. [65]

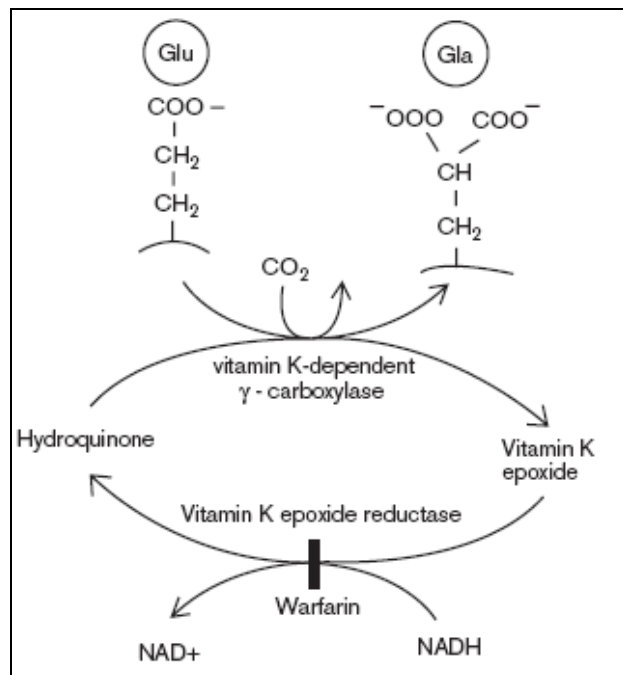


Abb. 5: γ -Carboxylierung. Schema zur Vitamin K abhängigen Aktivierung von Gas6 und die Inhibition durch Warfarin. [66]

Einleitung

Am COOH-terminalen Ende von Gas6 liegen zwei globuläre Domänen, die homolog mit Steroidhormonbindungsstellen sind (SHGB). [67] Zwischen diesen Domänen liegen eine schleifenförmige Domäne und eine Domäne, die vier *epidermal growth factor* (EGF)-ähnliche Wiederholungen hat. EGF-Domänen wurden in einigen Proteinen nachgewiesen, die an Aufgaben teilnehmen wie Koagulation, Fibrinolyse, Zellwachstum, Zelladhäsion und Differenzierung. Mit der SHGB- und der EGF-Domäne kann Gas6 an Rezeptortyrosinkinasen binden oder eine direkte Protein-Protein-Bindung herstellen. [68] Yanagita et al. haben zur Veranschaulichung die folgende schematische Darstellung gewählt. (Abb. 6)

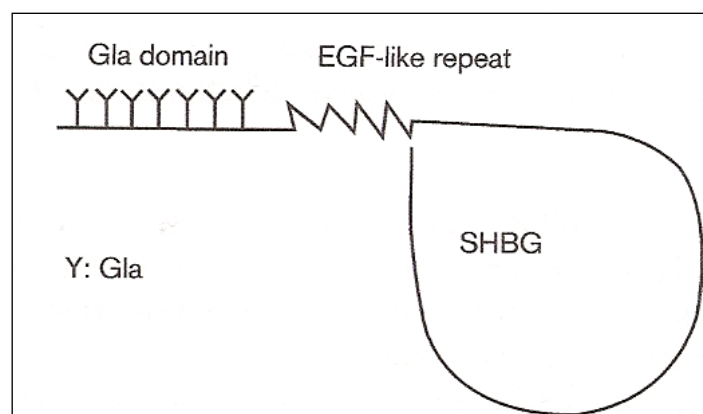


Abb. 6: Schematische Darstellung von Protein Gas6. Gas6 besteht aus einer Gla-Domäne, einer Schleife (nicht eingezeichnet), einer EGF-ähnlichen Domäne und einer SHG-Domäne. [69]

Gas6 ist ein Ligand für eine Gruppe von drei strukturell verwandten Tyrosinkinase-Rezeptoren (RTK) bestehend aus Axl (auch bekannt als Ark, Ufo und Tyro7), Sky (Rse, Brt, Tif, Dtk, Etk, Tyro3) und Mer (Eyk, Nyk, Tyro12). [70] Diese Rezeptoren besitzen eine charakteristische extrazelluläre Domäne. Sie besteht aus zwei Immunglobulin-ähnlichen und zwei Fibronectin Typ III Motiven. Aufgrund der

Ähnlichkeit dieser drei Rezeptoren, sind sie in der Lage, Heterodimere zu bilden. (Abb. 7)

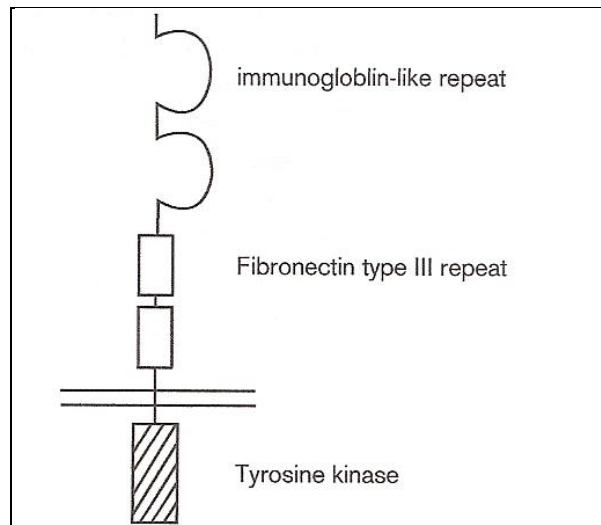


Abb. 7: Schematische Darstellung vom Tyrosinkinase-Rezeptor Axl. Die Extrazellulär-Domäne besteht aus zwei Immunoglobulin-ähnlichen und zwei Fibronectin Typ III-Domänen. [66]

Axl konnte erstmals 1991 in Patienten mit einer chronisch myeloischen Leukämie identifiziert und isoliert werden. Den Namen bekam das Protein als Ableitung von dem griechischen Wort „anexelecto“ für „der Unkontrollierte“, da man den Liganden für diesen Rezeptor noch nicht kannte. Axl wird ubiquitär in Geweben mit epithelialen, mesenchymalen und hämatopoetischen Ursprung exprimiert, obwohl es in Lymphozyten und Granulozyten nicht vorkommt. [71] 1994 wurde Sky, das zweite Mitglied dieser Tyrosinkinasefamilie entdeckt und isoliert. Sky kommt vor allem in embryonalen Zellen vor, insbesondere im Gehirn. So dass man davon ausgehen muss, dass es eine Rolle spielt bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems. [72-74] Außerdem wird Sky in den Nieren, im Hoden und den Ovarien exprimiert. [75] Bei Mer, dem dritten Verwandten dieser Rezeptortyrosinkinasen, handelt es sich um ein Protoonkogen. Es wird vorwiegend in peripheren Monozyten und im Knochenmark gebildet. Obwohl es nicht in gesunden B- und T-Lymphozyten vorkommt, kann es bei den neoplastischen Zellreihen dieser Zelle nachgewiesen werden. [76] In Tierversuchen, bei denen die Mäuse keinen der drei Rezeptoren exprimierten, konnte gezeigt werden, dass die Tiere schwerwiegende neurologische

Defizite und eine eingeschränkte Spermatogenese hatten. [77] Tyrosinkinaserzeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion im Rahmen von Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zelladhäsion und Überleben. [78-79] Die Signaltransduktionswege wurden schon vielfach beschrieben. Initiale Studien konnten zeigen, dass die Aktivierung von der antiapoptotischen Kinase AKT durch Gas6 notwendig ist für das Überleben der Zellen. [80] Andere Studien konnten nachweisen, dass weitere Signale, vor allem die Aktivierung der *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) durch den Ras/MAPK3 Signaltransduktionsweg mit den mitogenen Effekten von Gas6 einhergeht. [81-82] Ein anderes Substrat der Axl-RTKs ist Phospholipase C gamma (PLCγ). Seine Aktivierung führt zu zytoskeletalen Veränderungen. [83-84] Nicht zuletzt ist der Weg über die Januskinasen (JAK) zur Aktivierung der *signaltransduction and activators of transcription factors* (STATs) beschrieben. Dieser ist verantwortlich für die mitogenen Effekte von Gas6 in der Niere und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von inflammatorischen Prozessen. [66]

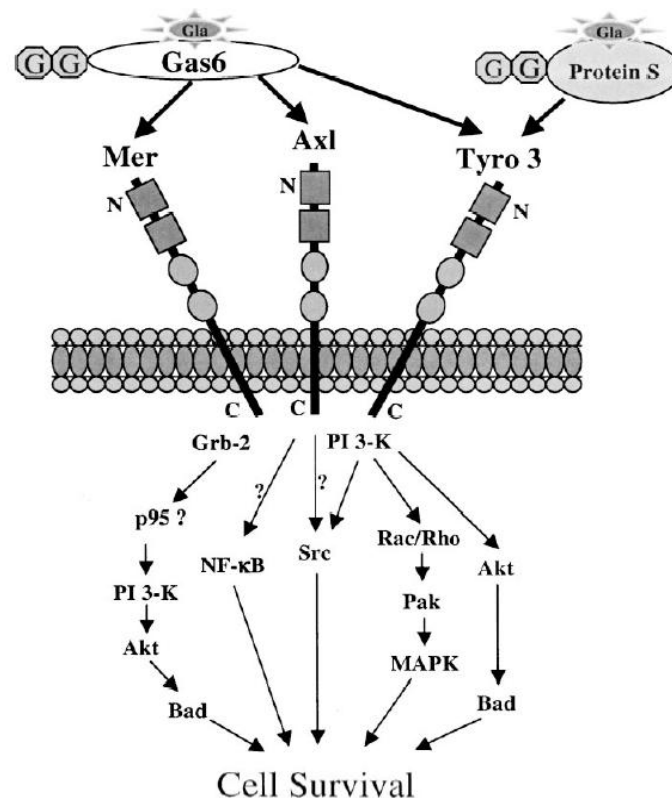


Abb. 8: Schema von möglichen Signaltransduktionswegen, die zum Überleben der Zelle führen. Nach der Bindung von Gas6 an eine, der drei Rezeptortyrosinkinase erfolgt eine komplexe Signaltransduktionskaskade. Diese führt zur Hemmung der Apoptose. [77]

1.07 Die Aufgaben von Gas6 im Organismus

Verschiedene Studien konnten eine Beteiligung von Gas6 und Axl an den Pathomechanismen der chronischen Hyperglykämie, arteriellen Hypertonie oder der Atherosklerose nachweisen. [85-88] In Versuchen mit Axl-defizienten Mäusen nach Gefäßverletzungen konnte man eine verminderte Anzahl von VSMCs, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen und dafür mehr apoptotische Zellen in der Media und Intima nachweisen. [89] Auch bei Gas6^{-/-} Mäusen war eine geringeres Einwandern von Makrophagen nachweisbar. Im Rahmen der Atherosklerose wurde eine Beteiligung von Gas6 gezeigt. [90] In diesem Zusammenhang ist es nicht verwunderlich, dass man eine Assoziation von genetischen Varianten von Gas6 zu der Entwicklung von Schlaganfällen und anderen Gefäßerkrankungen gefunden hat. [91-92] Tjwa et al konnten in ihren in vivo-Versuchen zeigen, dass Endothelzellen Gas6 freisetzen und dass Gas6 wiederum in der Lage ist, Endothelzellen zu aktivieren. Zudem kann Gas6 im Endothel Thrombozyten aktivieren und eine Leukozytenextravasation im Rahmen einer Entzündung bewirken. All diese Vorgänge werden über den Rezeptor Axl vermittelt. [93] In die Hämostase scheint Gas6 ebenso involviert zu sein. Angelillo-Scherrer et al induzierten in ihren Versuchen Thrombosen in Mäusen. Dabei wurden Gas6^{-/-} mit Gas6^{+/+} Mäusen verglichen. Die Gas6^{-/-} Tiere entwickelten kleinere Thromben, obwohl keine verstärkten Blutungen festgestellt werden konnten. [94] Nicht nur in Gefäßen vermittelt Gas6 Entzündungsvorgänge, sondern auch in anderen Geweben. Sogar bei systemischen Entzündungen, wie bei der Sepsis wurden erhöhte Plasmawerte von Gas6 gefunden. Dabei korrelierte die Konzentration von Gas6 mit dem Ausmaß der Organdysfunktion, vor allem der Leber und der Niere. [95-96] In seiner Rolle als Wachstumsfaktor induziert Gas6 auch Zelldifferenzierung und Zellproliferation in verschiedenen Geweben. Dies spielt nicht nur im Rahmen von inflammatorischen Vorgängen eine Rolle. Angelillo-Scherrer et al untersuchten Gas6 im Zusammenhang mit der Blutbildung und stellten dabei fest, dass Gas6 eine bedeutende Rolle bei der Bildung von Progenitorzellen und Erythroblasten spielt. Dabei kann Gas6 auch die Wirkung von dem Hormon Erythropoetin verstärken. [97] Auch an der Bildung von Fettgewebe ist Gas6 beteiligt. [98]

1.08 Gas6 und seine Beteiligung an renalen Erkrankungen

Ein Merkmal für die verschiedenen Glomerulopathien ist die exzessive Proliferation der Mesangialzellen. [99] Diese ist in der Regel mit einer vermehrten Bildung von Matrixproteinen assoziiert. Verantwortlich sind dafür unterschiedliche Wachstumsfaktoren. [100-101] Erstmals wurden mitogene Effekte von Gas6 bei kultivierten Mesangialzellen beobachtet. Dabei konnte man sowohl eine Gas6- als auch eine Axl-Expression nachweisen. Gas6 vermittelt die Proliferation dieser Zellen, welche durch Zugabe von Warfarin, einem Vitamin K-Antagonisten, gehemmt werden konnte. [65] Darüber hinaus wurde die Rolle von Gas6 in *in vivo*-Experimenten untersucht. In einem Model für eine akute Glomerulonephritis (GN) konnten bei erkrankten Tieren eine signifikant höhere Konzentration von Gas6 und Axl nachgewiesen werden. Durch die Gabe von Warfarin konnte man die mesangiale Zellproliferation, die Proteinurie und die extrazelluläre Matrixvermehrung hemmen. [102] In verschiedenen Untersuchungen zur Signaltransduktion konnte der Weg über die Aktivierung von STAT3 herausgearbeitet werden. [103] Auch zur Entwicklung und Progression von chronischen Nierenerkrankungen trägt Gas6 bei. Dies konnte in Tierversuchen an einem Model für eine progressive Form von GN gezeigt werden. Zeichen dafür sind eine glomeruläre Hyperzellularität, eine Infiltration von Entzündungszellen und eine Glomerulosklerose. Gas6-defiziente Mäuse zeigten weniger Veränderungen als die entsprechenden Wildtypiere. [104] Eine der Hauptursachen für eine terminale Nierenerkrankung in vielen Ländern ist die diabetischen Nephropathie. Charakteristisch für diese Erkrankung ist die Expansion der Mesangialzellen, eine glomeruläre Hypertrophie sowie die Hyperfiltration und Albuminurie. Es entwickelt sich im Verlauf eine Glomerulosklerose. Das Endstadium ist eine dialysepflichtige Niereninsuffizienz. An einem Streptozotocin (STZ) – induzierten Diabetes model an Ratten wurde der Zusammenhang zwischen Gas6 und einem frühen Stadium der Niereninsuffizienz untersucht. Die diabetischen Tiere zeigten eine erhöhte Expression von Axl und Gas6 in den Glomeruli im Vergleich zu den gesunden Tieren. Mäuse, die einen kompletten Knockout für Gas6 hatten, entwickelten signifikant weniger Nierenveränderungen nach der Behandlung mit STZ als die Wildtypiere. [105] Zelluläre Proliferation und Fibrose in Glomeruli, Tubuli und Arteriolen sind auch typische Zeichen einer Transplantatabstoßung. Und auch hier wurde eine Interaktion vermutet und gefunden. Sowohl im Tierversuch als

auch bei der Untersuchung von humanen Transplantatabstoßungen wurde eine erhöhte Expression von, dem Rezeptor von Gas6, nachgewiesen. [106-107] Abbildungen 9 und 10 zeigen die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe aus einer Biopsiestudie an humanen entzündlichen Nierenerkrankungen unterschiedlicher Genese, wie der akuten Transplantatabstoßung, der IgA-Nephropathie oder der Lupus-Nephritis, wobei in allen krankheitsbetroffenen Geweben eine vermehrte Expression von Gas6/Axl in den Gefäßen und den Glomeruli nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass das Gas6-Axl-System eine fundamentale Rolle bei verschiedenen akuten und chronischen Nierenerkrankungen spielt. [108]

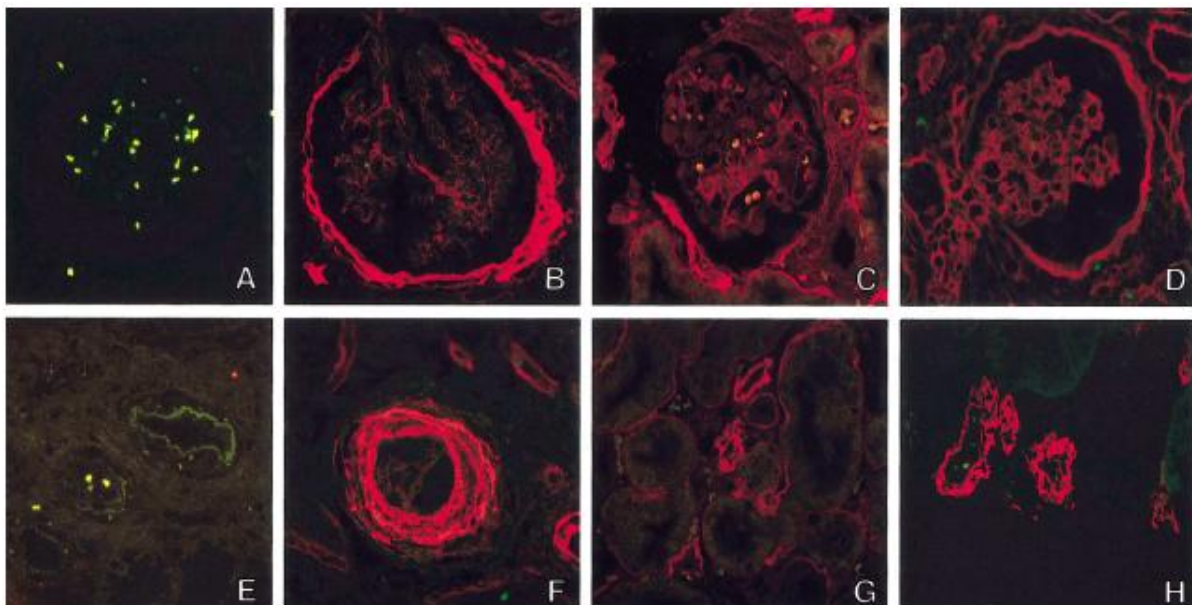


Abb. 9: Gas6 -Expression in gesundem und kranken Nierengewebe. A, B, E, F aus Nephrektomie, C, D, G, H aus Nierenbiopsien. A-D Glomeruli, E-H Gefäße. A, E gesunde Niere. B, F Transplantatabstoßung. C, G IgA-Nephropathie. D, H Lupusnephritis.[108]

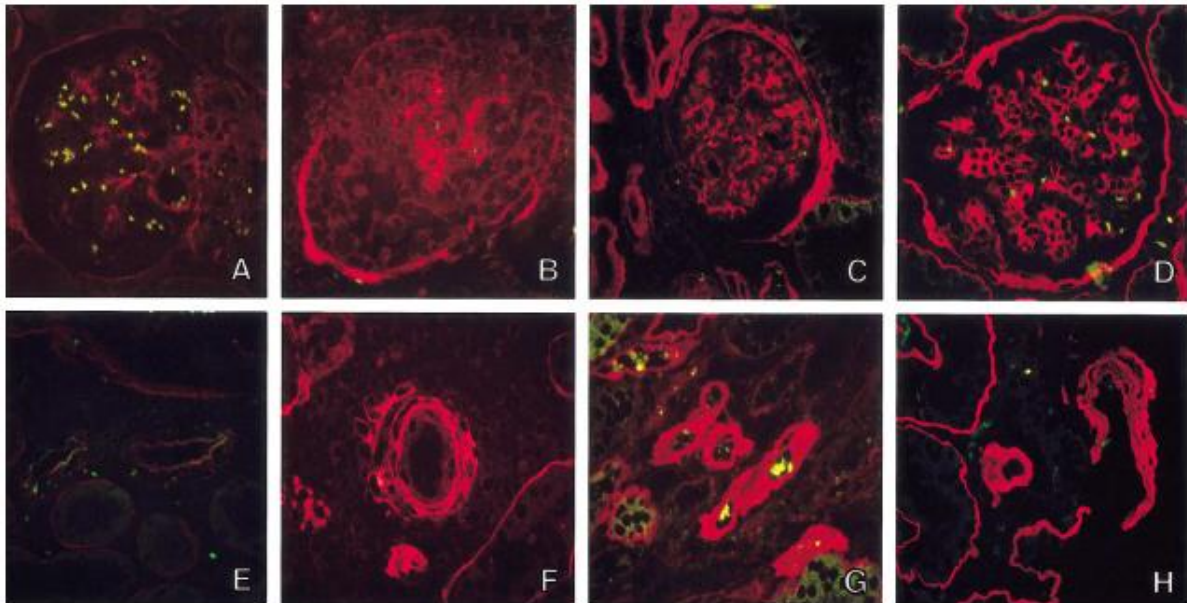


Abb. 10: Axl -Expression in gesundem und kranken Nierengewebe. A, B, E, F aus Nephrektomie, C, D, G, H aus Nierenbiopsien. A-D Glomeruli, E-H Gefäße. A, E gesunde Niere. B, F Transplantatabstoßung. C, G IgA-Nephropathie. D, H Lupusnephritis.[108]

1.09 Gas6 im Herzgewebe

Obwohl bereits bekannt ist, dass Gas6 profibrotische und entzündliche Eigenschaften besitzt, wurde bisher die Wirkung von Gas6 auf das Herzmuskelgewebe nur sehr oberflächlich untersucht. Die Arbeitsgruppe von Stenhoff, Dahlbäck und Hafizi haben die Wirkung von Gas6 auf kardiale Fibroblasten in der Zellkultur untersucht. Dabei züchteten sie Herzfibroblasten von Gas6^{-/-} Mäusen kultivierten sie. Nach einigen Tagen zeigte sich ein rapider Zelluntergang. Nach Zugabe von Gas6 konnte der Zelluntergang verhindert werden und das Wachstum der Fibroblasten angeregt werden. So konnte gezeigt werden, dass Gas6 eine antiapoptotische Wirkung auf kardiale Fibroblasten hat. Außerdem konnte die Gruppe zeigen, dass die Wirkung über die Bindung und Aktivierung von Axl stattfindet. [109]

1.10 Gas6 und das RAAS

Gas6 und sein Rezeptor Axl spielen eine wichtige Rolle in inflammatorischen und proliferativen Prozessen, insbesondere der Niere. Dabei konnte die Verabreichung eines Vitamin K-Antagonisten die Effekte von Gas6 hemmen. Eine der häufigsten Ursachen für ein Remodeling am Herzen, an den Gefäße und den Nieren ist das aktivierte RAAS. In einigen Studien wurde bereits der Zusammenhang zwischen RAAS, Gas6 und sein Rezeptor Axl untersucht. In Zellkulturversuchen mit VSMCs von Aorten aus Ratten und Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der Zellen mit Ang II zu einer erhöhten Gas6-Expression geführt hat. Ebenfalls wurde nach Stimulation mit Ang II eine vermehrte Expression von Axl festgestellt. Bei diesen Versuchen konnte die Beteiligung von freien Sauerstoffradikalen gezeigt werden. [108] In in vivo Versuchen an einem hypertensiven Tierversuchsmodell wurde Ratten Desoxycorticosteron (DOCA) verabreicht. DOCA ist eine Vorstufe bei der Bildung von Aldosteron und wird in der Zona glomerulosa gebildet. Es ist wie Aldosteron verantwortlich für die Entstehung einer Hypertonie und ein kardiovaskuläres Remodeling. Bei diesen Tierversuchen konnte u. a. gezeigt werden, dass Axl ein wichtiger Mediator bei DOCA-induzierten Gefäßveränderungen ist. Des Weiteren vermittelt Axl antiapoptotische Vorgänge an hypertensiven Gefäßen. [88] Um einen direkten Zusammenhang zwischen Aldosteron und der Gas6-Expression zu untersuchen, wurden die Nieren von doppeltransgenen Ratten (dTGR) untersucht. Diese Tiere entwickeln neben ausgeprägten kardiovaskulären Schäden auch erhöhte Aldosteronwerte im Plasma. In dieser Studie zeigten die Versuchstiere eine vermehrte Gas6-Expression. [110] In Zellkulturversuchen wurden kultivierte VSMCs mit Aldosteron stimuliert. Verglichen mit den nicht stimulierten Zellen, exprimierten die Aldosteron-stimulierten Zellen vermehrt Gas6. Diese Expression konnte mit Spironolacton gehemmt werden. [110]

1.11 Ziel der Versuche

In vielen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Aldosteron nicht nur hypertensive Eigenschaften hat, sondern auch ausgeprägte mitogene Effekte. Dabei kann Aldosteron zum einen die Wirkung von Ang II verstärken und zum anderen unabhängig von Ang II profibrotische Prozesse vermitteln. Der Wachstumsfaktor Gas6 konnte in Zusammenhang mit einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen gebracht werden. Insbesondere in den Nieren war Gas6 an pathologischen strukturellen Veränderungen beteiligt. In diesem Zusammenhang wirkt Gas6, neben den Rezeptoren Sky und Mer, überwiegend über den Rezeptor Axl. Ähnlich wie der MR beschreitet Axl sehr unterschiedliche Signaltransduktionswege.

Frühere Versuche der eigenen Arbeitsgruppe in der Zellkultur an glatten Gefäßmuskelzellen konnten zeigen, dass eine Stimulation der Zellen mit Aldosteron zu einer Expression von Gas6 und von Axl führte. Zusammen mit den Erkenntnissen der anderen Arbeitsgruppen, dass Gas6 und Axl beteiligt sind an einer Reihe von Organschädigungen durch Entzündungs- und Proliferationsprozesse stellten wir uns die Frage, ob Gas6 beteiligt ist an der Entwicklung eines Aldosteron induzierten Endorganschadens in den Nieren und im Herzen, da Aldosteron ebenfalls zu einer Induktion von Inflammation und Proliferation führt. In Versuchen an doppeltransgenen Ratten könnte ein Zusammenhang von erhöhten Aldosteronwerten im Plasma und einer erhöhten Gas6-Expression gesehen werden. Durch Versuche an Gas6-Knockout-Mäusen wollten wir nun sehen, ob die Abwesenheit von Gas6 zu einer geringeren Ausprägung von Endorganschäden durch erhöhte Aldosteronzufuhr führt. Dabei stellten wir uns folgenden Fragen:

1.12 Fragestellungen

1. Spielt Gas6 eine Rolle bei der Entwicklung einer Nierenfunktionseinschränkung unter Aldosteronbelastung?
2. Spielt Gas6 eine Rolle beim renalen Remodeling unter Aldosteronbelastung?
3. Spielt Gas6 eine Rolle bei der Entstehung von kardialen Veränderungen im Rahmen einer Aldosteronbelastung?
4. Hängen die erwarteten Veränderungen vom systemischen Blutdruck ab?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Übersicht der verwendeten Chemikalien und Wirkstoffe

<i>Substanz</i>	<i>Firma</i>
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
C-1000 ssniff (Standardfutter)	Ssniff, Soest
Chloroform	Sigma, Deisenhofen
Deoxycorticosteron Acetat 50 mg Ethanol 70%	Innovative research of America
Fast Start Taq DNA Polymerase	Roche
Formaldehyd 4%	
GeneAmp [®] Uracil N-glycosylase	Applied Biosystems, USA
Proteinase K	Roth
RNeasy [®] Mini Kit	QUIAGEN
Roti [®] -Mix PCR 3 dNTP	Roth
VIAGEN DirectPCR Tail	peqlab
ELISA-Kit	CellTrend, Berlin
Blocksubstanz	
Isofluran	CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe

2.1.2 Übersicht der verwendeten Primer

gas6 (Genotypisierung)

Vorwärts-Primer: 5' GAG TGC CGT GAT TCT GGT C 3'

Rückwärts-Primer: 5' CCA CTA AGG AAA CAA TAA CTG 3'

Mutation: 5' ATC TCT CGT GGG ATC ATT 3'

2.1.3 Übersicht der verwendeten Antikörper (Immunhistochemie)

Primäre Antikörper

Collagen Typ IV

Goat Anti-Type IV Collagen Antibody – Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH

Fibronektin

Rabbit Anti-Rat Fibronektin Polyclonal Antibody – PAESEL+LOREI GmbH&co

TNF α

Goat Anti-Mouse TNF α Polyclonal Antibody – Santa Cruz Biotechnology, Inc.

IL-6

Goat Anti-rat IL-6 Antibody – R&D Systems

Sekundäre Antikörper

Cy3-konjugierter-donkey-anti-mouse IgG

Kat. Nr. 715-165-151, Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, USA

Cy3-konjugierter-donkey-anti-goat-IgG

Kat. Nr. 705-165-147, Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, USA

Cy3-konjugierter-donkey-anti-rabbit-IgG

Kat. Nr. 711-165-152, Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, USA

Cy3-konjugierter-donkey-anti-rat-IgG

Kat. Nr. 712-166-150, Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, USA

2.2 Tierversuch

2.2.1 Tiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten acht Wochen alte männliche Mäuse aus dem FVB/N Inzucht-Stamm. Dabei handelte es sich um growth-arrest specific 6- Knockout Mäuse. Die Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in Käfigen bei $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ Raumtemperatur, 60% Luftfeuchtigkeit und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden bei künstlichem Licht gehalten. Als Nahrung erhielten sie eine Standarddiät für Mäuse (C-1000 Ssniff), die 0,2% Natrium enthielt sowie Leitungswasser ad libitum.

Alle Richtlinien für Tierhaltung der American Physiological Society wurden befolgt und eine Versuchsgenehmigung der örtlichen Behörden lag vor (Genehmigung # G 0153/03).

2.2.2 Tierzucht

Zum Aufbau einer *gas6*^{-/-} Mauszucht wurden homozygote *gas6*^{-/-} Männchen aus einer etablierten Zucht der Arbeitsgruppe Carmeliet et al. mit weiblichen FVB/N – Mäusen verpaart. Die heterozygoten Nachkommen wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten und untereinander verpaart. Es wurde versucht eine homozygote Knockout-Maus-Linie und eine Wildtyp-Linie zu züchten. Die Nachkommen wurden im Alter von zwei Wochen von den Eltern getrennt und nach dem Geschlecht getrennt gehalten. Zur Identifikation der Tiere wurden diese durch Ohrlochung gekennzeichnet. Alle Tiere wurden aufgelistet und deren Verbleib dokumentiert. Bei allen Nachkommen wurde die Schwanzspitze entfernt, um daraus den Genotyp zu bestimmen. Ziel war es homozygote Männchen mit homozygoten Weibchen zu verpaaren. Aufgrund erhöhter Aggressivität der homozygoten Knockout-Mäuse, konnte dies nicht umgesetzt werden. Deshalb wurden für die Versuche ausschließlich Nachkommen aus heterozygoten Paaren verwendet. Dies setzte eine kontinuierliche Genotypisierung voraus.

2.2.3 Behandlungsprotokolle

Für die Versuche wurden drei Behandlungsprotokolle verwendet. Während des Versuches wurden die Mäuse einzeln in Käfigen gehalten.

Protokoll 1

Bei zehn Wochen alten männlichen Mäusen wurde eine Niere entfernt (Uninephrectomie). Nach einer Erholung von zwei Wochen wurde den Tieren Deoxycorticosteronacetat (DOCA) als s.c. Pellet (50 mg pro Pellet reicht für 21 Tage) für 42 Tage verabreicht. Am 42. Tag nach erstmaliger Medikamentengabe wurden die Tiere geopfert und die Organe entnommen. [111] Die Mäuse wurden zwei Tage vor der Uninephrectomie, zwei Tage vor der ersten DOCA- Gabe, zwei Tage vor der zweiten DOCA- Gabe und zwei Tage vor der Organentnahme in metabolischen Käfigen gehalten. Untersucht wurden *gas6*^{-/-} und *gas6*^{-/+} sowie Wildtyp-Mäuse.

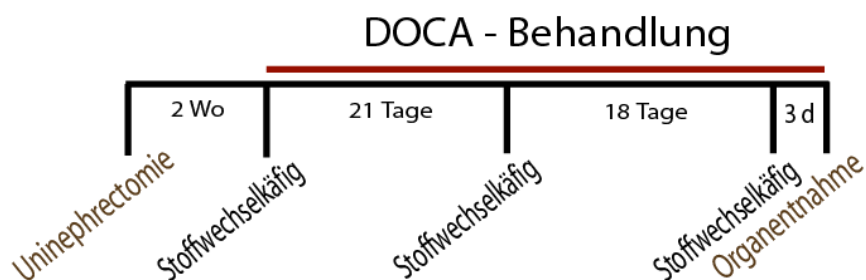


Abb. 11: Im Protokoll 1 wurden die Mäuse uninephrectomiert und, nach einer Erholungspause von zwei Wochen, über 42 Tage mit DOCA behandelt. Vor der Behandlung, nach 21 Tagen und vor der Organentnahme wurden die Tiere in einen metabolischen Käfig gehalten, um 24-Stunden-Urin zu sammeln.

Protokoll 2

Dieses Protokoll ist identisch mit dem Protokoll 1, jedoch wurde zusätzlich eine Echokardiographie, vor der Organentnahme, durchgeführt.

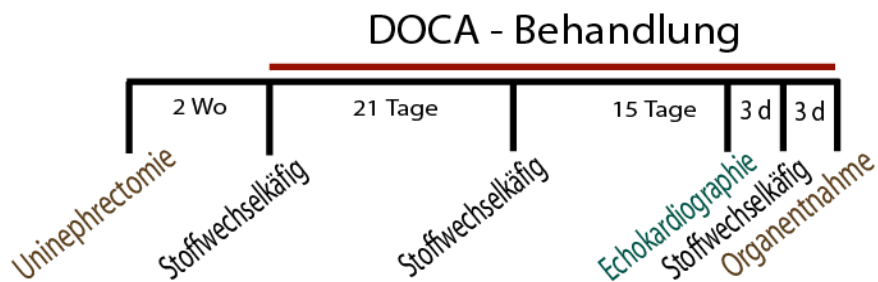


Abb. 12: Im Protokoll 2 wurden die Mäuse uninephrectomiert und, nach einer Erholungspause von zwei Wochen, über 42 Tage mit DOCA behandelt. Vor der Behandlung, nach 21 Tagen und vor der Organentnahme wurden die Tiere in einen metabolischen Käfig gehalten, um 24-Stunden-Urin zu sammeln. Zusätzlich wurde vor der Organentnahme eine Echokardiographie durchgeführt.

Während der Versuche wurde in allen Protokollen Körpergewicht und renale Proteinausscheidung gemessen. Nach Versuchsende wurden Blutproben entnommen und es erfolgte eine histologische und molekularbiologische Aufarbeitung der Herzen und Nieren aller Versuchstiere.

Protokoll 3

In einem separaten Protokoll, welches identisch mit dem Protokoll 2 war, wurden bei sechs Versuchstieren (drei $gas6^{-/-}$ und drei $gas6^{+/+}$) der arterielle Blutdruck mit Hilfe eines Telemetriesenders gemessen. Implantation der Sender und Start der Aufzeichnung war drei Tage nach der Uninephrectomie. Die Aufzeichnung lief bis zur Opferung der Mäuse.

2.2.4 Uninephrectomie

Um die rechte Niere zu entfernen, wurden die Mäuse durch Insufflation eines Isofluran(2%)- Luft- Gemischs narkotisiert. An der rechten Flanke erfolgte eine dorsolumbale Hautinzision mit Eröffnung des Retroperitonealraums. Mit einer Pinzette wurde die rechte Niere mobilisiert. Die Ligation der Nierengefäße erfolgte mit einem chirurgischen Faden (Ethicon, Perma-Hand Seide, 3-0). Oberhalb des Knotens wurde die Niere abgesetzt. Danach wurden die Unterhaut und die Haut (Ethicon) getrennt genäht. Die entnommene Niere wurde entkapselt und in der Mitte geschnitten. Ein Teil wurde in 4% Formaldehyd aufbewahrt. Die andere Hälfte wurde in Isopentan (-40°C) schockgefroren.

2.2.5 Verabreichung der DOCA-Pellets

Zur Implantation der DOCA-Pellets wurde ein Schnitt im Nacken der Mäuse gesetzt und mit einer stumpfen Pinzette eine Hauttasche geformt. Dort wurde ein Pellet eingesetzt. Da die Pellets nur 21 Tage wirken, wurde ein zweites Pellet am 22. Tag nach Implantation des Ersten auf die gleiche Art und Weise eingesetzt. Die Haut wurde mit Einzelknopfnähten verschlossen.

2.2.6 Transthorakale Echokardiographie

Zur Durchführung der Ultraschalluntersuchung erhielten die Mäuse zunächst eine Insufflationsnarkose mit 2% Isofluran, die während der gesamten Untersuchung aufrechterhalten wurde. Um optimale Untersuchungsbedingungen zu schaffen, wurde der Brustkorb vom Haarkleid befreit und die zu untersuchende Maus in Rückenlage fixiert. Nach dem Auftragen des Ultraschallgels wurde mit einem gebräuchlichen Ultraschallgerät und einem 15 MHz Phased-Array-Schallkopf das Herz in der kurzen parasternalen Achse dargestellt. Mittels des M-Mode-Verfahrens wurde die Herzaktion aufgezeichnet und die Durchmesser des linken Ventrikels, der linksventrikulären Hinterwand und des Ventrikelseptums während Systole und Diastole gemessen, sowie die linksventrikuläre Ejektionsfraktion bestimmt. Die totale Herzwanddicke wurde aus der Summe der Durchmesser von Septum und

linksventrikulärer Hinterwand berechnet. Es wurden jeweils 3 Messungen pro Herz durchgeführt, die dann gemittelt und statistisch ausgewertet wurden.

2.2.7 Telemetrische Messung des systemischen Blutdruckes

Vor der Implantation des Telemetrie-Senders, wurde dieser in 0,9% NaCl geeicht. Die Einpflanzung des Telemetrischen Katheters und des Transmitters erfolgte unter einer 2,4%igen Isofluran-Anästhesie. Der Katheter wurde über die rechte A. femoralis in die Aorta abdominalis vorgeschoben. Für die Platzierung des Transmitters wurde die Haut an der rechten Flanke inzidiert und eine Tasche gebildet. Nach Einsetzen des Transmitters wurde die Haut mit Einzelknopfnähten verschlossen. Während der Operation lagen die Mäuse auf einer Wärmeplatte, um einen Verlust der Körpertemperatur zu verhindern. Die Mäuse wurden bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 gehalten. Nach einer postoperativen Erholungsphase von sieben Tagen wurde für drei Tage der Baseline-Blutdruck aufgenommen. Nach dieser Zeit haben sich die Tiere an den zirkadianen Rhythmus gewöhnt und sowohl der Blutdruck als auch die Herzfrequenz erreichen stabile Werte. Um Störungen bei der Messung zu verhindern, wurden die Tiere in einem separaten Raum aufbewahrt. Alle fünf Minuten wurde für zehn Sekunden Daten von den Sendern mit Hilfe von Funksignalen an einem Empfänger, der unter den Käfigen steht, übermittelt. Dies geschah kontinuierlich Tag und Nacht mit einer Sammelrate von 1000 Hz. Systolischer, Diastolischer und mittlere arterieller Blutdruck sowie die Herzfrequenz wurden unter Verwendung der Software DATAQUEST (ART 2.1) gemessen.

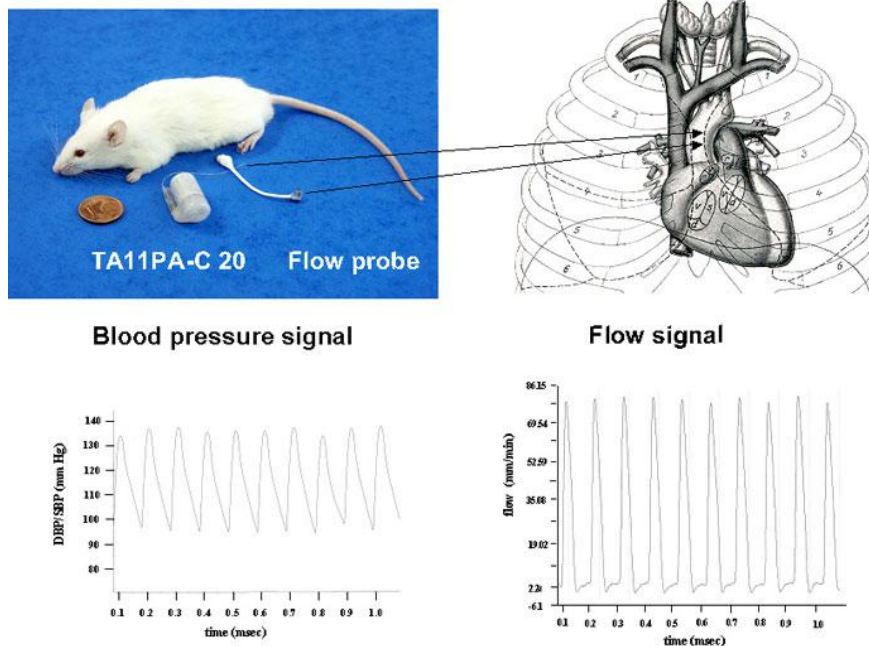


Abb. 13: Telemetrie. l.o.: Dargestellt sind der Katheter und der Transmitter im Größenverhältnis zur Maus. r.o.: Schema der Thorakalen Organe in Bezug auf die Platzierung des Katheters. l.u.: Blutdruck-Kurve bei der Aufnahme. r.u. Fluss-Geschwindigkeits-Diagramm

2.2.8 Opferung und Organentnahme

Die Mäuse wurden unter Äthernarkose durch Dekapitation getötet. Danach wurden Blut, Lebergewebe, die Niere und das Herz entnommen. Das Blut wurde zu Serum weiter verarbeitet. Die Niere wurde entkapselt und sagittal geschnitten, wobei die eine Hälfte in -40°C kalten Isopentan schockgefroren und bei -80°C gelagert wurde. Der andere Teil der Niere wurde in 4% Formaldehyd aufbewahrt. Nach der Entnahme des schlagenden Herzens, wurde es in 0,9% NaCl- Lösung bei Raumtemperatur auspumpen gelassen. Danach wurden Gefäße und Herzohren entfernt. Zur Molekularbiologischen Aufarbeitung wurde die Herzspitze entnommen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Der Rest wurde zur histologischen Aufbereitung in -40°C kalten Isopentan gefroren und ebenfalls bei -80°C gelagert. Alle Tiere und die entnommenen Organe wurden gewogen.

2.3 Genotypisierung der Mäuse

2.3.1 DNA- Extraktion

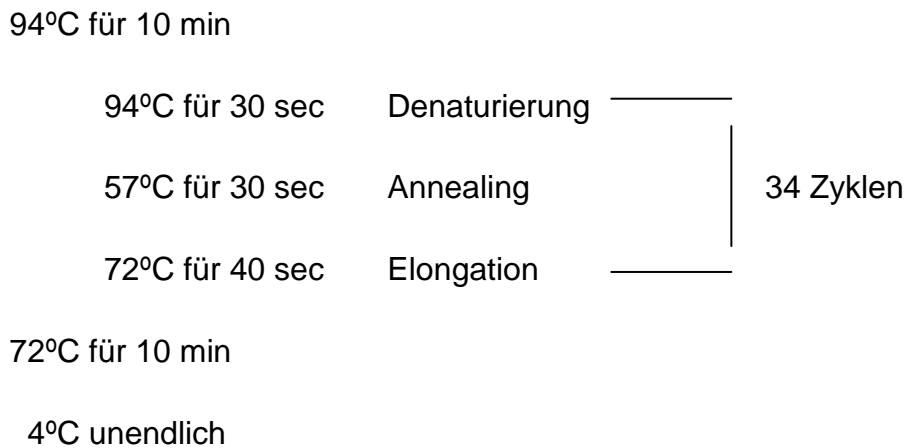
Um die DNA aus den entnommenen Schwanzspitzen freizusetzen, wurden sie mit einem Lysespuffer (peqlab, Viagen DirectPCR-Tail) für Mäuseschwänze und Proteinase K (Roth, 10mg/ml, lyophilisiert) bei 55°C für 12-16 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme bei 85°C für 45 Minuten inaktiviert.

2.3.2 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, um eine bestimmte Nukleotid-Sequenz einer doppelsträngigen DNA zu vervielfältigen. Dabei handelt es sich um einen Zyklus, bestehend aus drei Schritten, der sich viele Male wiederholt. Dadurch steigt die Anzahl des bestimmten DNA-Abschnittes exponentiell an. Im ersten Schritt handelt es sich um die Denaturierung. Dabei wird die DNA auf 94°C erhitzt, wodurch sich die beiden DNA-Stränge aufspalten. Im zweiten Schritt kommt es zum Annealing. Die Temperatur wird von 94°C auf 57°C gesenkt, damit die Primer an die DNA hybridisieren können. Primer sind einzelsträngige Oligonukleotide mit einer Länge von 18-30 Basen. Sie werden im Überschuss zur Probe-DNA gegeben. Sie haben eine bestimmte Sequenz, die möglichst spezifisch für ein bestimmtes Gen ist. Für die PCR benötigt man zwei verschiedene Primer, da die Probe-DNA doppelsträngig ist und die DNA-Polymerase nur in eine Richtung lesen und synthetisieren kann. Deshalb gibt es einen Vorwärtsprimer für den einen Strang und einen Rückwärtsprimer für den anderen Strang. Die beiden Primer dürfen nicht miteinander hybridisieren und sollten daher möglichst wenig Komplementärabschnitte an ihren 3'-Enden besitzen. Im dritten Schritt, der Elongation, wird die Temperatur auf das Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase erhöht. Diese bindet an die Primer und verlängert diese jeweils vom 5'-Ende zum 3'-Ende. Dadurch entstehen zwei neue komplementäre Einzelstränge, die sich zum Doppelstrang verbinden. Am Ende des Zyklus liegt die DNA verdoppelt vor. Bei der Polymerase handelt es sich um eine hitzestabile Polymerase (Taq-Polymerase), die durch die hohe Temperatur im Denaturierungsschritt nicht zerstört wird und deshalb nicht nach jedem Zyklus neu

hinzugefügt werden muss. Für die Genotypisierung wurde ein Mastermix hergestellt. Dafür wurden pro Ansatz 2 µl PCR-Reaktionspuffer (10x Puffer mit 20 mM MgCl₂); 0,4 µl dNTP (10mM pro dATP, dGTP, dCTP, dTTP); je 0,2 µl pro Primer (Primer 1, Primer 2, Primer 3); 0,1 µl FastStart Polymerase (Roche) und 15,9 µl Wasser benötigt. Diese Lösung und jeweils 1 µl DNA-Probe wurde in Reaktionsgefäße pipettiert und in einen Thermozykler (PCR-Block) gestellt. Dieser kann bei einer bestimmten Voreinstellung die verschiedenen Temperaturstufen für bestimmte Zeiträume gewährleisten.

Bei der Genotypisierung wurde folgendes Programm verwendet:



2.3.3 Gel- Elektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, um DNA oder RNA nach ihrer Größe zu trennen. Die Nukleinsäuren werden dann mit der Größe von bekannten Strängen verglichen. Agarosepolymere bilden lange Fäden, die sich vernetzen und wie ein Sieb funktionieren. An das Gel wird ein elektrisches Feld gelegt, das die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch die Agarose vom negativen zum positiven Pol zieht. Dabei bewegen sich kleine Stränge schnell und große Stränge langsam durch das Gel. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren. Zur Elektrophorese wurde ein 1,5% Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 0,9 g Standardagarosepulver in 60 ml TAE-Puffer gelöst und bei 95°C so lange erhitzt, bis ein flüssiges und durchsichtiges Gel entsteht. Dieses wurde in eine Form

gegossen und bei Raumtemperatur gewartet bis das Gel erhärtete. Vorher wurde ein Kamm eingeführt, der für die Bildung von kleinen Taschen im Gel sorgt. Dieser wurde vom erhärteten Gel entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt, wobei sich die Taschen am negativen Pol befanden. Die Kammer wurde mit TAE-Puffer aufgefüllt, da Strom im flüssigen Medium besser fließt. Da sowohl die DNA-Proben als auch der Elektrophoresepuffer auf Wasser basieren besitzen sie eine ähnliche Dichte. Deshalb wurde ein Probenpuffer zu den Proben gegeben. Durch das enthaltene Glycerin wurden die Proben schwerer und sanken in die Taschen. Der Puffer war außerdem mit Bromphenolblau versetzt. Dadurch lässt sich beobachten, wie weit die Proben bereits durch das Gel gelaufen sind. Um die Qualität der Auftrennung der Proben zu prüfen und um Vergleichsgrößen zu haben, wurde ein DNA-Leiter mit auf das Gel aufgetragen. Dieser trennt sich in einem Abstand von ca. 100 Basenpaaren auf. An die Elektrophoresekammer wurde nun elektrischer Strom gelegt. Die Proben liefen bei einer Spannung von 70 Volt und einer Stromstärke von 180 mAmpere. Nach genügend weitem Lauf der Proben, wurde der Stromkreis unterbrochen und das Gel unter einem Abzug mit einer Ethidiumbromid-Lösung. Ethidiumbromid kann mit DNA-Strängen interkalieren und ist unter UV-Licht sichtbar.[112-113] Dementsprechend wurde das Gel unter einer UV-Lampe gesichtet.

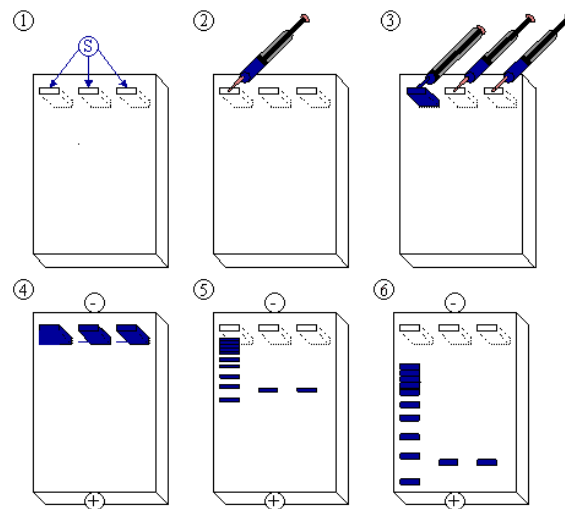
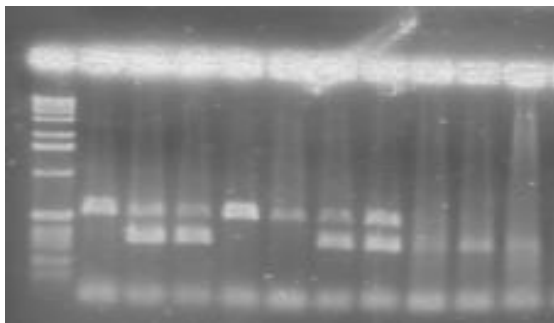


Abb. 14: Schema einer Agarosegel-Elektrophorese. 1:Geltaschen. 2 und 3:Auftragen der Proben in die Taschen. 4:Das Gel vor dem Anlegen eines elektrischen Feldes. 5:Das Gel bei ungenügender Auftrennung der Proben. 6:Das fertige Gel.



WT HE HE WT WT HE HE HO HO HO

Abb. 15: Agarosegel zur Genotypisierung der Mäuse. Wie oben beschrieben, wurde die DNA aus der Schwanzspitze isoliert, amplifiziert und auf einem Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. **WT:** Wildtyp-Maus **HE:** Die Maus ist heterozygot für den *gas6*-Knockout, d.h. nur auf einem Chromosom ist das Gen für *gas6* inaktiviert. **HO:** Die Maus ist homozygot für den *gas6*-Knockout, d.h. auf beiden Chromosomen ist das Gen für *gas6* inaktiviert.

2.4 Biochemische Messungen

2.4.1 Messung der renalen Albuminausscheidung

Die renale Albuminausscheidung wurde bei den Mäusen vor der Uninephrectomie, vor und zwischen der Behandlung und am Ende des Versuches gemessen. Hierfür wurden sie in metabolische Käfige gesetzt und der Urin über 24 h gesammelt. Die Messungen wurden von der Firma Celltrend in Luckenwalde vorgenommen. Albuminbestimmung erfolgte mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Dabei handelt es sich um einen direkten, kompetitiven ELISA. An die Kavitäten der Mikrotiterplatte ist bereits Maus-Albumin gebunden. Im ersten Schritt werden die Proben und die entsprechenden Standards mit einem Peroxidase-markierten anti-Albumin-Antikörper auf die Platte aufgetragen und inkubiert. Das in der Probe befindliche Albumin hemmt kompetitiv die Bindung des Antikörpers an das Platten-gebundene Albumin, indem es an dem Albumin in der Probe bindet. Nach einem Waschschriff wird die Mikrotiterplatte mit Tetramethyl-benzidin inkubiert, das als Substrat für die enzymatische Reaktion der Peroxidase dient; danach wird die Reaktion mit verdünnter Schwefelsäure gestoppt und optische Dichte im Photometer gemessen. Die Farbintensität ist umgekehrt proportional der Albuminkonzentration in der Probe.

2.4.2 Messungen von Kreatinin im Urin

Die Kreatininbestimmung wurde mit der Jaffé-Methode durchgeführt. Diese Methode beruht auf einem kinetischen Farbttest. Bei diesem Prinzip wird der Urinprobe Pikrinsäure beigegeben. Diese verbindet sich in einer alkalischen Lösung mit Kreatinin zu einem gelb-orange gefärbten Komplex:

Kreatinin + Pikrinsäure + alkalische Lösung → Kreatinin-Pikrinsäure-Komplex

Die Farbintensität dieses Komplexes ist direkt proportional zu der Konzentration des zu messenden Kreatinins in der Probe und kann photometrisch gemessen werden. Die Extinktion eines Leerwertes dient als Referenz für nachfolgende Extinktionsmessungen der Proben. [111]

2.4.3 Der Albumin-Kreatinin-Quotient

Eine Möglichkeit die Mikroalbuminurie zu bestimmen, ist die Berechnung des Albumin-Creatinine-Ratio (ACR). Dabei stellt man das Verhältnis von Albumin zu Kreatinin im Urin dar. Die Berechnung des Quotienten ist deshalb eine schnelle und einfache Methode in der Diagnostik von glomerulären Nierenschäden, die bereits als Standarduntersuchung in der Klinik Anwendung findet. [114]

2.5 Vorbereitende histologische Techniken

2.5.1 Gewebefixierung

Um eine Veränderung der Gewebe nach der Organentnahme durch autolytische Prozesse zu verhindern, wurden die Organe fixiert. Nach der Opferung der Tiere wurden folgende Organe entnommen:

- Herz
- Leber
- linke Niere
- Hoden

Vom Herzen wurden die Gefäße, Bindegeweben und die Herzohren entfernt. Das Herz wurde gewogen. Anschließend wurde die Herzspitze abgeschnitten und zur molekularbiologischen Aufarbeitung in Stickstoff tief gefroren. Die restliche Herzbasis wurde zur Formgebung auf ein Plättchen getan. Dann wurde das Herz in -40°C kaltem Isopentan gefroren und später im Stickstoff bis zur Lagerung aufbewahrt. Die linke Niere wurde halbiert, wobei eine Hälfte der histologischen Aufarbeitung diente und in 4%igen Formalin überführt wurde. Die andere Hälfte wurde zur molekularbiologischen Untersuchung schockgefroren. Die Präparate für die Paraffineinbettung wurden später in einer Fixierlösung bei 4°C inkubiert.

2.5.2 Paraffineinbettung und Schneiden

Die fixierten Gewebe wurden über Nacht entwässert und mit Paraffin eingebettet. Dazu wurde ein Einbettautomat verwendet, der nach folgendem Programm arbeitete:

- Ethanol 70%	12 h
- Ethanol 70%	40 min
- Ethanol 80%	40 min
- Ethanol 90%	40 min
- Ethanol absolut	40 min
- Ethanol absolut	40 min
- Ethanol 50%/Xylol 50%	30 min
- Ethanol 50%/Xylol 50%	30 min
- Xylol	30 min
- Xylol	30 min
- Paraffin	25 min
- Paraffin	25 min
- Paraffin	25 min

Das Gewebe wurde in Gussformen eingelegt und diese mit flüssigem Paraffin ausgegossen. Nach dem Auskühlen auf einer Kälteplatte (4°C) konnten die Formen entfernt werden. Um eine gute Haftbarkeit der Schnitte zu gewährleisten, wurden die Objektträger zuvor mit Silan (Sigma, Deisenhofen) beschichtet. Folgendes Protokoll wurde verwendet:

1. 5 min in Aceton tauchen
2. 5 min in 2% Silan/Aceton tauchen
3. 2x kurz in Aceton tauchen
4. 2x kurz in Aqua dest. Tauchen

Im Anschluss wurden die Objektträger bei 37°C getrocknet. Die Gewebeschnitte wurden an einem Schlittenmikrotom bei Raumtemperatur angefertigt. Die 3 µm dicken Präparate wurden zur Entfaltung in ein Wasserbad überführt und schwimmend auf den mit Silan-beschichteten Objektträgern aufgebracht und bei 37°C getrocknet.

2.5.3 Entparaffinieren

Für die Färbungen wurde das Paraffin nach dem folgenden Protokoll aus den Schnitten herausgelöst und die Schnitte rehydriert:

5. 3x 5 min HistoClear (Roth, Karlsruhe)
6. 3x 3 min 100% Ethanol
7. 2x 2 min 96% Ethanol
8. 1x 1min 70% Ethanol
- 9.

Die Schnitte für die immunhistologischen Färbungen wurde dreimal in TBS-Puffer gewaschen und kurzzeitig bis zur weiteren Verarbeitung in TBS aufbewahrt, um sie vor Austrocknung zu schützen. Die Schnitte für die konventionellen Färbungen wurden vorher mit Aqua dest. gespült.

2.5.4 Gefrierschnitte

Bei der Aufarbeitung der Gewebe für die Kryo-Histologischen Untersuchungen wurde streng darauf geachtet, dass die Gewebe bei -80°C gelagert wurden und mit Hilfe von Stickstoff oder Trockeneis transportiert wurden. Zu keinem Zeitpunkt wurde die Gefrierkette unterbrochen. Die Präparate wurden im Cryostat (Leica) bei -20°C geschnitten. Dazu wurden sie mit einigen Tropfen Tissue-Tek auf einen Metallpräparatehalter befestigt. Auf einem Objektträger wurden mindestens drei intakte Schnitte mit einer Dicke von 4 µm aufgenommen. Diese wurden eine Stunde lang bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte bei -20°C gekühlt. Danach wurden sie für 10 min in konzentriertem Aceton gegeben und dann für 30 min luftgetrocknet. Die Präparate wurden in Aluminiumfolie bei -80°C gelagert.

Vor der Färbung wurden die Objektträger in einem Präparatekarton aufgetaut und für fünf Minuten luftgetrocknet.

2.6 Konventionelle Färbungen

2.6.1 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung wird zur lichtmikroskopischen Untersuchung von extrazellulärer Matrix verwendet. Bei dieser Methode werden vier Farbstoffe verwendet, die folgende Bestandteile anfärben:

1. *Weigert (Eisenhämatoxylin)* schwarzbrauner Kernfarbstoff, lagert sich an an negative und saure Phosphatgruppen an
2. *Xylin-Ponceau* färbt Bindegewebe und Muskulatur rot
3. *Säurefuchsin* färbt Plasma und saures Bindegewebe rot
4. *Orange G* färbt Plasma und Erythrozyten orange
5. *Lichtgrün* färbt Mukos, Bindegewebe und Plasma grün

Vor der Färbung wurden die Arbeitslösungen angesetzt und filtriert:

- *Lichtgrün:* 0,5 g Lichtgrün SF

250 ml Aqua dest.

0,5 ml Eisessig

- *Weigert A:* 2 g Hämatoxylin

200 ml 96% Alkohol

filtrieren

- *Weigert B:* 2,32 g Eisen-III-Chlorid

198 ml Aqua dest.

- 2 ml 25%ige HCl
- *Xylin-Ponceau*: 1 g Xylin-Ponceau
100 ml Aqua dest., aufkochen lassen
nach dem Erkalten filtrieren
1 ml Eisessig
- *Azophloxin*: 0,5 g Azophloxin
100 ml Aqua dest.
0,2 ml Eisessig
- *PWO*: 10 g Wolframatophosphorsäure
100 ml Aqua dest.
4 g Orange G
90 ml Aqua dest.
filtrieren, 2 Tage stehen lassen, filtrieren

Aus diesen Lösungen wurden weitere Lösungen hergestellt, die für die Färbungen notwendig waren:

- *Weigert*: 100 ml Weigert A + 100 ml Weigert B, filtrieren
- *Masson*: 176 ml Aqua dest. + 0,35 ml Eisessig + 15 ml Ponceau +
5 ml Säurefuchsin + 4 ml Azophloxin

Nach dem Entparaffinieren und der Behandlung der Schnitte mit der absteigenden Alkoholreihe wurde nach folgendem Protokoll weitergearbeitet:

6. 2 min Weigert
7. 15 min bläuen mit Leitungswasser
8. 30 sec. Masson
9. 30 sec. 1%ige Essigsäure
10. 30 sec. PWO

11. 30 sec. 1%ige Essigsäure
12. 2 min Lichtgrün
13. 15 sec. 1%ige Essigsäure

Am Schluss werden die Präparate mit der aufsteigenden Alkoholreihe behandelt, 3x für 2 min Histoclear zugeführt und schließlich mit Histokit eingedeckt.

2.6.2 Auswertung der konventionellen Histologie

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung eines Lichtmikroskops Axioplan von der Firma Zeiss. Es wurde eine semiquantitative Analyse durchgeführt, in dem eine Graduierung von null bis fünf der Ausprägung der Läsionen eingeführt wurde:

- 0 = keine Läsion
- 1 = sehr geringe Läsionen
- 2 = geringe Läsionen
- 3 = moderate Läsionen
- 4 = ausgeprägte Läsionen
- 5 = sehr schwere Läsionen

Untersucht wurden 15 Gesichtsfelder pro Schnitt.

2.7 Immunhistochemische Färbungen

2.7.1 Indirekte Immunfluoreszenz- Methode

Ein bestimmtes Antigen kann mit der indirekten Methode sowohl auf Gefrierschnitten als auch auf Paraffinschnitten nachgewiesen werden. Dabei verwendet man zwei verschiedene Antikörper. Der eine Antikörper, der primäre Antikörper, ist spezifisch und richtet sich gegen bestimmte Bestandteile des zu untersuchenden Gewebes. An den Fc-Teil dieses Antikörpers bindet dann der zweite Antikörper. Dieser ist

fluorochrom-markiert. Das verwendete Fluorochrom ist Cy3 und hat ein Emissionsmaximum bei 570 nm. Der sekundäre Antikörper wurde entsprechend des primären Antikörpers ausgewählt. Vor Gebrauch wurden die Sekundärantikörper mit TBS 1:1000 verdünnt, zehn Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert und lichtgeschützt bis zur Verwendung aufbewahrt. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurde das Gewebe mit einer proteinhaltigen Serumlösung inkubiert. Diese lagert sich an geladene Regionen des Gewebes an und blockiert diese. Nach folgendem Protokoll wurden die Präparate gefärbt:

14. Schnitte mit PAP-Pen (Beckman Coulter, Marseille) umkreisen
15. 5 min rehydrieren mit TBS
16. 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit Serumlösung blocken
17. abklopfen, nicht spülen
18. Primärantikörper mit TBS verdünnen
19. 60 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer mit primären Antikörper inkubieren (ca. 50 µl/Schnitt)
20. 3x 5 min mit TBS waschen
21. 60 min Sekundärantikörper lichtgeschützt bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren
22. 3x 5 min mit TBS waschen
23. Eindecken mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- 24.

Die Schnitte wurden lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

2.7.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Zur Auswertung der immunhistochemischen Präparate wurde eine semiquantitative Methode verwendet. Dazu wurde ein Score für den Expressionsgrad festgelegt:

0 = kein Signal

1 = sehr schwaches Signal

2 = schwaches Signal

3 = mittelstarkes Signal

4 = starkes Signal

5 = sehr starkes Signal

Für jeden Marker von jedem Versuchstier wurden zehn Gesichtsfelder auf fünf verschiedenen Schnitten betrachtet und in den Score von 0-5 eingeordnet. Anschließend wurden für jedes Versuchstier die Mittelwerte und die Standardabweichung (SEM) berechnet.

2.7.3 Dokumentation der histologischen Ergebnisse

Repräsentative Regionen der Präparate wurden mit einer digitalen Videokamera (Axiocam, Zeiss, Jena) unter der Verwendung eines Lichtmikroskopes (Axioplan-2, Zeiss, Jena) aufgenommen. Die morphometrischen Berechnungen wurden nach Aufzeichnung mit einem Analysesystem (Axiovision, Zeiss, Jena) durchgeführt.

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Statistikprogrammes SPSS 13,0. Bei Normalverteilung der Ergebnisse wurden diese als Mittelwert \pm SEM angegeben. Anhand des „unpaired students t-test“ wurden die statistischen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt. Als statistisch signifikant unterschiedlich bewertet wurden die Ergebnissen ab einem Wert von $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Betrachtung der Mauszucht und der Mortalität

Für unsere Versuchsprotokolle verwendeten wir acht bis zehn Wochen alte männliche Mäuse. Dabei wurden zwei Gruppen, je nach Genotyp des Tieres gebildet. Die eine Gruppe bestand aus homozygoten Mäusen mit einem Knockout für *gas6* und die andere Gruppe aus homozygoten Wildtypmäusen. Beim Mausstamm handelte es sich um FVB/N Mäuse. Dies ist eine Inzuchtlinie, die sich durch eine günstige Bildung von transgenen Tieren und gute Fertilitätseigenschaften auszeichnet. In unserem Fall wurden bei Zuchtbeginn homozygote Knockoutmäuse mit Wildtypmäusen verpaart. Dabei entstanden heterozygote Tiere, die dann untereinander verpaart wurden. So sollten zwei unterschiedlichen Zuchtlinien entstehen; eine *gas6*^{-/-} Maus-Reihe und eine *gas6*^{+/+} Maus-Reihe, die dann miteinander verpaart werden sollten. Leider konnten *gas6*^{-/-} Mäuse mit nur sehr geringem Erfolg miteinander verpaart werden, da eine erhöhte Aggressivität zwischen den Paaren bestand. Des Weiteren wurden die Nachkommen sehr häufig von den Elterntieren getötet. So dass wir im weiteren Verlauf nur auf Nachkommen von heterozygoten Eltern für die Versuche zurückgreifen konnten. Zur Bestimmung des Genotyps wurde eine Genotypisierung aus der DNA der Schwanzspitze vorgenommen

Das Versuchsprotokoll dauerte insgesamt 56 Tage. An den Versuchen haben insgesamt 44 Versuchstiere teilgenommen. Davon waren 17 Mäuse genotypisch *gas6*^{-/-} und 19 Tiere *gas6*^{+/+}. Die restlichen Tiere (8) wurden genotypisch nicht unterschieden und wurden als Kontrolltiere untersucht. Im Rahmen der Versuche sind insgesamt vier Versuchstiere gestorben. Dabei handelte es sich bei einem Tier um *gas6*^{-/-} und bei den anderen drei Tieren um *gas6*^{+/+}. Jedoch starben die Versuchstiere noch vor Beginn der DOCA Therapie. Die Gründe für das Ableben der Tiere waren operationsbedingt. Der Tod geschah unmittelbar nach der Uninephrectomie. Somit war die Mortalität während der Therapie mit DOCA bei 0%.

3.2 Entwicklung des systemischen Blutdruckes

Die Blutdrücke wurden von Beginn des Versuches bis zum Tag 20 der DOCA-Behandlung gemessen. Nach Implantation des Katheters zur Blutdruckabnahme in der Aorta abdominalis wurde gewartet bis sich der Blutdruck stabilisierte. Zwischen den Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied bei den Messwerten. (in mmHg systolisch: Gas6+/+ 115 vs. Gas6-/- 113, diastolisch: Gas6+/+ 84 vs. Gas6-/- 83, Mittlerer arterieller Druck: Gas6+/+ 101±3 vs. Gas6-/- 98±2) Bei allen Tieren stieg der Blutdruck nach der Uninephrectomie an. Auch hier gab es keinen signifikanten Unterschied. (in mmHg systolisch: Gas6+/+ 120 vs. Gas6-/- 120, diastolisch: Gas6+/+ 87 vs. Gas6-/- 87, Mittlerer arterieller Druck: Gas6+/+ 102±2 vs. Gas6-/- 104±2) Nach Beginn der Behandlung mit DOCA wurde ebenfalls gewartet bis sich der Blutdruck stabilisierte. Diese stabile Phase konnte nach 18-20 Tagen nach Medikamentengabe erreicht werden. Der Blutdruck stieg in beiden Gruppen stark an. Aber auch jetzt gab es keinen signifikanten Unterschied bei den Messwerten. (in mmHg systolisch: Gas6+/+ 140 vs. Gas6-/- 148, diastolisch: Gas6+/+ 109 vs. Gas6-/- 108, Mittlerer arterieller Druck: Gas6+/+ 123±5 vs. Gas6-/- 123±7) Die Abb. 16 und 17 zeigen die Blutdruckverlauf (syst., diast., MAP) der beiden Versuchsgruppen.

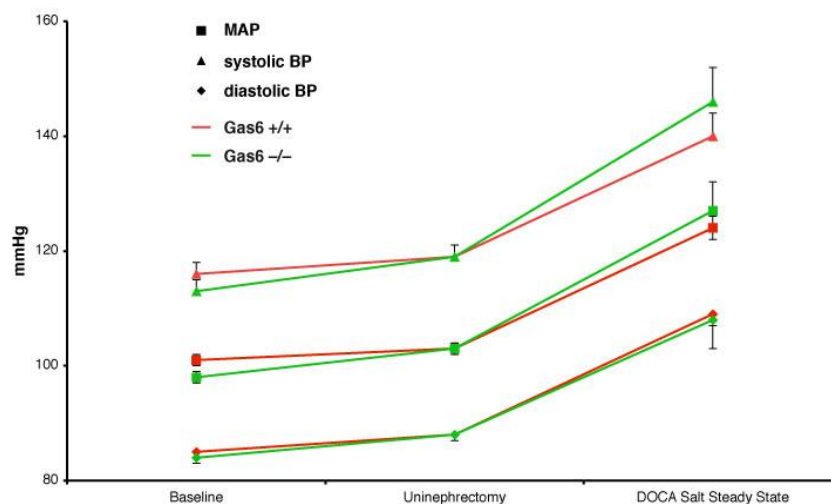


Abb. 16: Entwicklung des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdruckes im Verlauf des Versuches. Bei beiden Gruppen stieg der Blutdruck sowohl nach der Uninephrectomie an als auch nach Beginn der DOCA-Behandlung.

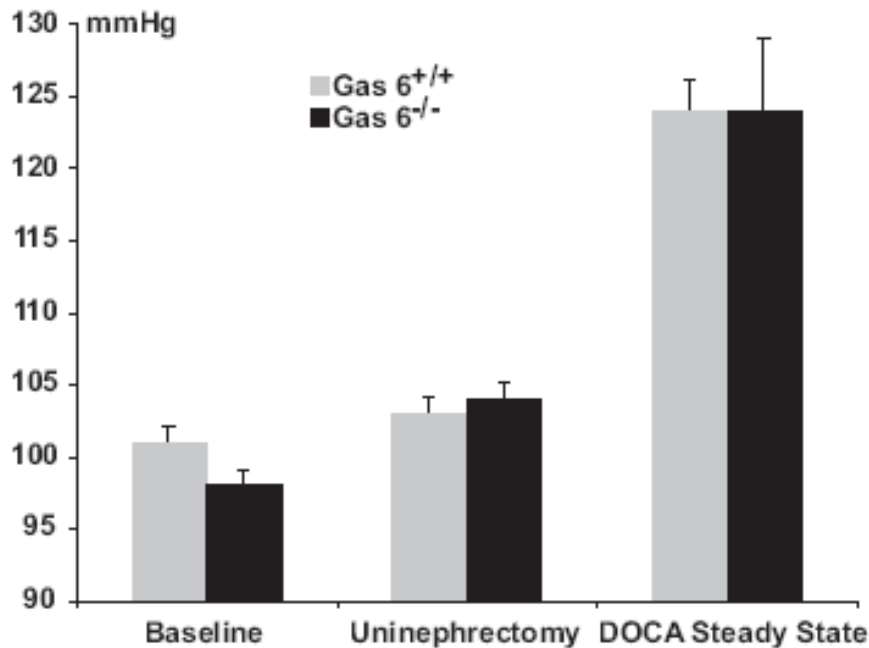


Abb. 17: Mittlerer arterieller Druck zu Versuchsbeginn, nach Uninephrectomie sowie nach Erreichen der stabilen Phase nach Behandlung mit DOCA. Beide Versuchsgruppen hatten zu Beginn des Versuches ähnliche Blutdruckwerte. Nach der Entnahme der Niere stieg der Druck in beiden Gruppen moderat an. Auch hier gab es keinen signifikanten Unterschied. Nach Gabe von DOCA stieg der Blutdruck stark an. Beide Versuchsgruppen hatten im Durchschnitt den selben Blutdruck.

Wir konnten zeigen, dass es keinen Unterschied in den Messwerten bei der Entwicklung erhöhter Blutdrücke zwischen den Gas6^{-/-} und Gas6^{+/+} gab. Wir können davon ausgehen, dass die Beteiligung von Gas6 an der Pathogenese von aldosteroninduzierten kardiovaskulären und renalen Endorganschäden vom Blutdruck unabhängig ist. Daraus schließen wir, dass die Aldosteron-induzierte Hypertonie in diesem Modell unabhängig von der Expression von Gas 6 ist.

3.3 Morphologische und funktionelle Veränderungen am Herzen

3.3.1 Der Heart/Body Index und die linksventrikuläre Masse

Eine arterielle Hypertonie, die über einen längeren Zeitraum andauert ist an der Entwicklung einer Herzhypertrophie beteiligt. Zudem führen erhöhte Aldosteronspiegel im Blut zu inflammatorischen und fibrotischen Veränderungen, die mit einer Gewicht- und Größenzunahme, im Sinne einer Hypertrophie, einher gehen. Um eine mögliche Rolle von Gas6 an der Entstehung einer Hypertrophie des Herzens im Rahmen des DOCA/Aldosteron- induzierten Endorganschadens einzuschätzen, wurde diese mit Hilfe von einigen Parametern gemessen. Ein Marker für die Herzhypertrophie ist eine Zunahme der linksventrikulären Masse. Die linksventrikuläre Masse wurde im Rahmen der Echokardiographie ermittelt und wird in mg gemessen. Die Untersuchung erfolgte, in Zusammenarbeit mit Arnd Heuser, sechs Wochen nach Beginn der DOCA-Behandlung. Man konnte feststellen, dass die Tiere in der Gruppe von Gas6^{-/-} (111,58 ± 4,53) eine geringere linksventrikuläre Masse zeigten als in der Gruppe von Gas6^{+/+} (146,68 ± 6,77) Siehe Abb. 18.

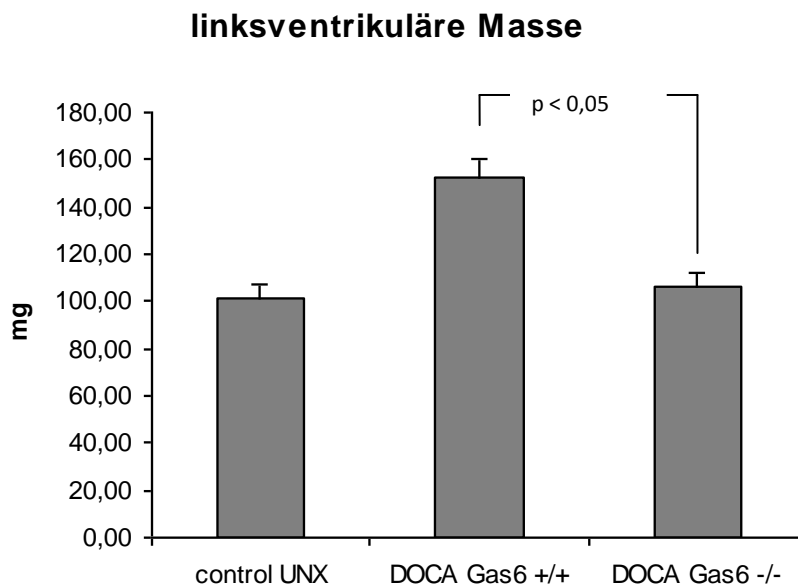


Abb. 18: Linksventrikuläre Masse. Die linksventrikuläre Masse wurde mit Hilfe der Echokardiographie ermittelt. Untersucht wurden unbehandelte und behandelte Mäuse beider Gruppen. Die behandelten Gas6^{+/+}-Mäuse hatten eine größere Masse des linken Ventrikels im Vergleich zu den Gas6^{-/-}-Mäusen.

Zur Einschätzung der Herzhypertrophie kann man auch den Heart/Body Index ermitteln. Dieser stellt eine relative Beziehung zwischen dem Körpergewicht und dem Herzgewicht her. Um falsche Werte durch stark unterschiedliche Körpergewichte zu vermeiden, werden diese mit der Länge der Tibia korrigiert. Die Gewichte wurden durch das Wiegen der Körper und der Herzen bei der Opferung ermittelt. Es zeigte sich auch hier, dass die Gas6^{+/+}-Mäuse ($4,53 \pm 0,03$) eine vermehrte Herzhypertrophie entwickelten als die Gas6^{-/-}-Gruppe ($4,08 \pm 0,03$). In Abb. 19 dargestellt.

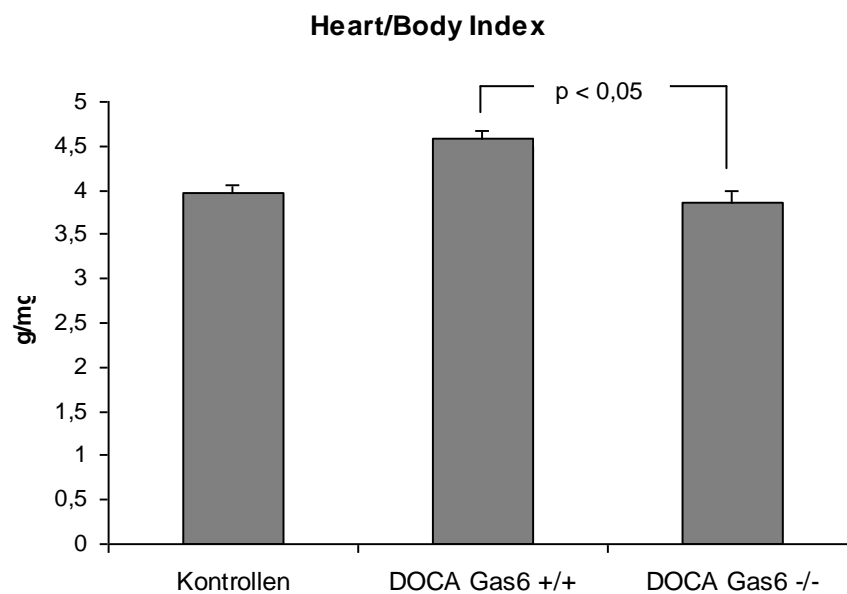


Abb. 19: Heart/Body Index. Die Beziehung zwischen Herzgewicht und Körpergewicht wurde ermittelt. Zum Vergleich wurde die Länge der Tibia gemessen. Die behandelten Gas6^{+/+}-Mäuse hatten einen höheren Heart/Body Index als die Gas6^{-/-}-Mäuse.

Wir konnten zeigen, dass Gas6 an der Entstehung einer Herzhypertrophie beteiligt ist. Da alle Versuchstiere eine Hypertonie entwickelten, sowohl die Tiere mit einer Gas6-Expression als auch die Tiere mit einem Knockout für Gas6, können wir davon ausgehen, dass der Effekt von Gas6 auf die Entwicklung einer Herzhypertrophie sich nicht auf die Entwicklung einer Hypertonie zurückführen lässt, also blutdruckunabhängig ist.

3.3.2 Inflammation und Proliferation in der Histologie

Neben der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie führt Aldosteron bzw. DOCA zu einem Remodeling am Herzen. Gekennzeichnet ist dieses Geschehen durch die Entstehung von Entzündungs- und Fibroseprozesse im Herzgewebe. Um die Auswirkungen von Gas6 auf das DOCA- induzierte Remodeling am Herzen zu untersuchen wurde das Ausmaß der Entzündung und der Bindegewebsvermehrung betrachtet. Hierfür wurde als Marker für inflammatorische Prozesse das Zytokin Interleukin 6 (IL-6) ausgewählt. In Abbildung 20 sieht man einen demonstrativen Ausschnitt für die immunhistochemische Anfärbung der Herz-Schnitte auf IL-6. Wir konnten einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen in der Expression von IL-6 nachweisen. Verglichen mit den $Gas6^{+/+}$ ($4,20 \pm 0,18$) bildete die Gruppe der $Gas6^{-/-}$ ($2,20 \pm 0,33$) weniger Interleukin 6. Zwischen den unbehandelten Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied. Im Diagramm in Abbildung 21 sind die unterschiedlichen Expressionen zwischen den Gruppen dargestellt.

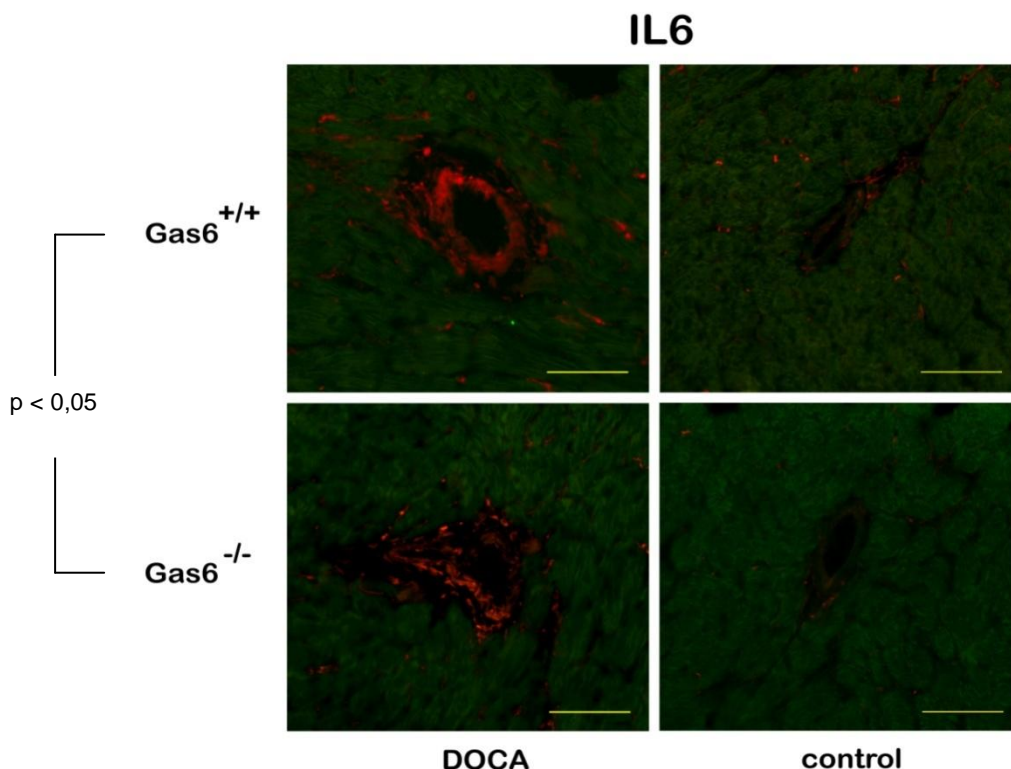


Abb. 20: Expression von Interleukin 6 im Herzgewebe. Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung von Herzmuskelgewebe bei $Gas6^{+/+}$ -Mäusen (behandelt l.o./unbehandelt r.o.) und $Gas6^{-/-}$ -Mäuse (behandelt l.u./unbehandelt r.u.)

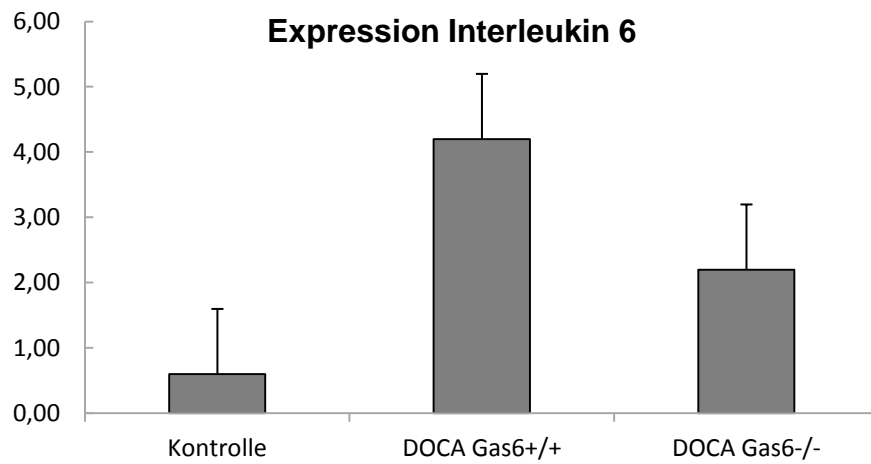


Abb. 21: Graphische Darstellung der Expression von Interleukin 6 im Herzgewebe. Die Versuchsgruppe mit normaler Gas6-Expression entwickelte vermehrt Interleukin 6 im Vergleich zur Versuchsgruppe ohne Gas6-Expression.

Im Rahmen des kardialen Remodeling kommt es zu einer verstärkten Expression der extrazellulären Matrix in Form von Bindegewebe. Um die Beteiligung von Gas6 an der Stimulation der Bildung von Bindegewebsanteilen nachzuweisen, wurde das Herzgewebe der unbehandelten und behandelten Versuchstiergruppen zum Vergleich immunhistochemisch auf das Glykoprotein Fibronectin angefärbt, wie in Abbildung 22 dargestellt. Zwischen den unbehandelten Kontrollen beider Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied. Jedoch konnte man in der behandelten $\text{Gas6}^{+/+}$ -Gruppe ($4,40 \pm 0,22$) eine signifikant größere Expression von Fibronectin zeigen als in der behandelten $\text{Gas6}^{-/-}$ -Gruppe ($2,60 \pm 0,22$). (Abb. 23)

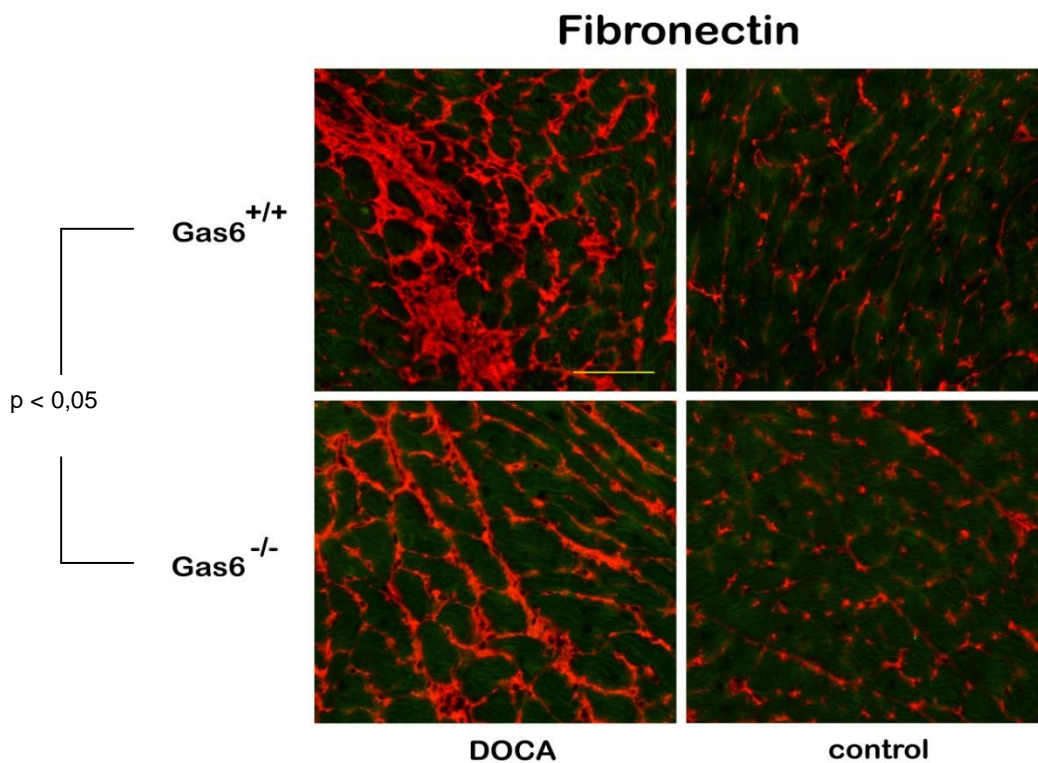


Abb. 22: Expression von Fibronectin im Herzgewebe. Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung von Herzmuskelgewebe bei $\text{Gas6}^{+/+}$ -Mäusen (behandelt l.o./unbehandelt r.o.) und $\text{Gas6}^{-/-}$ -Mäuse (behandelt l.u./unbehandelt r.u.)

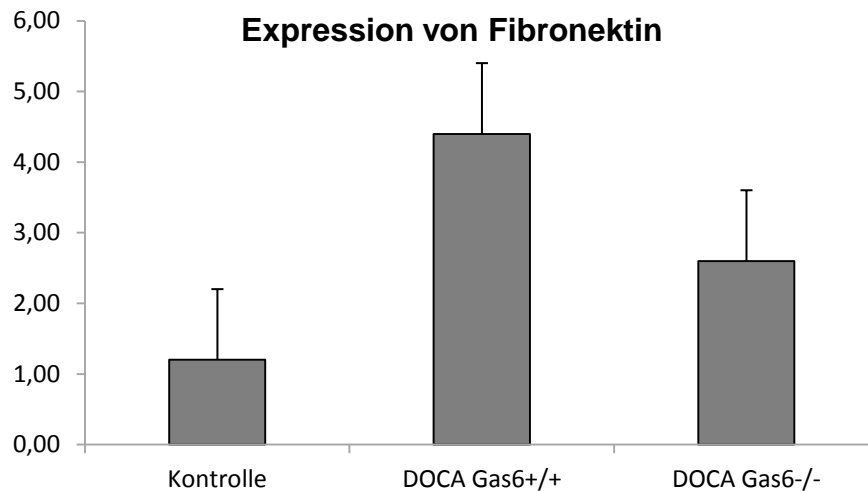


Abb. 23: Graphische Darstellung der Expression von Fibronectin im Herzgewebe. Die Versuchsgruppe mit normaler Gas6-Expression entwickelte vermehrt Fibronectin im Vergleich zur Versuchsgruppe ohne Gas6-Expression.

Zusammenfassend können wir sagen, dass die Versuchsgruppe, die keine Gas6 exprimiert weniger Zeichen von Inflammation und Fibrose zeigt, als die Versuchstiere, die Gas6 exprimieren. Somit ist Gas6 beteiligt an der Entwicklung von Entzündung und kardialen Remodeling. Die Beteiligung von Gas6 ist blutdruckunabhängig.

3.3.3 Auswertung der Herzfunktion

Zur Einschätzung der Herzfunktion der Versuchstiere wurde im Rahmen der echokardiographischen Untersuchung die Ejektionsfraktion (EF) berechnet. Anders als erwartet, wurde bei den Mäusen mit Gas6-Expression (61,66 % \pm 4,4) eine signifikant höhere EF festgestellt als bei den Mäusen ohne Gas6-Expression (54,25 % \pm 5,4).

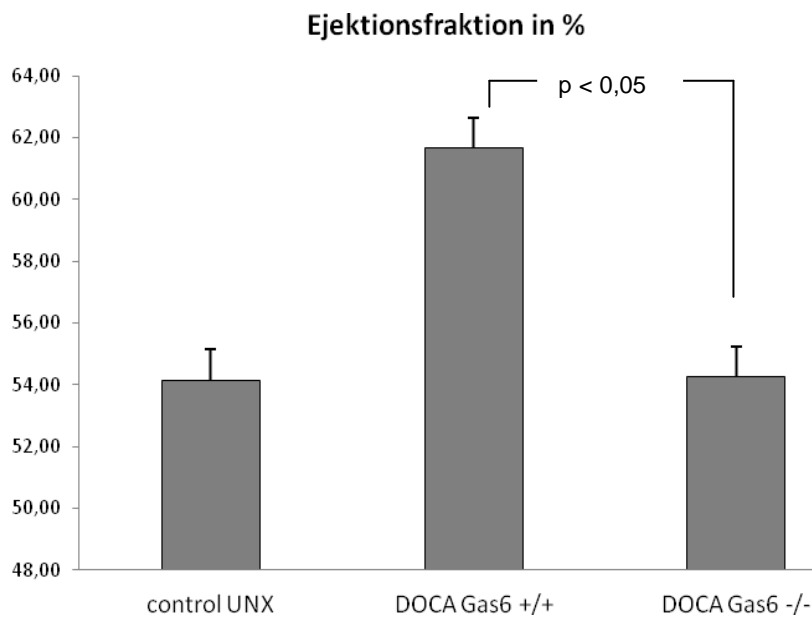


Abb. 24: Ejektionsfraktion. Die Ejektionsfraktion (EF) wurde echokardiographisch errechnet. Hier zeigt sich eine signifikant höhere EF bei den Wildtyp-Tieren im Vergleich zu den Knockout-Mäusen.

3.3.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann man sagen, dass Gas6 einen Einfluss auf das Remodeling beim Herzen hat. Man konnte zeigen, dass alle Tiere durch die Uninephrectomie und die Behandlung mit DOCA eine Hypertrophie des Herzens entwickelten. Dabei konnte man eine verstärkte Expression von Interleukin 6 und Fibronectin in der immunhistologischen Auswertung in beiden Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen. Jedoch war die Ausprägung dieser Parameter bei den Tieren, die einen Gas6- Knockout hatten signifikant geringer als bei den Wildtypmäusen. Bei der Untersuchung der funktionellen Herzparameter fiel auf, dass die Wildtypmäuse eine bessere Pumpfunktion hatten als die Knockout-Mäuse. Zudem stellten wir fest, dass die Pumpfunktion der Wildtypmäuse sogar höher war als die der Mäuse aus der Kontrollgruppe. Die hier untersuchten Effekte von Gas6 waren vom Blutdruck unabhängig, da die Entwicklung des Blutdruckes sowohl in der Gruppe mit Gas6-Expression als auch ohne Gas6-Expression gleich war. In unserem Behandlungszeitraum gab es keine erhöhte Mortalität.

Ergebnisse

Parameter	Gruppe	Mittelwert (SEM)	Signifikanz	Tierzahl
Heart/Body Index	Kontrolle	4,09 (0,04)	p < 0,05	13
	Gas6 ^{+/+}	4,53 (0,03)		12
	Gas6 ^{-/-}	4,08 (0,03)		14
linksventrikuläre Masse	Kontrolle	101,73 (5,23)	p < 0,05	8
	Gas6 ^{+/+}	146,68 (6,77)		4
	Gas6 ^{-/-}	111,58 (4,53)		6
Fibronektin (Histologie)	Kontrolle	1,20 (0,18)	p < 0,05	13
	Gas6 ^{+/+}	4,40 (0,22)		12
	Gas6 ^{-/-}	2,60 (0,22)		14
Interleukin 6 (Histologie)	Kontrolle	0,60 (0,22)	p < 0,05	13
	Gas6 ^{+/+}	4,20 (0,18)		12
	Gas6 ^{-/-}	2,20 (0,33)		14
Ejektionsfraktion	Kontrolle	54,13 (1,40)	p < 0,05	8
	Gas6 ^{+/+}	61,66 (2,22)		4
	Gas6 ^{-/-}	54,25 (2,21)		6

Tabelle 1: Werte der einzelnen Untersuchungsparameter am Herzen

3.4 Morphologische und funktionelle Veränderungen an den Nieren

Ähnlich wie am Herzen, führen erhöhte Aldosteronspiegel im Serum zur Entwicklung von renalen Schäden, welche mit einer Einschränkung der Nierenfunktion einher gehen. Dies konnte bereits sowohl in klinischen Studien an Patienten mit Hyperaldosteronismus als auch in verschiedenen Tiermodellen demonstriert werden. Eine Therapie mit einem MR-Blocker konnte die Ausprägung der Schäden abmildern. [62]

3.4.1 Die Albumin-Ausscheidung und der Albumin-Kreatinin-Quotient

Ein Indikator für eine eingeschränkte Nierenfunktion ist die Albuminausscheidung. Um die Nierenfunktion der Versuchstiere zu untersuchen wurde sowohl bei den $\text{Gas6}^{+/+}$ als auch bei den $\text{Gas6}^{-/-}$ wurde die renale Albuminausscheidung vor der Behandlung mit DOCA und nach 39 Tagen Behandlung mit DOCA gemessen. Dabei konnte man in beiden Gruppen eine Zunahme der Albuminurie feststellen. Nach 39 Tagen Behandlung mit DOCA stieg die Albuminausscheidung stark an. Jedoch war die Albuminurie der $\text{Gas6}^{+/+}$ ($1803,31 \pm 352,56$) signifikant höher als bei den $\text{Gas6}^{-/-}$ ($716,93 \pm 197,63$) In der Abbildung 25 kann man sehen, dass die Albuminwerte stark inhomogen sind. Jedoch zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

Ein weiterer in der Klinik gebräuchlicher Parameter zur Messung einer Albuminurie ist der Albumin-Kreatinin-Quotient (ACR). Dieser Quotient gibt das Verhältnis zwischen der Albuminkonzentration und der Kreatininkonzentration im Urin an und spiegelt ebenfalls eine glomeruläre Störung wider. Der ACR wurde ebenfalls nach 39 Tagen DOCA-Behandlung ermittelt. Er war bei den Tieren in der Gruppe der Wildtypiere signifikant höher als bei den Knockout-Mäusen. (Siehe Abb. 26)

Wir schlussfolgerten daraus, dass Gas6 an der Entwicklung einer Nierenfunktionsstörung beteiligt ist. Da sich das Blutdruckverhalten zwischen den Versuchsgruppen nicht unterschied, sind die Effekte von Gas6 auf die Nierenfunktion blutdruckunabhängig.

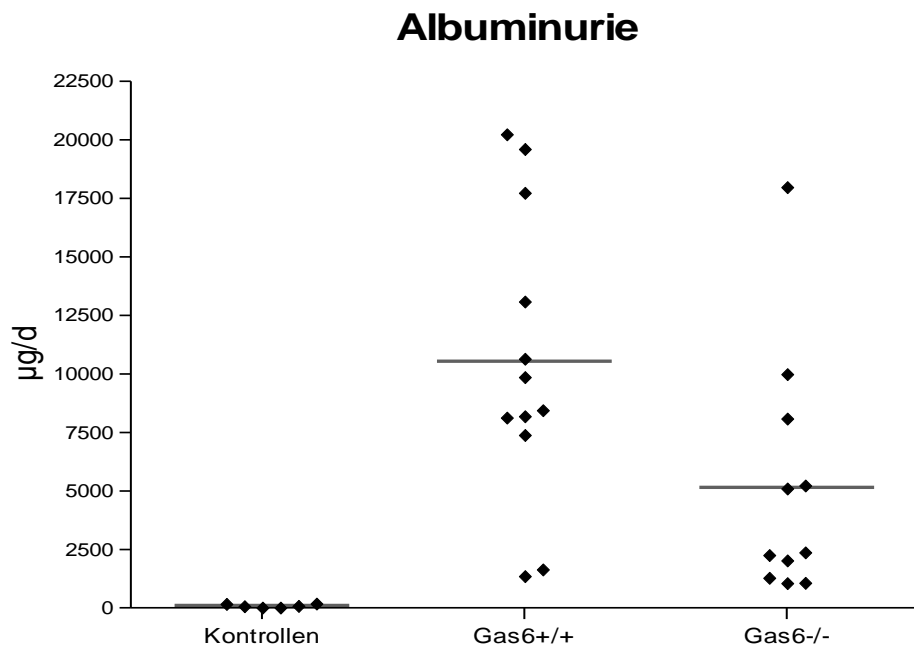


Abb. 25: Albuminurie nach Uninephrectomie und 39 Tagen DOCA-Behandlung. Die $Gas6^{+/+}$ -Tiere entwickelten eine höhere Albuminurie als die $Gas6^{-/-}$ -Mäuse.

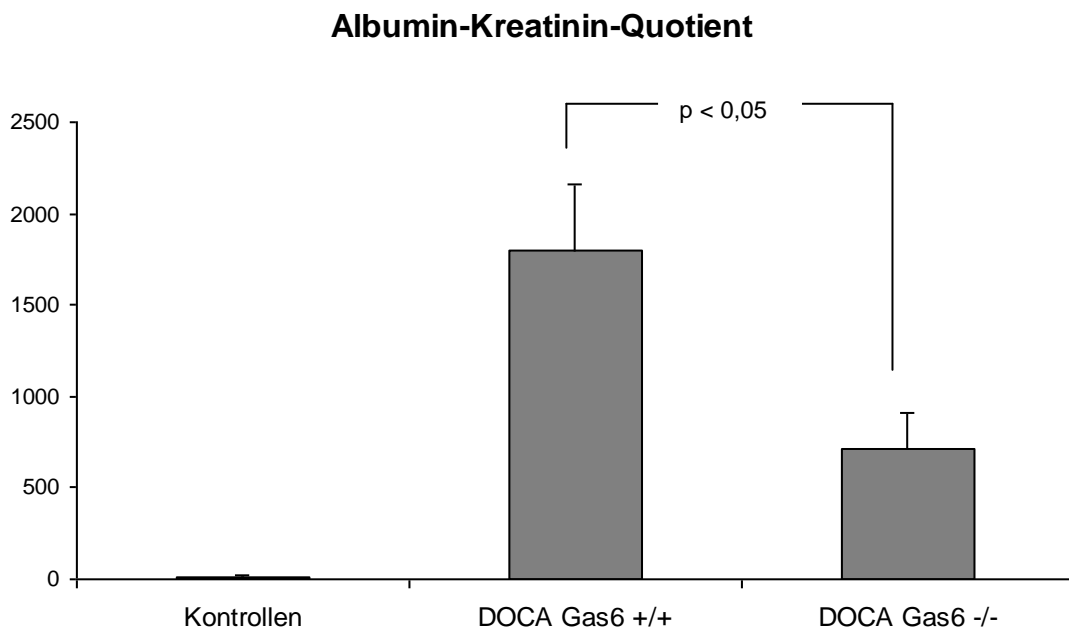


Abb. 26: Albumin-Kreatinin-Quotient nach Uninephrectomie und 39 Tage DOCA- Behandlung. Die Albumin- und Kreatininkonzentration im Urin wurden gemessen. Die $Gas6^{+/+}$ -Gruppe zeigte einen höheren Quotienten als die $Gas6^{-/-}$ -Gruppe.

3.4.2 Histopathologische Auswertung der Nieren

In der konventionellen Färbung erkennt man eine Glomerulopathie an einer erhöhten Zellularität durch die Einwanderung von Immunzellen. Zudem findet man vermehrt Bindegewebe. Die Glomeruli stellen sich oft als verplumpt mit einem erhöhten Anteil an Mesangialzellen dar.

Abbildung 27 stellt repräsentative Ausschnitte aus Nierengewebe dar, dass nach Maason-Goldner angefärbt wurde. Dabei konnten wir eine vermehrte Hypertrophie der kleinen Gefäße von $gas6^{+/+}$ im Vergleich zu $gas6^{-/-}$ feststellen. Außerdem stellten wir vermehrt sklerosierte Glomeruli sowie atrophierte und hyalinisierte Tubuli in den Nieren der mit DOCA behandelten Wildtypiere im Vergleich zu den mit DOCA behandelten Knockoutmäusen fest. (Kontrollen: $0,4 \pm 0,2$; DOCA: $Gas6^{+/+}$ $4,4 \pm 0,4$; $Gas6^{-/-}$ $2,4 \pm 0,2$; $p < 0,05$) Bei den unbehandelten Tieren gab es keinen Unterschied zwischen den Genotypen.

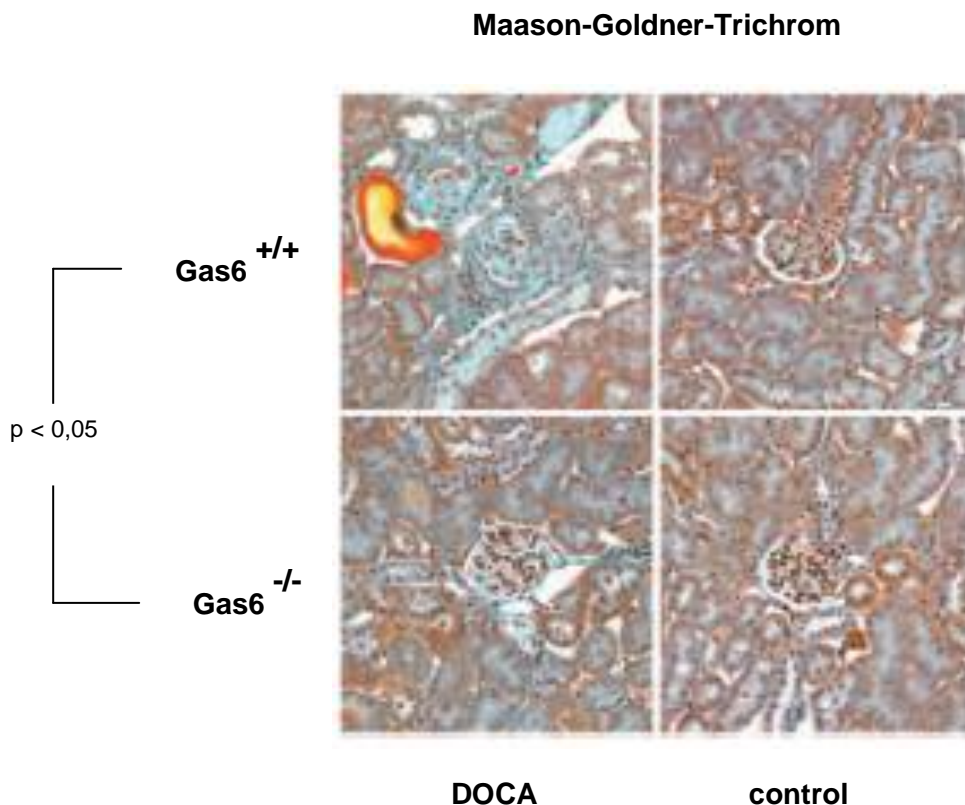


Abb. 27: Färbung nach Maason-Goldner-Trichrom. Dargestellt ist die konventionelle Färbung von Nierengewebe bei $Gas6^{+/+}$ -Mäusen (behandelt l.u./unbehandelt r.o.) und $Gas6^{-/-}$ -Mäuse (behandelt l.u./unbehandelt r.u.)

3.4.3 Inflammation und Proliferation in der Histologie

Um mögliche Veränderungen in der Struktur der Nieren durch eine DOCA- induzierte Beteiligung von Gas6 zu untersuchen, wurden die Nieren histologisch aufgearbeitet und mit Antikörpern behandelt. Auch hier wurden zwei Versuchsgruppen jeweils mit unbehandelten und behandelten Tieren untersucht. Der Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) ist ein multifunktionelles Zytokin, das bei lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt ist. Es wird von Makrophagen sezerniert und reguliert die Aktivität verschiedener Immunzellen. Durch die Behandlung der Versuchstiere mit DOCA kann man eine Aktivierung der Expression von TNF α in der Niere induzieren. Zum Vergleich wurden die Nieren von behandelten Gas6^{-/-}-Mäusen und Gas6^{+/+}-Mäusen (2,20 \pm 0,18 vs. 4,60 \pm 0,18) auf eine Expression von TNF α untersucht. (Abb. 28) Hier konnte man in den Knockouttieren signifikant weniger von diesem Zytokin beobachten. Es gab jedoch keinen Unterschied zwischen unbehandelten Gas6^{+/+} und unbehandelten Gas6^{-/-}. (Abb. 29) Somit ist Gas6 beteiligt an der Entstehung einer Inflammation in den Nieren.

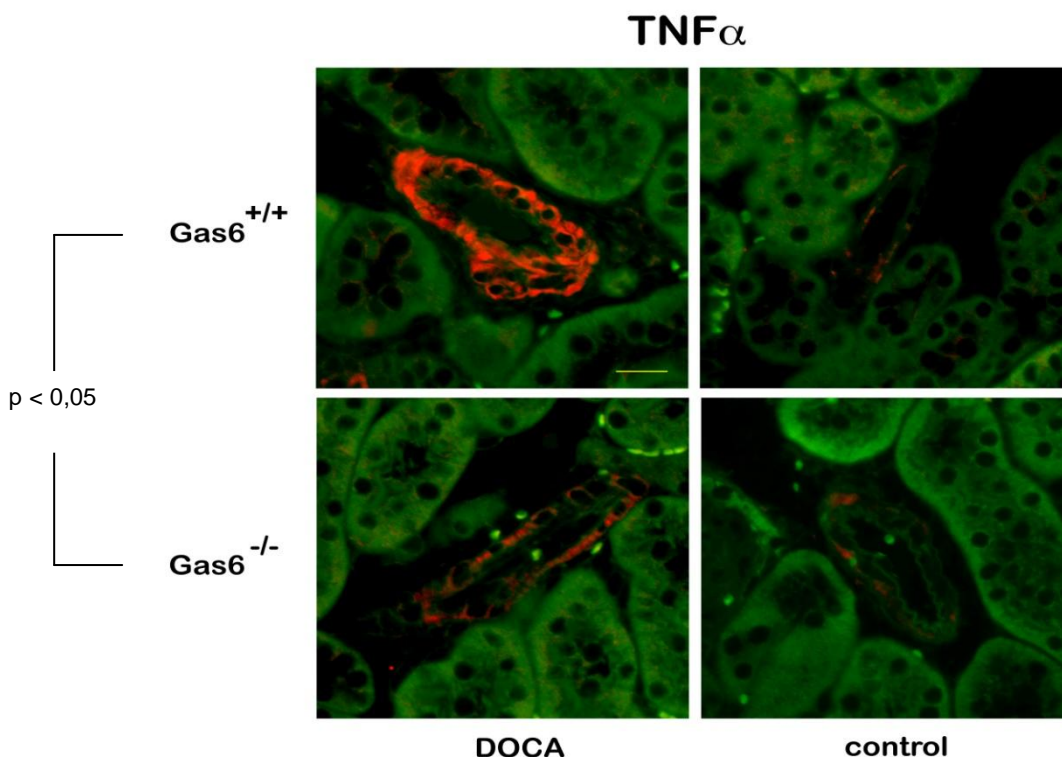


Abb. 28: Expression vom TNF α im Nierengewebe. Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung von Nierengewebe bei Gas6^{+/+}-Mäusen (behandelt l.o./unbehandelt r.o.) und Gas6^{-/-}-Mäuse (behandelt l.u./unbehandelt r.u.)

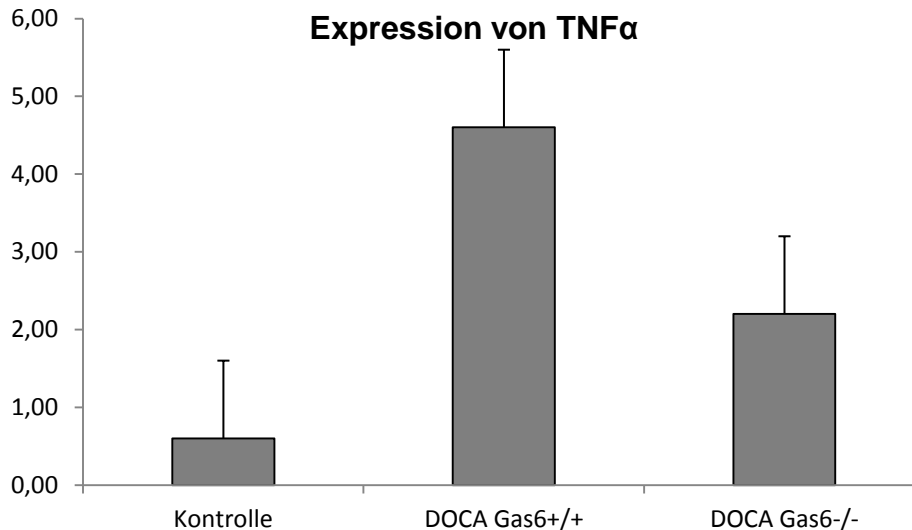


Abb. 29: Graphische Darstellung der Expression von TNF α im Nierengewebe. Die Versuchsgruppe mit normaler Gas6-Expression entwickelte vermehrt TNF α im Vergleich zur Versuchsgruppe ohne Gas6-Expression.

Im Rahmen von inflammatorischen Prozessen an der Niere in Folge von verschiedensten Nierenerkrankungen, aber auch bei einer Dysregulation vom Renin-Angiotensin-Aldosteron-System kann es zu einer irreversiblen Schädigung des renalen Gewebes kommen. Hochdifferenzierte Strukturen gehen dabei zu Grunde und werden durch Bindegewebe ersetzt. Dabei ist Kollagen IV Strukturprotein, das bei diesen Vorgängen vermehrt synthetisiert wird. Das konnte man auch bei den Versuchstieren nach der Behandlung mit DOCA erkennen. Dargestellt ist dies in Abbildung 30. Der Nachweis erfolgte durch eine immunhistochemische Untersuchung des Nierengewebes. Man konnte in der Gas6^{+/+}- Gruppe ($4,60 \pm 0,36$) eine verstärkte Expression von Kollagen IV beobachten als in der Gas6^{-/-}- Gruppe ($2,80 \pm 0,40$). Einen Unterschied in der Expression von Kollagen IV zwischen den unbehandelten Gruppen konnte nicht nachgewiesen werden. Wir können sagen, dass Gas6 beteiligt ist an der Entstehung einer Fibrose in den Nieren beim Aldosteron-induzierten Entorganschaden.

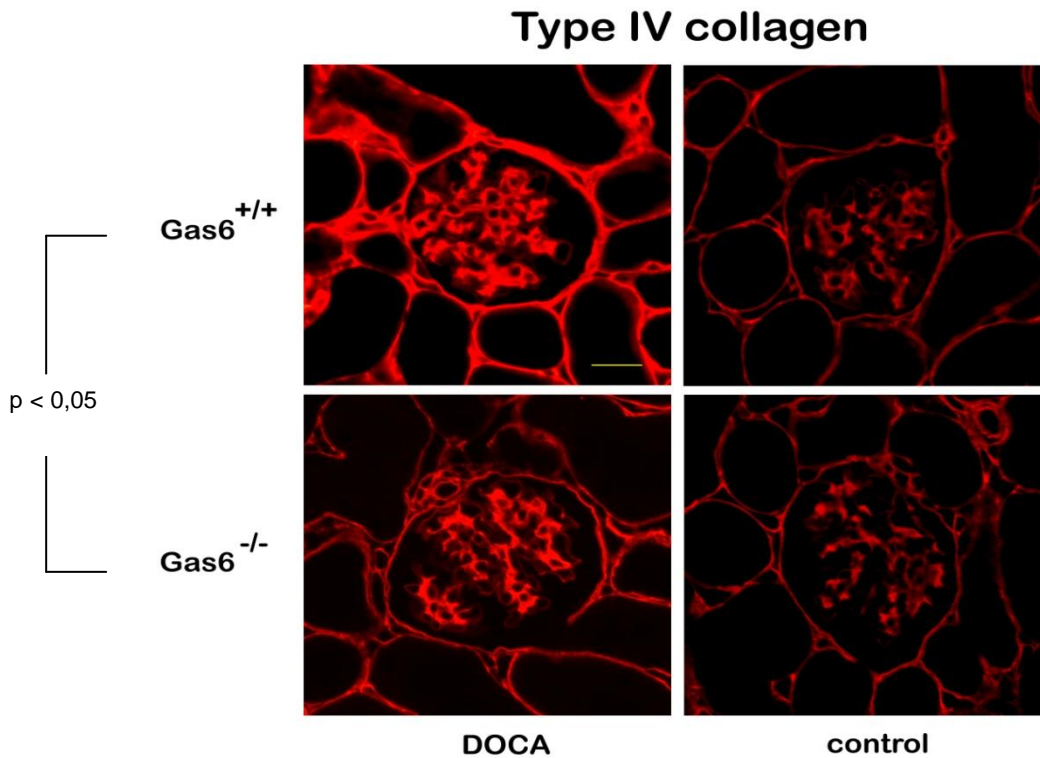


Abb. 30: Expression von Kollagen IV in der Niere. Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung von Nierengewebe bei $Gas6^{+/+}$ -Mäusen (behandelt l.o./unbehandelt r.o.) und $Gas6^{-/-}$ -Mäuse (behandelt l.u./unbehandelt r.u.)

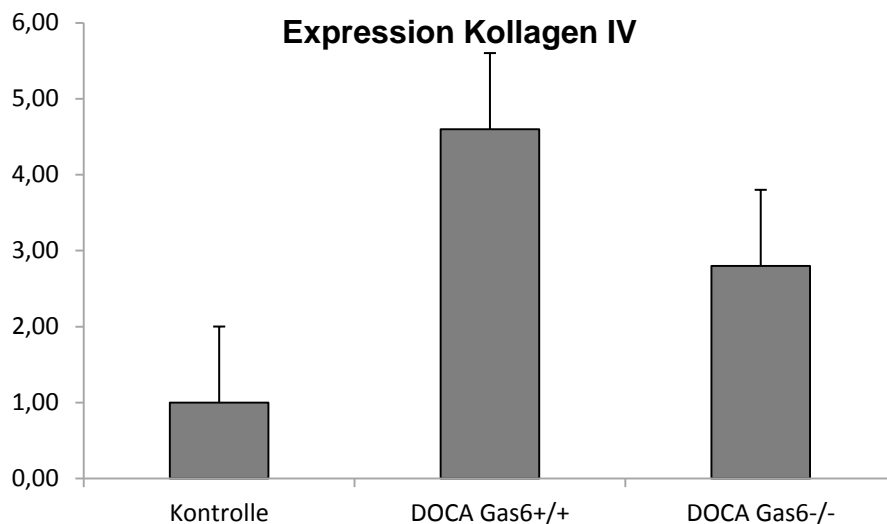


Abb. 31: Graphische Darstellung der Expression von Kollagen IV im Nierengewebe. Die Versuchsgruppe mit normaler $Gas6$ -Expression entwickelte vermehrt Kollagen IV im Vergleich zur Versuchsgruppe ohne $Gas6$ -Expression.

3.4.4 Zusammenfassung

Gas6 hat einen Einfluss auf die Entwicklung von DOCA- induzierten Schäden in der Niere. Man konnte feststellen, dass zum einen die Nierenfunktion in allen behandelten Versuchstieren bereits eingeschränkt war, dass sich durch Gas6 die Verschlechterung der Nierenfunktion verstärkte. Das konnten wir an der Albuminausscheidung und dem Albumin-Kreatinin-Quotienten verdeutlichen. Auch morphologisch konnte man Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen. Die Wildtypmäuse exprimierten signifikant mehr TNF α und Kollagen IV als die Knockouttiere. Gas6 ist beteiligt an der Entwicklung von Nierenschäden und einer darauf folgenden eingeschränkten Nierenfunktion. Wir können zudem sagen, dass die untersuchten Effekte von Gas6 vom Blutdruck unabhängig sind.

Ergebnisse

Parameter	Gruppe	Mittelwert (SEM)	Signifikanz	Tierzahl
Albuminurie	Kontrolle	0,11 (0,02)	p < 0,05	8
	Gas6 ^{+/+}	10,55 (1,71)		12
	Gas6 ^{-/-}	5,16 (1,50)		11
Albumin-Kreatinin-Quotient	Kontrolle	35,77 (6,74)	p < 0,05	8
	Gas6 ^{+/+}	1803,31 (352, 56)		12
	Gas6 ^{-/-}	716,93 (197,63)		11
Maason-Goldner-Trichrom (Histologie)	Kontrolle	0,4 (0,2)	p < 0,05	8
	Gas6 ^{+/+}	4,4 (0,4)		12
	Gas6 ^{-/-}	2,4 (0,2)		11
Kollagen Typ IV (Histologie)	Kontrolle	1,00 (0,28)	p < 0,05	8
	Gas6 ^{+/+}	4,60 (0,36)		12
	Gas6 ^{-/-}	2,80 (0,40)		11
TNF α (Histologie)	Kontrolle	0,60 (0,22)	p < 0,05	8
	Gas6 ^{+/+}	4,60 (0,18)		12
	Gas6 ^{-/-}	2,20 (0,18)		11

Tabelle 2: Werte der einzelnen Untersuchungsparameter der Nieren

4 Diskussion

Inflammation und Remodeling sind Schlüsselmechanismen bei der Pathophysiologie von kardiovaskulären Endorganschäden. Eine effektive Blockade des RAAS kann diese Schäden verhindern. Seit langer Zeit wurde der Fokus der RAAS-Blockade auf die Hemmung der Bildung und Bindung von Ang II gelegt. Erst mit den Studien RALES und EPHEBUS wurde bewusst, dass die Hemmung von Aldosteron ebenfalls einen positiven Effekt auf das Remodeling bei Herzinsuffizienz und nach Herzinfarkten hat. [32-33]

In dieser Arbeit untersuchten wir, ob der Wachstumsfaktor Gas6 beteiligt ist an der Entstehung von renalen und kardialen Endorganschäden nach einer exzessiven Aldosteronbelastung. Um dies zu untersuchen, wurden Versuche an Gas6^{-/-} Mäusen durchgeführt. Diese erhielten nach einer Uninephrektomie kontinuierlich DOCA für 42 Tage bei normaler Diät ohne erhöhte Salzzufuhr. Die Ergebnisse wurden mit Ergebnissen aus identischen Versuchen an Wildtypmäusen verglichen. Nach diesem Protokoll wurde ein signifikantes Ansteigen des Blutdruckes beobachtet. Zwischen den Knockoutmäusen und den Wildtypmäusen gab es keinen Unterschied im Blutdruckverhalten. Dies bedeutet, dass alle beobachteten Effekte blutdruckunabhängig sind. Jedoch gab es Unterschiede hinsichtlich der Morphologie und Funktion des Herzens und der Nieren. Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch zeigten die Wildtypmäuse eine mehr ausgeprägte Schädigung der Nieren und des Herzens. Dies spiegelt sich auch in der Funktion der Organe wieder.

In der Vergangenheit wurde bei ähnlichen Versuchen in anderen Arbeitsgruppen zusätzlich eine Diät mit erhöhter Salzzufuhr verabreicht. Dies verursachte ein Ansteigen des arteriellen Blutdruckes. [42, 88] In unseren Versuchen wurde auf eine Salzdiät verzichtet. Trotzdem entwickelten die Tiere erhöhte Blutdrücke. Um den Einfluss von Gas6 auf die Endorgane nach einer Stimulation mit Aldosteron zu untersuchen, wurden das Herz und die Niere sowohl morphologisch als auch funktionell untersucht. Sowohl in den Nieren als auch am Herzen konnten wir feststellen, dass Gas6 eine Rolle spielt bei der Entstehung von Entzündungsprozessen und Bildung von Bindegewebe in Folge kontinuierlichen

DOCA-Zufuhr. Zudem konnten wir auch eine Beteiligung von Gas6 an der Verschlechterung der Nierenfunktion unter DOCA-Applikation nachweisen.

Bereits im Vorfeld wurde in Versuchen an dTGR-Ratten festgestellt, dass eine Stimulation der Tiere mit Ang II zu einer Überexpression von Gas6 in den Geweben der Endorgane führt. Insbesondere konnten diese Ergebnisse für die Nieren und das Herz demonstriert werden. Dies zeigte uns einen Zusammenhang zwischen Gas6 und RAAS. Ob es sich hier um einen direkten Zusammenhang handelte, wurde in Zellkulturversuchen untersucht. Dabei wurden glatte Gefäßmuskelzellen mit Ang II stimuliert. Dies führte zu einer Überexpression von Gas6. [108]

Nun ist der Zusammenhang zwischen Aldosteron und Ang II bereits seit langem gut etabliert. Die Frage war nun, gibt es einen Zusammenhang zwischen Aldosteron und Gas6. Dieser Frage wurde ebenfalls bereits im Vorfeld von unserer Arbeitsgruppe in Zellkulturuntersuchungen nachgegangen. Dabei beobachtete man ebenfalls eine Überexpression von Gas6 nach Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen mit Aldosteron. [110] In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass Gas6 zu Entzündungsprozessen beiträgt, indem es Endothelzellen aktiviert und eine Freisetzung von Leukozyten und Thrombozyten begünstigt. Dies führt dann zu einer Entzündungsreaktion in den Gefäßen. [93]

4.1 Diskussion der Nierenfunktion und Morphologie

Ein Indikator für eine eingeschränkte Nierenfunktion ist die Albuminausscheidung. Die Albuminurie ist die Konsequenz einer gestörten renalen Gefäßpermeabilität und einer Veränderung der glomerulären Basalmembran. Unter physiologischen Umständen stellt die glomeruläre Kapillarwand eine gröÙenselektive und ladungsselektive Barriere dar. Durch inflammatorische und proliferative Vorgänge im Rahmen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems kommt es zu einem Umbau der Basalmembran und damit zu einem Verlust der Blutharnschranke. Albumin, das physiologisch nur 4 bis 6 µg pro min renal ausgeschieden wird, kann im Urin stark ansteigen. Jedoch unterliegt die Albuminurie starken Schwankungen und hängt von Faktoren ab, wie körperliche Belastung, Infektionen und Flüssigkeitszufuhr. Bei der funktionellen Untersuchung der Nieren wurden die 24h-Urine der Versuchstiere, zu verschiedenen Zeiten, innerhalb des Protokolls, gesammelt. Im Urin wurden dann Albumin und Kreatinin bestimmt um die Albuminurie und den Albumin-Kreatinin-Quotient zu errechnen. Bei unseren Versuchstieren entwickelten alle Tiere, die mit DOCA behandelt wurden eine Albuminurie und einen erhöhten Albumin-Kreatinin-Quotient, verglichen zu den Tieren aus der Kontrollgruppe. Jedoch war die Höhe der Albuminurie und des Albumin-Kreatinin-Quotienten bei den Wildtypmäusen signifikant höher als bei den Gas6^{-/-} Mäusen. Diese Ergebnisse deuten auf einen größeren glomerulären Schaden der Mäuse mit Gas6 im Gegensatz zu den Mäusen ohne Gas6 hin. Unsere Ergebnisse zeigen eine ursächliche Beteiligung von Gas6 an der Vermittlung eines Aldosteron-induzierten Endorgenschadens. Ähnliche Ergebnisse erhielten wir bei der morphologischen Untersuchung der Nieren. Ursache einer eingeschränkten Nierenfunktion ist der Gewebeumbau infolge einer chronischen Entzündung. Verantwortlich hierfür sind u.a. erhöhte Spiegel von Aldosteron im Blut. Dies führt zu erhöhten Blutdrücken und damit zur Hyperfiltration und anschließender Proteinurie. Diese und die profibrotischen Eigenschaften von Aldosteron verursachen Prozessen im Rahmen von Inflammation und Fibrose.[4]

Als Nachweis für Vorgänge im Rahmen von Inflammation und einer Proliferation von Bindegewebe im Sinne eines Remodelings wurden die geschädigten Nieren mikroskopisch untersucht.

Zunächst wurden Schnitte des Nierengewebes konventionell nach dem Protokoll von Masson-Goldner angefärbt. Hierbei kann man vor allem Bindegewebe und Zellen nachweisen. Bei den Präparaten der Gas6^{+/+} konnten wir eine signifikant vermehrte Bildung von Bindegewebe an den Glomeruli, im Sinne einer Glomerulosklerose, aber auch perivaskulär nachweisen. Zudem sahen wir eine erhöhte Zellularität, die auf ein vermehrtes Einwandern von Zellen des Immunsystems hinweisen. Die Tubuli erschienen atrophiert und hyalinisiert. Die Versuchstiere, die einen Knockout für Gas6 hatten wiesen die o.g. Veränderungen signifikant weniger auf.

Als Marker für die Entzündung wurde nach Hinweisen für eine vermehrte Expression von TNF α gesucht. Dies wurde mit Hilfe einer immunhistochemischen Anfärbung untersucht. Im Vergleich zu den Wildtypmäusen zeigten die Knockoutmäuse eine vermindert Expression dieses Proteins. Zu demselben Ergebnis kamen wir bei dem Nachweis von Kollagen IV als Fibrosemarker in den Nierenuntersuchungen.

Zusammenfassend konnten wir an den Nieren zeigen, dass die Mäuse, die kein Gas6 exprimierten weniger Zeichen von Entzündung und Remodeling aufweisen und auch eine geringere Funktionseinschränkung. Dies deutet darauf hin, dass die Gas6-Knockoutmäuse vor einem aldosteroninduzierten Nierenschaden geschützt sind und dass Gas6 beteiligt ist an der Entstehung an einer renalen Schädigung durch Aldosteron.

Hinweise darauf, dass Entzündungsvorgänge in den Nieren bei akuten Nephritiden im Zusammenhang mit einer vermehrter Gas6-Expression stehen, konnten schon verschiedene andere Arbeitsgruppen zeigen. Jedoch war die Genese der akuten Entzündungen sehr unterschiedlich. Yanagita et al. provozierten in einem Tiermodell mit Ratten eine Mesangialzell-proliferative Glomerulonephritis mit Hilfe eines Antikörpers. Morphologisches Merkmal hierfür ist eine vermehrte Bildung von Mesangialzellen. Daraufhin wurden die Nieren auf eine Expression von Gas6 und seines Rezeptors Axl untersucht. Beides konnte nachgewiesen werden. Um dann zu untersuchen, ob die Abwesenheit von Gas6 eine Proliferation der glomerulären Mesangialzellen verhindert, bekam eine zweite Gruppe von Ratten den Vitamin-K-Antagonisten Warfarin. In der anschließenden mikroskopischen Untersuchung konnte eine Hemmung der übermäßigen Produktion von Mesangialzellen nachgewiesen werden. [102-103] Nagai et al. untersuchten den Zusammenhang

zwischen der diabetischen Nephropathie und der Gas6-Expression in der Pathogenese. Ähnlich wie bei Yanagita et al. wurde eine diabetische Nephropathie bei Ratten mit Hilfe von Streptozotocin induziert. Auch bei diesem Krankheitsbild ist eine übermäßige Proliferation von Mesangialzellen typisch. Die Arbeitsgruppe konnte immunhistochemisch eine vermehrte Expression von Gas6 und Axl feststellen. Zudem wurde in Nierenfunktionsuntersuchungen festgestellt, dass die im Rahmen der diabetischen Nephropathie aufgetretene Albuminurie und Hyperfiltration durch die Gabe von Warfarin gesenkt werden konnte. In einem zweiten Schritt wurde in Gas6-Knockout-Mäusen und in Wildtypmäusen eine diabetische Nephropathie hervorgerufen. Bei der Untersuchung der Nieren konnte eine signifikant geringe Mesangialzellproliferation nachgewiesen werden. [105] Ebenso konnte ein Zusammenhang zwischen akuten renalen Entzündungen in den Nieren, verschiedener Genese und der vermehrten Expression von Gas6 an humanem Nierengewebe festgestellt werden. Beispiele hierfür sind die akute Transplantatabstoßung, die IgA-Nephropathie und die Lupus-Nephritis. [108] Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass Gas6 möglicherweise eine Rolle spielt bei der Entstehung von renalen Endorganschäden aufgrund einer Überstimulation mit Aldosteron.

4.2 Diskussion der Funktion und Morphologie des Herzens

Bei der Untersuchung des Herzens als Endorgan bei der Entstehung des aldosteroninduzierten Endorganschadens, wurden morphologische und funktionelle Aspekte des Herzens untersucht. Kardiale Hypertrophie ist ein frühes Zeichen für eine beginnende Belastung des Herzens infolge von Hochdruckbelastung und der Aktivierung des RAAS. Es wurde zunächst das Verhältnis des Herzgewichtes zum Körpergewicht, korrigiert mit der Schienbeinlänge der Tiere als einfacher makroskopischer Marker für eine Hypertrophie des Herzens betrachtet. Wir konnten hierbei feststellen, dass der sog. Heart/Body Index bei den Mäusen mit einer Gas6-Expression signifikant höher ausfiel. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde die linksventrikuläre Masse echokardiographisch bestimmt. Auch hier konnten wir auf eine Herzhypertrophie bei den Wildtypmäusen schließen.

Als Ursache für eine erhöhte Herzmasse kommt neben der Hypertrophie der Kardiomyozyten auch der fibrotische Umbau von Herzmuskelgewebe im Zusammenhang mit einer Aktivierung von Entzündungsmechanismen in Betracht. Deshalb untersuchten wir die Herzen unserer Versuchstiere histologisch auf Zeichen hierfür. Fibronectin und Interleukin 6 stellen Marker für ebendiese Prozesse dar. Interleukin 6 nimmt im systemischen Entzündungssystem eine Schlüsselrolle ein.[115] Es ist an der Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Granulozyten, T- und B-Lymphozyten beteiligt. Das Glykoprotein Fibronectin ist ein wichtiger Bestandteil der Gewebereparatur und tritt in Interaktion mit Keratinozyten, Fibroblasten und Zellen des Immunsystems. Analog zu der erhöhten Herzmasse der Mäuse, die Gas6 exprimierten konnten wir hier auch eine vermehrte Expression von Fibronectin und Interleukin 6 histologisch feststellen. Obwohl der direkte Zusammenhang von Gas6 mit kardialen Remodelingprozessen bisher noch nicht untersucht wurde, geben zahlreiche Arbeitsgruppen Hinweise darauf, dass Gas6 ein Teil sein könnte bei der Entwicklung des kardialen Endorganschaden, induziert durch das Aldosteron.

Korshunov et al. beschäftigen sich seit langem mit dem Tyrosinkinase-Rezeptor Axl und seiner Rolle bei der endothelialen Dysfunktion, unter anderem bei einem Tiermodell mit DOCA-induzierter Hypertonie und den entsprechenden Endorganschäden. Diese Gruppe konnte zeigen, dass Axl beteiligt ist am vaskulären Remodeling. [88] Unsere Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eine Stimulation von

glatten Gefäßmuskelzellen zu einer verstärkten Expression von Gas6 führt. [110] Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Melaragno et al. In Zellkulturversuchen konnten antiapoptotische Effekte von Gas6 bei glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt werden. In Tierversuchen beobachtete man eine Beteiligung von Axl und Gas6 bei der Neointimaformation nach Ballonkatheterbehandlung von Ratten Karotiden. [80, 116] Tjwa et al. untersuchten die Rolle von Gas6 bei der Aktivierung von Endothelzellen und bei der Interaktion zwischen Endothelzellen, Thrombozyten und Leukozyten im Rahmen von inflammatorischen Vorgängen an $gas6^{-/-}$ Mäusen. Dabei konnte die Arbeitsgruppe feststellen, dass Endothelzellen Gas6 freisetzen und dass Gas6 wiederum Endothelzellen aktiviert, zu Thrombozytenaggregation führt und die Leukozytenextravasation im Rahmen von Entzündungen fördert. Im Rahmen dieser Versuche führte Gas6 zur Entwicklung einer Vaskulitis und sogar zu Abstoßungsreaktionen bei transplantierten Herzen. [93] Bei der Entwicklung von Atherosklerose und bei der Stabilität von atherosklerotischen Plaques wurde ebenfalls Gas6 als beteiligtes Protein identifiziert. So wurde festgestellt, dass Gas6 in allen atherosklerotischen Bereichen, egal in welchem Stadium, sowohl bei Mäusen als auch im humanen Gewebe exprimiert wird. Das ist vor allem in makrophagenreichen Regionen besonders ausgeprägt. Jedoch führte die Abwesenheit von Gas6 zu einer größeren Stabilität der atherosklerotischen Plaques. [90] Alle eben genannten pathophysiologischen Vorgänge sind Bestandteile für die Entwicklung vom kardiovaskulären Endorganschaden. Und bei vielen Zwischenprozessen scheinen die Rezeptortyrosinkinase Axl und sein Ligand Gas6 eine Rolle zu spielen. So verwundert es nicht, dass wir zeigen konnten, dass Gas6 im Tierversuch involviert ist in die Entwicklung des kardiovaskulären Endorganschadens. Wir haben eine ursächliche Beteiligung insbesondere gezeigt bei der Entwicklung einer Herzhypertrophie sowie der in diesem Zusammenhang stehenden entzündlichen und fibrotischen Veränderung des Herzens. Dies geschah infolge einer Belastung der Versuchstiere mit DOCA. Es ist also von einer aldosteroninduzierten Schädigung auszugehen.

Im Rahmen der echokardiographischen Untersuchungen der Versuchstiere, wurde die Ejektionsfraktion als Zeichen der Pumpfunktion gemessen bzw. errechnet. Entgegen unserer Annahmen hatten die $gas6^{+/+}$ Mäuse eine höhere EF als die $gas6^{-/-}$

Mäuse. Zudem war die EF der Wildtypmäuse sogar höher als bei den Mäusen aus der Kontrollgruppe. Jedoch muss man diese Ergebnisse kritisch betrachten. Zum einen ist die Ejektionsfraktion ein Parameter, der großen Schwankungen unterliegt. So waren die Werte sehr inhomogen. Zudem war die Tierzahl in den Fallgruppen sehr klein, so dass Schwankungen zu ganz verschiedenen Ergebnissen führen. Des Weiteren stellt eine eingeschränkte Pumpfunktion eine kardiale Dysfunktion dar, die sich erst im späteren Stadium der Entwicklung eines kardialen Endorganschadens entwickelt. So dass man möglicherweise bei einer Versuchsdauer von sechs Wochen nicht mit einer signifikant eingeschränkten Pumpfunktion rechnen kann. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie für eine einstweilige Erhöhung des Schlagvolumens verantwortlich ist. Eine Ursache für eine Hypertrophie am Herzen ist die Hypertrophie der Kardiomyozyten. Dies geschieht kompensatorisch, um einer Verminderung des Schlagvolumens am Herzen vorzubeugen.[117-119] Möglicherweise wurden die Versuchstiere gerade zu diesem Zeitpunkt mittels Echokardiographie untersucht, noch bevor die EF wieder abfällt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass wir eine Beteiligung von Gas6 bei der Entstehung einer kardialen Hypertrophie sowie bei der Entwicklung von inflammatorischen und fibrotischen Umbauprozessen im Rahmen eines aldosteroninduzierten Endorganschadens zeigen konnten.

Unsere Untersuchungen betrachteten vor allem die morphologischen und funktionellen Aspekte bei der Entstehung von kardialen und renalen Schäden nach einer Belastung mit Aldosteron im Zusammenhang mit Gas6. Vor allem bei der Untersuchung der Beteiligung von Gas6 an der Entwicklung von kardialen Schäden haben wir nur kleine Schritte gemacht und es wäre von Interesse die Untersuchungen zu vertiefen. Da Aldosteron eine Rolle spielt beim Remodeling nach Myokardinfarkt [32], wäre ebenfalls die Beteiligung von Gas6 zu erwarten. Möglich wären Versuche an einem Infarktmodell an gas6-Knockout-Mäusen. Man könnte dann ebenfalls morphologische und funktionelle Parameter messen. Eine andere Variante wäre die Gabe eines Vitamin K-Antagonisten während Myokardinfarktversuche am Tiermodell. In der Zellkultur könnte man dann die Kardiomyozyten isolieren und Gas6 bzw. Axl immunhistochemisch nachweisen. Des Weiteren fehlen noch Untersuchungen über die Beteiligung von Gas6 an der

Hypertrophie der Kardiomyozyten. Dabei könnte man eine Hypertrophie im Tiermodell erzeugen, z.B. durch eine chronische Belastung mit Aldosteron oder Angiotensin II. Dann könnte man ebenfalls die Kardiomyozyten isolieren und in der Zellkultur untersuchen. Ebenso wäre es interessant, die Rolle von Gas6 bei der manifesten chronischen Herzinsuffizienz zu untersuchen. Bei allen Vorgängen sind zudem die molekularen Prozesse noch zu ungenügend geklärt.

4.3 Ausblick

Zusammenfassend hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass Aldosteron eine große Bedeutung bei der Entstehung von kardiovaskulären Endorganschäden hat. So ist es Anliegen einiger klinischer Studien, die medikamentöse Reduktion des Aldosteronspiegels als Therapiekonzept anzuwenden. Zurzeit stehen jedoch lediglich MR-Blocker als einzige Therapieoption zur Verfügung, welche mit einem gewissen Nebenwirkungsprofil verbunden sind, wie zum Beispiel eine Kaliumretention und damit verbunden eine erhöhte Hospitalisierungsrate. Somit ist der Einsatz dieser Wirkstoffe nur begrenzt möglich. Wir wollten die molekularen Mechanismen untersuchen, die zum Aldosteron bedingten renalen und kardiovaskulären Endorganschaden führen, um somit neue therapeutische Angriffspunkte, die innerhalb des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Signaltransduktionsweges liegen, zu identifizieren. Bereits andere Arbeitsgruppen konnten einen Zusammenhang von Gas6 zur Pathogenese von verschiedenen Erkrankungen, auch bei kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle spielen. Dieser Zusammenhang verdichtete sich durch Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe, da hier in Zellkulturuntersuchungen durch Ang II Gas6 bzw. Axl induziert werden konnte. Bereits andere Arbeitsgruppen haben weitere Wachstumsfaktoren identifizieren können, die ebenfalls Aldosteron-induzierte kardiovaskuläre und renale Schäden vermitteln. Dazu gehört z. B. Endothelin-1. Hier konnte u.a. die Arbeitsgruppe um E. Schiffrin im Tiermodell zeigen, dass Aldosteron über den Endothelin-1-Signaltransduktionsweg vaskuläre Fibrose und Inflammation verursacht. Die Behandlung mit dem Endothelin-Rezeptorblocker BMS 182874 sowie dem Mineralokortikoidrezeptorantagonisten Spironolacton konnten diesen Effekt signifikant minimieren. [120-122]

Meine Experimente an einem etablierten Tiermodell bestätigen, dass Gas6 ursächlich beteiligt ist an der Entwicklung eines aldosteroninduzierten Endorganschadens.

Somit könnte Gas6 möglicherweise als Ziel eines neuen Therapiekonzeptes in Betracht kommen. So wäre die Vitamin-K abhängige Bildung von Gas6 von pharmakologischem Interesse. Bereits in vielen Tierversuchen wurde Warfarin, als Vitamin-K-Antagonist, verwendet. Dabei konnten die pathogenen Effekte von Gas6 verhindert oder zumindest verbessert werden. Da die Vitamin-K-Antagonisierung jedoch ein erhebliches Blutungsrisiko mit sich trägt, muss sich zeigen, ob Patienten von diesem Konzept profitieren könnten. Hierbei wäre interessant, ob Patienten, die auf Grund anderer Erkrankungen bereits einen Vitamin-K-Antagonisten einnehmen, weniger renale und kardiovaskuläre Endorganschäden entwickeln.

5 Zusammenfassung

Growth arrest-specific protein 6 (Gas6) ist ein Vitamin-K-abhängiger Wachstumsfaktor, der der Apoptose entgegen wirkt, wichtig ist bei der Zelldifferenzierung und eine Rolle spielt bei Migration und Adhäsion im Rahmen von Entzündungsprozessen. Gas6 ist beteiligt an der Entstehung von inflammatorischen Nierenerkrankungen, dem vaskulären Remodeling sowie an der Thrombusformation. Gas6 ist Ligand einer Familie von Tyrosinkinaserzeptoren, zu der Axl, Sky und Mer gehören. In Versuchen an der Zellkultur konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Ang II als auch Aldosteron die Expression von Gas6 und seinem Rezeptor Axl stimulieren. Die Inkubation mit einem Mineralokortikoidrezeptorblocker verhinderte diese Expression. Da Aldosteron wesentlich beteiligt ist an der Entstehung von renokardiovaskulären Schäden, stellte sich uns die Frage, ob Gas6 an der Pathogenese beteiligt ist. Hierzu wurden die Ergebnisse der *in vitro* Versuche auf ein Tiermodell übertragen. Wir verwendeten Mäuse, die einen Knockout für Gas6 hatten und verglichen sie mit Wildtypmäusen. Beide Gruppen wurden uninephrectomiert und erhielten eine Therapie mit Deoxycorticosteron (DOCA) für 42 Tage. Hierbei handelt es sich um eine Synthesestufe von Aldosteron, welche ebenso an den Mineralokortikoidrezeptor (MR) bindet. Wir untersuchten telemetrisch den Blutdruck und stellten fest, dass beide Gruppen eine arterielle Hypertonie entwickelten. Echokardiographisch und makroskopisch fanden wir eine vermehrte Herzhypertrophie der Gas6^{+/+} Mäuse. In der mikroskopischen Auswertung der Herzen stellten wir eine vermehrte Expression von Interleukin 6 (IL 6) und Kollagen IV fest, was auf einen entzündlichen und fibrotischen Umbau des Herzens hindeutete. Die Nieren waren nach der DOCA-Therapie stark beeinträchtigt, was sich in einer ausgeprägten Albuminurie und einem erhöhten Albumin-Kreatinin-Quotienten (ACR) zeigte. Dabei waren die Nierenfunktionseinschränkungen bei den Gas6^{+/+} Mäusen signifikant stärker ausgeprägt. Histologisch zeigte sich ebenfalls ein Geweberemodelling, welches bei den Gas6^{-/-} Mäusen weniger ausgeprägt war als bei den Wildtypmäusen. Zusammenfassend konnten wir feststellen, dass Gas6 beteiligt ist an der Entstehung eines Aldosteron-/DOCA-induzierten Endorganschadens.

Dabei sind diese Effekte blutdruckunabhängig. Diese Ergebnisse geben Hinweise auf künftige Therapiemöglichkeiten, beispielsweise mit Vitamin-K-Antagonisten.

6 Literaturverzeichnis

Referenzen

1. Colombo, L., et al., *Aldosterone and the conquest of land*. J Endocrinol Invest, 2006. **29**(4): p. 373-9.
2. Bridgham, J.T., S.M. Carroll, and J.W. Thornton, *Evolution of hormone-receptor complexity by molecular exploitation*. Science, 2006. **312**(5770): p. 97-101.
3. Skeggs, L.T., et al., *The biochemistry of the renin-angiotensin system and its role in hypertension*. Am J Med, 1976. **60**(6): p. 737-48.
4. Brewster, U.C. and M.A. Perazella, *The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease*. Am J Med, 2004. **116**(4): p. 263-72.
5. Brewster, U.C., J.F. Setaro, and M.A. Perazella, *The renin-angiotensin-aldosterone system: cardiorenal effects and implications for renal and cardiovascular disease states*. Am J Med Sci, 2003. **326**(1): p. 15-24.
6. Lijnen, P. and V. Petrov, *Renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(5): p. 949-70.
7. Wollert, K.C. and H. Drexler, *The renin-angiotensin system and experimental heart failure*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(4): p. 838-49.
8. Wolf, G., *Angiotensin II as a mediator of tubulointerstitial injury*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15 Suppl 6**: p. 61-3.
9. Luft, F.C., *Proinflammatory effects of angiotensin II and endothelin: targets for progression of cardiovascular and renal diseases*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002. **11**(1): p. 59-66.
10. Brenner, B.M., et al., *Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy*. N Engl J Med, 2001. **345**(12): p. 861-9.
11. Maschio, G., et al., *Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group*. N Engl J Med, 1996. **334**(15): p. 939-45.
12. Maschio, G., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibitors and kidney protection: the AIPRI trial. The ACE Inhibition in Progressive Renal Insufficiency (AIPRI) Study Group*. J Cardiovasc Pharmacol, 1999. **33 Suppl 1**: p. S16-20; discussion S41-3.
13. Funder, J.W., *Aldosterone, mineralocorticoid receptors and vascular inflammation*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **217**(1-2): p. 263-9.
14. Lakkis, J., W.X. Lu, and M.R. Weir, *RAAS escape: a real clinical entity that may be important in the progression of cardiovascular and renal disease*. Curr Hypertens Rep, 2003. **5**(5): p. 408-17.
15. Funder, J.W., et al., *Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated*. Science, 1988. **242**(4878): p. 583-5.
16. White, P.C., T. Mune, and A.K. Agarwal, *11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess*. Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 135-56.
17. Edwards, C.R., et al., *Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor*. Lancet, 1988. **2**(8618): p. 986-9.
18. Rossier, B.C., *Mechanisms of action of mineralocorticoid hormones*. Endocr Res, 1989. **15**(1-2): p. 203-26.
19. Spach, C. and D.H. Streeten, *Retardation of Sodium Exchange in Dog Erythrocytes by Physiological Concentrations of Aldosterone, in Vitro*. J Clin Invest, 1964. **43**: p. 217-27.
20. Moura, A.M. and M. Worcel, *Direct action of aldosterone on transmembrane 22Na efflux from arterial smooth muscle. Rapid and delayed effects*. Hypertension, 1984. **6**(3): p. 425-30.

21. Wehling, M., J. Kasmayr, and K. Theisen, *Fast effects of aldosterone on electrolytes in human lymphocytes are mediated by the sodium-proton-exchanger of the cell membrane*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **164**(3): p. 961-7.
22. Funder, J.W., *The nongenomic actions of aldosterone*. *Endocr Rev*, 2005. **26**(3): p. 313-21.
23. Fujita, M., et al., *Aldosterone nongenomically worsens ischemia via protein kinase C-dependent pathways in hypoperfused canine hearts*. *Hypertension*, 2005. **46**(1): p. 113-7.
24. Grossmann, C. and M. Gekle, *New aspects of rapid aldosterone signaling*. *Mol Cell Endocrinol*, 2009. **308**(1-2): p. 53-62.
25. Chai, W., et al., *Nongenomic effects of aldosterone in the human heart: interaction with angiotensin II*. *Hypertension*, 2005. **46**(4): p. 701-6.
26. Mazak, I., et al., *Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells*. *Circulation*, 2004. **109**(22): p. 2792-800.
27. Chhokar, V.S., et al., *Hyperparathyroidism and the calcium paradox of aldosteronism*. *Circulation*, 2005. **111**(7): p. 871-8.
28. Vidal, A., et al., *Calcium paradox of aldosteronism and the role of the parathyroid glands*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(1): p. H286-94.
29. *Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators*. *N Engl J Med*, 1991. **325**(5): p. 293-302.
30. *Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group*. *N Engl J Med*, 1987. **316**(23): p. 1429-35.
31. Pfeffer, M.A., et al., *Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators*. *N Engl J Med*, 1992. **327**(10): p. 669-77.
32. Pitt, B., et al., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(14): p. 1309-21.
33. Pitt, B., et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(10): p. 709-17.
34. Ezekowitz, J.A. and F.A. McAlister, *Aldosterone blockade and left ventricular dysfunction: a systematic review of randomized clinical trials*. *Eur Heart J*, 2009. **30**(4): p. 469-77.
35. Rocha, R., et al., *Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart*. *Endocrinology*, 2002. **143**(12): p. 4828-36.
36. Struthers, A.D., *Aldosterone escape during ACE inhibitor therapy in chronic heart failure*. *Eur Heart J*, 1995. **16 Suppl N**: p. 103-6.
37. Rump, L.C., *Advantages of Ang II receptor blockade over ACE inhibition with respect to suppression of sympathetic activity: heartening news for the kidney?* *Nephrol Dial Transplant*, 1999. **14**(3): p. 556-9.
38. McKelvie, R.S., et al., *Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study. The RESOLVD Pilot Study Investigators*. *Circulation*, 1999. **100**(10): p. 1056-64.
39. Naruse, M., et al., *Aldosterone breakthrough during angiotensin II receptor antagonist therapy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. *Hypertension*, 2002. **40**(1): p. 28-33.
40. Takeda, R., et al., *Vascular complications in patients with aldosterone producing adenoma in Japan: comparative study with essential hypertension. The Research Committee of Disorders of Adrenal Hormones in Japan*. *J Endocrinol Invest*, 1995. **18**(5): p. 370-3.
41. Brilla, C.G., L.S. Matsubara, and K.T. Weber, *Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism*. *J Mol Cell Cardiol*, 1993. **25**(5): p. 563-75.
42. Sun, Y., et al., *Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress*. *Am J Pathol*, 2002. **161**(5): p. 1773-81.
43. Silvestre, J.S., et al., *Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis*. *Circulation*, 1999. **99**(20): p. 2694-701.

44. Satoh, M., et al., *Aldosterone synthase (CYP11B2) expression and myocardial fibrosis in the failing human heart*. Clin Sci (Lond), 2002. **102**(4): p. 381-6.
45. Mizuno, Y., et al., *Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans*. Circulation, 2001. **103**(1): p. 72-7.
46. Delyani, J.A., E.L. Robinson, and A.E. Rudolph, *Effect of a selective aldosterone receptor antagonist in myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(2): p. H647-54.
47. Suzuki, G., et al., *Effects of long-term monotherapy with eplerenone, a novel aldosterone blocker, on progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure*. Circulation, 2002. **106**(23): p. 2967-72.
48. Schafer, A., et al., *Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction*. Cardiovasc Res, 2003. **58**(3): p. 655-62.
49. Bauersachs, J., et al., *Addition of spironolactone to angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure improves endothelial vasomotor dysfunction: role of vascular superoxide anion formation and endothelial nitric oxide synthase expression*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(2): p. 351-8.
50. Schafer, A., et al., *Inhibition of platelet activation in congestive heart failure by aldosterone receptor antagonism and ACE inhibition*. Thromb Haemost, 2003. **89**(6): p. 1024-30.
51. Bauersachs, J., *Aldosterone antagonism in heart failure: improvement of cardiac remodelling, endothelial dysfunction and platelet activation*. Eur J Clin Invest, 2004. **34**(10): p. 649-52.
52. Mervaala, E., et al., *Blood pressure-independent effects in rats with human renin and angiotensinogen genes*. Hypertension, 2000. **35**(2): p. 587-94.
53. Luft, F.C., et al., *Hypertension-induced end-organ damage : A new transgenic approach to an old problem*. Hypertension, 1999. **33**(1 Pt 2): p. 212-8.
54. Fiebeler, A., et al., *Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in angiotensin II-induced cardiac injury*. Hypertension, 2001. **37**(2 Part 2): p. 787-93.
55. Wang, T.J., et al., *Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death*. N Engl J Med, 2006. **355**(25): p. 2631-9.
56. Conn, J.W., R.F. Knopf, and R.M. Nesbit, *Clinical Characteristics of Primary Aldosteronism from an Analysis of 145 Cases*. Am J Surg, 1964. **107**: p. 159-72.
57. Schjoedt, K.J., et al., *Beneficial impact of spironolactone on nephrotic range albuminuria in diabetic nephropathy*. Kidney Int, 2006. **70**(3): p. 536-42.
58. Bianchi, S., R. Bigazzi, and V.M. Campese, *Long-term effects of spironolactone on proteinuria and kidney function in patients with chronic kidney disease*. Kidney Int, 2006. **70**(12): p. 2116-23.
59. Nagase, M., et al., *Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker*. Hypertension, 2006. **47**(6): p. 1084-93.
60. Shibata, S., et al., *Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1*. Hypertension, 2007. **49**(2): p. 355-64.
61. Rocha, R. and C.T. Stier, Jr., *Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues*. Trends Endocrinol Metab, 2001. **12**(7): p. 308-14.
62. Hostetter, T.H., et al., *Aldosterone in renal disease*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001. **10**(1): p. 105-10.
63. Blasi, E.R., et al., *Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats*. Kidney Int, 2003. **63**(5): p. 1791-800.
64. Manfioletti, G., et al., *The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(8): p. 4976-85.
65. Yanagita, M., et al., *Mechanism of inhibitory effect of warfarin on mesangial cell proliferation*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(12): p. 2503-9.
66. Yanagita, M., *The role of the vitamin K-dependent growth factor Gas6 in glomerular pathophysiology*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2004. **13**(4): p. 465-70.
67. Gershagen, S., P. Fernlund, and A. Lundwall, *A cDNA coding for human sex hormone binding globulin. Homology to vitamin K-dependent protein S*. FEBS Lett, 1987. **220**(1): p. 129-35.

68. Mark, M.R., et al., *Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain-containing proteins, as a ligand for Rse and Axl*. J Biol Chem, 1996. **271**(16): p. 9785-9.
69. Yanagita, M., *Gas6, warfarin, and kidney diseases*. Clin Exp Nephrol, 2004. **8**(4): p. 304-9.
70. Nagata, K., et al., *Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases*. J Biol Chem, 1996. **271**(47): p. 30022-7.
71. O'Bryan, J.P., et al., *axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(10): p. 5016-31.
72. Ohashi, K., et al., *Cloning of the cDNA for a novel receptor tyrosine kinase, Sky, predominantly expressed in brain*. Oncogene, 1994. **9**(3): p. 699-705.
73. Crosier, P.S., et al., *The Dtk receptor tyrosine kinase, which binds protein S, is expressed during hematopoiesis*. Exp Hematol, 1996. **24**(2): p. 318-23.
74. Mark, M.R., et al., *rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain*. J Biol Chem, 1994. **269**(14): p. 10720-8.
75. Dai, W., et al., *Molecular cloning of a novel receptor tyrosine kinase, tif, highly expressed in human ovary and testis*. Oncogene, 1994. **9**(3): p. 975-9.
76. Graham, D.K., et al., *Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer*. Cell Growth Differ, 1994. **5**(6): p. 647-57.
77. Saxena, S.P., E.D. Israels, and L.G. Israels, *Novel vitamin K-dependent pathways regulating cell survival*. Apoptosis, 2001. **6**(1-2): p. 57-68.
78. McCloskey, P., et al., *GAS6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase Axl*. J Biol Chem, 1997. **272**(37): p. 23285-91.
79. Fantl, W.J., D.E. Johnson, and L.T. Williams, *Signalling by receptor tyrosine kinases*. Annu Rev Biochem, 1993. **62**: p. 453-81.
80. Melaragno, M.G., et al., *Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(4): p. 881-7.
81. Goruppi, S., E. Ruaro, and C. Schneider, *Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts*. Oncogene, 1996. **12**(3): p. 471-80.
82. Goruppi, S., et al., *Gas6-mediated survival in NIH3T3 cells activates stress signalling cascade and is independent of Ras*. Oncogene, 1999. **18**(29): p. 4224-36.
83. Nielsen-Preiss, S.M., et al., *Adhesion-related kinase induction of migration requires phosphatidylinositol-3-kinase and ras stimulation of rac activity in immortalized gonadotropin-releasing hormone neuronal cells*. Endocrinology, 2007. **148**(6): p. 2806-14.
84. Todt, J.C., B. Hu, and J.L. Curtis, *The receptor tyrosine kinase MerTK activates phospholipase C gamma2 during recognition of apoptotic thymocytes by murine macrophages*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(4): p. 705-13.
85. Cavet, M.E., et al., *Gas6-axl receptor signaling is regulated by glucose in vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(5): p. 886-91.
86. D'Arcangelo, D., C. Gaetano, and M.C. Capogrossi, *Acidification prevents endothelial cell apoptosis by Axl activation*. Circ Res, 2002. **91**(7): p. e4-12.
87. Korshunov, V.A. and B.C. Berk, *Smooth muscle apoptosis and vascular remodeling*. Curr Opin Hematol, 2008. **15**(3): p. 250-4.
88. Korshunov, V.A., et al., *Axl mediates vascular remodeling induced by deoxycorticosterone acetate-salt hypertension*. Hypertension, 2007. **50**(6): p. 1057-62.
89. Korshunov, V.A., et al., *Axl, a receptor tyrosine kinase, mediates flow-induced vascular remodeling*. Circ Res, 2006. **98**(11): p. 1446-52.
90. Lutgens, E., et al., *Genetic loss of Gas6 induces plaque stability in experimental atherosclerosis*. J Pathol, 2008. **216**(1): p. 55-63.
91. Munoz, X., et al., *Association of specific haplotypes of GAS6 gene with stroke*. Thromb Haemost, 2007. **98**(2): p. 406-12.
92. Munoz, X., et al., *Human vitamin K-dependent GAS6: gene structure, allelic variation, and association with stroke*. Hum Mutat, 2004. **23**(5): p. 506-12.
93. Tjwa, M., et al., *Gas6 promotes inflammation by enhancing interactions between endothelial cells, platelets, and leukocytes*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4096-105.
94. Angelillo-Scherrer, A., et al., *Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 215-21.

95. Borgel, D., et al., *Elevated growth-arrest-specific protein 6 plasma levels in patients with severe sepsis*. Crit Care Med, 2006. **34**(1): p. 219-22.
96. Gibot, S., et al., *Growth arrest-specific protein 6 plasma concentrations during septic shock*. Crit Care, 2007. **11**(1): p. R8.
97. Angelillo-Scherrer, A., et al., *Role of Gas6 in erythropoiesis and anemia in mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 583-96.
98. Maquoi, E., et al., *Role of Gas-6 in adipogenesis and nutritionally induced adipose tissue development in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(5): p. 1002-7.
99. Striker, L.J., et al., *The contribution of glomerular mesangial cells to progressive glomerulosclerosis*. Semin Nephrol, 1989. **9**(4): p. 318-28.
100. Floege, J. and R.J. Johnson, *Cytokines in renal inflammation*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 1993. **2**(3): p. 449-57.
101. Johnson, R.J., et al., *Role of platelet-derived growth factor in glomerular disease*. J Am Soc Nephrol, 1993. **4**(2): p. 119-28.
102. Yanagita, M., et al., *Gas6 regulates mesangial cell proliferation through Axl in experimental glomerulonephritis*. Am J Pathol, 2001. **158**(4): p. 1423-32.
103. Yanagita, M., et al., *Gas6 induces mesangial cell proliferation via latent transcription factor STAT3*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42364-9.
104. Yanagita, M., et al., *Essential role of Gas6 for glomerular injury in nephrotoxic nephritis*. J Clin Invest, 2002. **110**(2): p. 239-46.
105. Nagai, K., et al., *Growth arrest-specific gene 6 is involved in glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy*. J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 18229-34.
106. Yin, J.L., et al., *Expression of growth arrest-specific gene 6 and its receptors in dysfunctional human renal allografts*. Transpl Int, 2003. **16**(9): p. 681-8.
107. Yin, J.L., et al., *Expression of growth arrest-specific gene 6 and its receptors in a rat model of chronic renal transplant rejection*. Transplantation, 2002. **73**(4): p. 657-60.
108. Fiebeler, A., et al., *Growth arrest specific protein 6/Axl signaling in human inflammatory renal diseases*. Am J Kidney Dis, 2004. **43**(2): p. 286-95.
109. Stenhoff, J., B. Dahlback, and S. Hafizi, *Vitamin K-dependent Gas6 activates ERK kinase and stimulates growth of cardiac fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **319**(3): p. 871-8.
110. Park, J.K., et al., *Growth arrest specific protein 6 participates in DOCA-induced target-organ damage*. Hypertension, 2009. **54**(2): p. 359-64.
111. Taussky, H.H., *A microcolorimetric determination of creatine in urine by the Jaffe reaction*. J Biol Chem, 1954. **208**(2): p. 853-61.
112. Higuchi, R., et al., *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. Biotechnology (N Y), 1992. **10**(4): p. 413-7.
113. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(9): p. 1026-30.
114. Levey, A.S., et al., *National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification*. Ann Intern Med, 2003. **139**(2): p. 137-47.
115. Jones, S.A., *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3463-8.
116. Melaragno, M.G., et al., *Increased expression of Axl tyrosine kinase after vascular injury and regulation by G protein-coupled receptor agonists in rats*. Circ Res, 1998. **83**(7): p. 697-704.
117. Holtz, J., *[The significance of myocardial hypertrophy in heart failure]*. Z Kardiol, 1992. **81 Suppl 4**: p. 41-8.
118. Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 45-79.
119. van Empel, V.P. and L.J. De Windt, *Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(3): p. 487-99.
120. Muller, D.N., et al., *Effect of bosentan on NF-kappaB, inflammation, and tissue factor in angiotensin II-induced end-organ damage*. Hypertension, 2000. **36**(2): p. 282-90.
121. Park, J.B. and E.L. Schiffrin, *Cardiac and vascular fibrosis and hypertrophy in aldosterone-infused rats: role of endothelin-1*. Am J Hypertens, 2002. **15**(2 Pt 1): p. 164-9.

122. Pu, Q., et al., *Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling*. Hypertension, 2003. **42**(1): p. 49-55.

7 Abbildungen und Tabellen

- Abb. 1** Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System mit seinen Inhibitoren.
- Abb. 2** Schema zur Bildung von Aldosteron.
- Abb. 3** Wirkungen von Aldosteron und Einflüsse auf die Hormonfreisetzung
- Abb. 4** Schema für die Effekte von Aldosteron auf das kardiovaskuläre und renale System und seine Auswirkungen.
- Abb. 5** γ -Carboxylierung.
- Abb. 6** Schematische Darstellung von Protein Gas6.
- Abb. 7** Schematische Darstellung vom Tyrosinkinaserzeptor Axl.
- Abb. 8** Schema von möglichen Signaltransduktionswegen.
- Abb. 9** Gas6 -Expression in gesundem und kranken Nierengewebe.
- Abb. 10** Axl -Expression in gesundem und kranken Nierengewebe.
- Abb. 11** Im Protokoll 1 wurden die Mäuse uninephrectomiert und, nach einer Erholungspause von zwei Wochen, über 42 Tage mit DOCA behandelt.
- Abb. 13** Im Protokoll 2 wurden die Mäuse uninephrectomiert und, nach einer Erholungspause von zwei Wochen, über 42 Tage mit DOCA behandelt.
- Abb. 13** Telemetrie.
- Abb. 14** Schema einer Agarosegel-Elektrophorese.
- Abb. 15** Agarosegel zur Genotypisierung der Mäuse.
- Abb. 16** Entwicklung des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdruckes im Verlauf des Versuches.
- Abb. 17** Mittlerer arterieller Druck zu Versuchsbeginn, nach Uninephrectomie sowie nach Erreichen der stabilen Phase nach Behandlung mit DOCA.
- Abb. 18** Linksventrikuläre Masse.
- Abb. 19** Heart/Body Index.

- Abb. 20** Expression von Interleukin 6 im Herzgewebe.
- Abb. 21** Graphische Darstellung der Expression von Interleukin 6 im Herzgewebe.
- Abb. 22** Expression von Fibronectin im Herzgewebe.
- Abb. 23** Graphische Darstellung der Expression von Fibronectin im Herzgewebe.
- Abb. 24** Ejektionsfraktion.
- Abb. 25** Albuminurie nach Uninephrectomie und 39 Tagen DOCA-Behandlung.
- Abb. 26** Albumin-Kreatinin-Quotient nach Uninephrectomie und 39 Tage DOCA- Behandlung.
- Abb. 27** Färbung nach Maason-Goldner-Trichrom.
- Abb. 28** Expression vom TNF α im Nierengewebe.
- Abb. 29** Graphische Darstellung der Expression von TNF α im Nierengewebe.
- Abb. 32** Expression von Kollagen IV in der Niere.
- Abb. 31** Graphische Darstellung der Expression von Kollagen IV im Nierengewebe.
- Tab. 1** Werte der einzelnen Untersuchungsparameter am Herzen
- Tab. 2** Werte der einzelnen Untersuchungsparameter der Nieren

8 Abkürzungsverzeichnis

ACE	angiotensin converting enzyme
ACR	Albumin-Kreatinin-Quotient
AngII	Angiotensin II
AT1	Angiotensin II Rezeptor Typ 1
AT2	Angiotensin II Rezeptor Typ 2
DOCA	Deoxycorticosteron
dTGR	doppeltransgene Ratten
EF	Ejektionsfraktion
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Gas6	<i>growth arrest specific gene 6</i>
Gas6 ^{-/-}	Gas6-Knockout
Gas6 ^{+/+}	Gas6-Wildtyp
GN	Glomerulonephritis
HRE	<i>hormon responsive elements</i>
IL6	Interleukin 6
JAK	<i>Januskinase</i>
MAPKs	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MR	Mineralokortikoidrezeptor
NF _κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NNR	Nebennierenrinde
PCR	Polymerasekettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
SEM	Standardabweichung

STAT	<i>signaltransduction and activators of transcription factors</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor α
VSMC	vascular smooth muscles cells

9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Stefanie Theuer, geb. Wresche, versichere an Eides statt durch meine eigenständige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „**Die Rolle von growth arrest specific protein 6 beim Aldosteron induzierten Entorganschaden**“ selbständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stelle, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Stefanie Theuer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Growth Arrest Specific Protein 6 Participates in DOCA-Induced Target-Organ Damage

Stefanie Theuer*, Joon-Keun Park*, Torsten Kirsch, Carsten Lindschau, Uwe Klinge, Arnd Heuser, Ralph Plehm, Mihai Todiras, Peter Carmeliet, Hermann Haller, Friedrich C. Luft, Dominik N. Muller and Anette Fiebeler
Hypertension 2009;54;359-364; originally published online Jun 29, 2009;

*J.-K.P. and S.T. contributed equally to this study

Datum, Unterschrift Hochschullehrer

Unterschrift Doktorandin

10 Publikationen

Glucocorticoid-related signaling effects in vascular smooth muscle cells

Gergö A. Molnar, Carsten Lindschau, Galyna Dubrovskaya, Peter R. Mertens, Torsten Kirsch, Marcus Quinkler, Maik Gollasch, **Stefanie Wresche**, Friedrich C. Luft, Dominik N. Müller and Anette Fiebeler; Hypertension 2008;51:1372

Absence of circulating aldosterone attenuates foreign body reaction around surgical sutures.

Uwe Klinge, **Stefanie Theuer**, Ellen Krott, Anette Fiebeler;
Langenbecks Arch Surg. 2009 Mar 7

Growth arrest specific protein 6 participates in DOCA-induced target-organ damage

Stefanie Theuer*, Joon-Keun Park*, Torsten Kirsch, Carsten Lindschau, Uwe Klinge, Arnd Heuser, Ralph Plehm, Mihai Todiras, Peter Carmeliet, Hermann Haller, Friedrich C. Luft, Dominik N. Müller and Anette Fiebeler (*contributed equally); Hypertension 2009Aug;54(2):359-64

11 Danksagung

Ich möchte mich für das Thema und außerordentliche Betreuung und Unterstützung im wissenschaftlichen Denken und die geduldige Klärung von Problemen sowie die aufmunternden Gespräche bei Anette Fiebeler und Ralf Dechend bedanken. Dominik Müller möchte ich dafür danken, dass er mir mit wertvollen Hinweisen und manch anderer Sichtweise zur Seite stand. Desweiteren bedanke ich mich bei Friedrich Luft und Hermann Haller für die Möglichkeit, in dieser Arbeitsgruppe meine wissenschaftlichen Arbeiten durchführen zu können und diese zu publizieren. Bei Joon-Keun Park bedanke ich mich für die angenehme und freundliche Zusammenarbeit bei der Entstehung und Auswertung der Organschnitte. Für die herzliche Aufnahme, insbesondere am ersten Tag bedanke ich mich bei Mathilde Schmid. Gabi N'Diaye und May-Britt Köhler standen mir mit ihrer netten Art und außerordentlichen Hilfsbereitschaft bei der Tierzucht und den Tierversuchen zur Seite und haben mir oft lachende Stunden beschert. Für die umfassende Einführung in die molekularbiologischen Techniken und die Beantwortung meiner vielen Fragen bedanke ich mich bei Lydia Hering, Gergö Molnar, Sandra Feldt und Jana Czychi. Martin Taube und Arnd Heuser danke ich für die Durchführung der Echokardiographien. Ralph Plehm danke ich für die telemetrische Überwachung. Ich bedanke mich bei allen der Arbeitsgruppe für die angenehme Zusammenarbeit. Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Danke Jürgen, dass du mir immer zur Seite standest und oft mein Sprachrohr nach außen warst. Danke Mutti und Vati, dass ihr mir immer wieder einen Schubs gegeben habt und mir zudem eine Unterstützung bei der Betreuung von Friedrich ward. Danke Friedrich, dass du einfach da bist. Von deinem Mut und deiner Geduld kann man viel lernen.

12 Lebenslauf

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