

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie
des Universitätsklinikums Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

Eingereicht über das
Institut für Veterinär-Pathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

DIE ROLLE DES ENDOZYTOSEREZEPTORS MEGALIN (GP330) BEI DER PATHOGENESE PROGREDIENTER NEPHROPATHIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Meike Eimers
Tierärztin
aus Leer

Berlin 2008

Journal-Nr: 3273

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Leo Brunnberg

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Roland Rudolph

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Duska Dragun

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Barbara Kohn

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

endocytosis, receptors, kidney diseases, desoxycortone, hypertension, proteinuria, mice
glomerulus, sclerosis, histopathology, immunohistochemistry

Tag der Promotion: 6. April 2009

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1.	PROGREDIENTE NEPHROPATHIEN	3
2.1.1.	Die klinische Bedeutung progredienter Nephropathien	3
2.1.2.	Einteilung der Nephropathien	3
2.1.3.	Die hypertensive Nephropathie	7
2.1.3.1.	DOCA-hypertensive Nephropathie	7
2.1.4	Die Pathogenese progredienter Nephropathien	9
2.2.	MEGALIN.....	13
2.2.1.	Endozytose der Proteine in der proximalen Tubuluszelle.....	13
2.2.2.	Die Struktur von Megalin	15
2.2.3.	Das Funktionsspektrum von Megalin	17
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	23
3.1.	MATERIAL.....	23
3.1.1.	Chemikalien und Reagenzien.....	23
3.1.2.	Puffer und Lösungen	25
3.1.3.	Gele.....	26
3.1.4.	Oligodesoxyribonukleotide	26
3.1.6.	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	27
3.1.7.	Software	29
3.2.	METHODEN	29
3.2.1.	Das Tiermodell	29
3.2.1.1.	Verwendete Mausstämme und Zucht- und Haltungsbedingungen	29
3.2.1.1.1.	Generierung der nierenspezifisch Megalin-defizienten Mäuse	30
3.2.1.1.2	Geno- und Phänotypisierung.....	31
3.2.1.2.	Das Modell der DOCA-hypertensiven Nephropathie	32

3.2.1.3.	Organentnahme	34
3.2.1.4.	Monitoring der Nierenfunktion	34
3.2.2.	Albumin-ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbant assay)	35
3.2.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
3.2.4.	Histologie.....	36
3.2.5.	Immunhistologie	38
3.2.5.1.	Antigenfreilegung	38
3.2.5.2.	Blockierungsschritte	39
3.2.5.3.	Allgemeines immunhistologisches Färbeprotokoll.....	39
3.2.6.	Genexpressionsanalyse	40
3.2.6.1.	Isolierung von RNA aus dem Nierengewebe.....	40
3.2.6.2.	Reverse Transkription von RNA in cDNA.....	41
3.2.6.3.	Quantitative Real-Time Online PCR mit dem Lightcycler®	42
3.2.7.	Statistische Methoden	44
4.	ERGEBNISSE	46
4.1.	BLUTDRUCK.....	46
4.2.	KÖRPER-, NIEREN- UND HERZGEWICHT	48
4.3.	NIERENFUNKTIONSPARAMETER	51
4.3.1.	Serumkreatinin, -harnstoff, -natrium, -kalium und Kreatinin-Clearance	51
4.3.2.	Urin-, Natrium-, Kalium- und Albumin-Exkretion.....	55
4.4.	PATHOHISTOLOGISCHE ANALYSE	58
4.5.	IMMUNHISTOLOGIE	62
4.5.1.	MCP-1, F4-80 und CD3+.....	62
4.5.2.	Ki-67	68
4.6.	GENEXPRESSIONSANALYSE	71
4.6.1.	MCP-1-, TGF-β- und Kollagen III- mRNA.....	71
5.	DISKUSSION.....	74
5.1.	MEGALIN UND RENALE FIBROSE.....	75

5.2.	DIE NIERENSPEZIFISCH-MEGALIN-DEFIZIENTE-MAUS ALS TIERMODELL.....	75
5.3.	DIE DOCA-INDUZIERTER HYPERTENSIVE NEPHROPATHIE ALS MODELL DER CHRONISCH-PROGREDIENTEN NEPHROPATHIE.....	77
5.4.	MEGALIN-DEFIZIENZ REDUZIERT DEN NIERENFUNKTIONSVERLUST BEI CHRONISCH PROGREDIENTER NEPHROPATHIE	79
5.5.	MEGALIN-DEFIZIENZ HAT KEINEN EINFLUSS AUF DEN GLOMERULÄREN SCHÄDIGUNGSGRAD TROTZ AUSGEPRÄGTERER PROTEINURIE	80
5.6.	MEGALIN-DEFIZIENZ WIRKT PROTEKTIV UND ANTIINFLAMMATORISCH AUF DAS TUBULOINTERSTITIUM.....	81
5.7.	PERSPEKTIVEN UND MÖGLICHE THERAPEUTISCHE KONSEQUENZEN	83
6.	ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT	86
6.1.	ZUSAMMENFASSUNG	86
6.2.	ABSTRACT.....	88
7.	LITERATURVERZEICHNIS	90
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	99
	ANHANG.....	100
	DANKSAGUNG.....	100
	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	101

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Einteilung der Nephropathien nach den Ursachen der Proteinurie (nach Gerd Herold, Innere Medizin).....	4
Abb. 2:	Übersicht Einteilung der Nephropathien	6
Abb. 3:	Die Strukturformeln von Aldosteron und seinem Agonisten Desoxycorticosteron	7
Abb. 4:	Flussdiagramm Pathophysiologie des Verlaufs der Nephropathie nach Remuzzi	12
Abb. 5:	Flussdiagramm Pathophysiologie des Verlaufs der Nephropathie nach Kriz et al.(54).....	13
Abb. 6:	Prinzip der Endozytose in der proximalen Tubuluszelle.....	15
Abb. 7:	Strukturelle Darstellung der Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie nach Willnow et al. (64).....	17
Abb. 8:	Übersicht über die Megalin-Liganden	19
Abb. 9:	Nierengewebe eines Wildtyps und eines Megalin-Knockout-Tieres	22
Abb. 10:	Schematische Darstellung der Erzeugung des gewebsspezifischen Knockouts von Megalin.	31
Abb. 11:	Systolischer Blutdruck und MAP cre+ - und cre- -Tiere vor (=baseline) und nach Uninephrektomie und DOCA-Implantation im Versuchsverlauf über 6 Wochen..	47
Abb. 12:	Diastolischer Blutdruck und Herzfrequenz cre-positiver und cre- negativer-Tiere vor (=baseline) und nach Uninephrektomie und DOCA-Implantation im Versuchsverlauf über 6 Wochen.....	47
Abb. 13:	Körpergewichte im Versuchsverlauf über 6 Wochen nach Uninephrektomie und DOCA-Implantation. Dargestellt sind DOCA cre+ und cre- im Vergleich (A), Kontrollen cre+ und cre- im Vergleich (B), sowie cre-positive (C) und cre-negative (D) Kontrollen und DOCAs im Vergleich.....	49
Abb. 14:	Körpergewicht (KGW) und ratio von Nierengewicht (NGW) und KGW sowie von Herzgewicht (HGW) und KGW zum Zeitpunkt des Versuchsendes.. ..	50
Abb. 15:	Harnstoff- und Kreatininwerte im Serum in mg/dl bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes....	52
Abb. 16:	Kreatinin-Clearance in ml/min bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes.	53
Abb. 17:	Natrium- und Kaliumwerte im Serum in mmol/l bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes..	54
Abb. 18:	Albuminwerte im Serum in g/dl bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes.....	55
Abb. 19:	Urin-Exkretion in ml/24h vor (=baseline) und nach Uninephrektomie und DOCA-Implantation im Versuchsverlauf über 6 Wochen.	56

Abb. 20:	Natrium- und Kalium-Exkretion in mmol/24h im Urin cre-positiver und cre-negativer Tiere vor (=baseline) und nach Uninephrektomie und DOCA-Implantation im Verlauf über 6 Wochen.....	57
Abb. 21:	Albuminausscheidung im Urin in mg/24h. A: Cre-positive und cre-negative Tiere vor DOCA-Implantation und Uninephrektomie. B: Cre-positive und cre-negative Tiere vor und nach Uninephrektomie und DOCA-Implantation im Versuchsverlauf über 6 Wochen.....	58
Abb. 22:	PAS-Färbung von Nierengewebe. (A) Kontrolltier cre- ; (B) Kontrolltier cre+ ; (C) DOCA-Tier cre-; (D) DOCA-Tier cre+.....	59
Abb. 23:	Glomerulosklerosegrad, errechnet aus dem Anteil PAS-positiven Materials im Glomerulum.....	60
Abb. 24:	Tubulusdurchmesser bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt des Versuchs endes.....	60
Abb. 25:	PAS-Färbung von Herzgewebe. (A) Kontrolltier cre- ; (B) Kontrolltier cre+ ; (C) DOCA-Tier cre- ; (D) DOCA-Tier cre+.....	61
Abb. 26:	Immunhistologischer Nachweis von MCP-1-Expression in der Niere (A) eines cre-negativen und (B) eines cre-positiven Tieres nach 6 Wochen DOCA.	63
Abb. 27:	MCP-1-Expression in der Niere bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-und der Kontrollgruppe.....	64
Abb. 28:	Immunhistologischer Nachweis für Makrophagen per F4-80-Färbung am Kryoschnitt von Nierengewebe. (A) cre- negatives (B) cre- positives Tier nach 6 Wochen DOCA.....	65
Abb. 29:	F4-80-Expression in der Niere bei cre-negativen und cre-positiven Tieren der DOCA-Gruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes.....	66
Abb. 30:	Immunhistologischer Nachweis von T-Lymphozyten-Infiltration über CD3-Färbung in Nierengewebe. (A) cre-negatives (B) cre-positives Tier nach 6 Wochen DOCA.....	67
Abb. 31:	CD3-Expression in der Niere bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-Gruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes	68
Abb. 32:	Immunhistologischer Nachweis für proliferative Aktivität per Ki-67-Färbung in der Niere cre-negativer (A) und -positiver (B) Tiere nach 6 Wochen DOCA. 400-fache Vergrößerung.	69
Abb. 33:	Ki-67-Expression in der Niere bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-Gruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes.	70
Abb. 34:	Immunhistologischer Nachweis für proliferative Aktivität per Ki-67-Färbung im Herzgewebe cre-negativer (A) und -positiver (B) Tiere nach 6 Wochen DOCA. 400-fache Vergrößerung.....	70
Abb. 35:	MCP-1-mRNA-Expression in der Niere bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-Gruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes	71
Abb. 36:	TGF- β -mRNA-Expression in der Niere bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-Gruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes	72

Abb. 37: Collagen-III-mRNA-Expression in der Niere bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-Gruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes.....	73
---	----

1. EINLEITUNG

Progrediente Nephropathien sind charakterisiert durch langsamen Funktionsverlust, verbunden mit Proteinurie, arteriellem Hypertonus sowie morphologisch tubulointerstitiellen Veränderungen. Eine tubulointerstitielle Entzündungsreaktion mit nachfolgender Fibrose entwickelt sich in Regionen, in denen proximale Tubulusepithelien (PTCs) mit Proteinen aus dem glomerulären Filtrat überladen werden [1-4], unabhängig von der Natur der glomerulären Primärschädigung [5]. Weiterhin ist der Grad der Albuminurie einer der wichtigsten prognostischen Marker für Nierenerkrankungen wie die hypertensive und die diabetische Nephropathie, welche die häufigsten Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz beim Menschen darstellen [6]. Der Mechanismus, durch den die Proteinakkumulation in PTCs getriggert wird, ist unklar. PTCs mit vollentwickeltem Endozytose-Apparat stellen eine aktive Verbindung zwischen dem glomerulären Filtrat und dem Blut in der peritubulären Kapillare dar. Megalin (GP 330), ein Mitglied der LDL-Rezeptorfamilie, wird auf der apikalen Membranoberfläche der PTCs exprimiert und spielt eine zentrale Rolle in den Endozytosevorgängen, mit denen PTCs Substrate aus dem Primärharn rückresorbieren.

In der vorliegenden Arbeit soll die durch Megalin vermittelte Proteinrückresorption in proximalen Tubuluszellen als potentiell zentraler regulatorischer Mechanismus bei der Pathogenese und Progression von Nephropathien untersucht werden. Unsere Hypothese beinhaltet die Notwendigkeit einer Proteinüberladung der PTCs aus dem glomerulären Filtrat. Die Megalin-vermittelte Endozytose der Proteine und die Weiterverarbeitung durch den Endozytose-Apparat könnten grundlegende Voraussetzung für die nachfolgenden entzündlichen Signale, die zur interstitiellen Fibrose führen, sein. Eine Einschränkung der Protein-Endozytose könnte daher die physiologische Funktion erhalten und der tubulointerstitiellen Fibrose sowie dem Funktionsverlust entgegenwirken.

Thomas Willnow generierte eine Megalin-defiziente Knockout-Maus, welche eine niedermolekulare Proteinurie mit verminderter Rückresorption von Bindungsproteinen für lipophile Vitamine aufweist, wobei jedoch Studien zur Pathophysiologie durch eine hohe perinatale Mortalität limitiert wurden [7, 8]. Mittels eines induzierbaren Cre-Rekombinase/loxP-Systems konnte eine nierenspezifisch Megalin-defiziente Maus erzeugt werden, die eine niedermolekulare Proteinurie aufweist [9]. Dieses Cre-Rekombinase/loxP-System soll genutzt werden, um Chimären mit einem Megalin-Defekt der murinen Zelllinie C57/Black6 hinsichtlich der Protein-Rückresorption als krankheitslimitierenden Faktor zu untersuchen. Das beschriebene Modell bietet somit erstmalig die Möglichkeit, direkt zu untersuchen, ob

die Megalin-vermittelte Rückresorption vermehrt filtrierter Proteine tatsächlich zur gemeinsamen Endstrecke unterschiedlicher Nephropathien beiträgt.

Dazu werden die Megalin-defizienten Phänotypen und entsprechende cre-negative Kontrolltiere mit dem Modell einer progredienten Nephropathie, der durch ein 21-day-release Desoxycorticosterone-Salz (DOCA)-Implantat hervorgerufenen hypertensiven Nephropathie konfrontiert [10-13]. Wir erwarten molekulare Mechanismen, welche die Proteinurie mit der konsekutiven Entzündungsreaktion und der tubulointerstitiellen Fibrose verbinden, funktionell charakterisieren und dadurch neue Einsichten in die Pathogenese der progredienten Nephropathie gewinnen zu können. Daraus könnte sich eine Basis für die Entwicklung nierenspezifischer Megalin-Antagonisten ergeben, um die Entstehung bzw. Progression von Nephropathien zu inhibieren, trotz irreversiblen Verlust der glomerulären Permselectivität.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. PROGREDIENTE NEPHROPATHIEN

2.1.1. Die klinische Bedeutung progredienter Nephropathien

Die progrediente Nephropathie ist eine Erkrankung von weltweit gravierender Bedeutung [14]: analog zu den ihr vorwiegend zugrunde liegenden Erkrankungen Diabetes mellitus und der arteriellen Hypertonie zeichnet sich eine kontinuierlich steigende Inzidenz ab [15]. Mit dem Fortschreiten der Krankheit bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz sind ein hoher Verlust an Lebensqualität für den Patienten und erhebliche Kosten für das Gesundheitssystem verbunden. Laut „World Health Report 2002“ und des „Global Burden of Disease“ (GBD)-Projektes führen Nierenerkrankungen derzeit bei nahezu 850.000 Menschen jährlich zum Tode. Nierenerkrankungen sind damit die zwölftbedeutendste Todesursache. Bei diesen hohen Zahlen zu Häufigkeit und Verbreitung der chronischen Nierenerkrankungen ist noch nicht der Zusammenhang berücksichtigt, dass zum einen Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen Risikopatienten für Herz-Kreislauf- und zerebrovaskuläre Erkrankungen sind und eher an Herz-Kreislaferkrankungen sterben, als dass sie ein terminales Nierenversagen entwickeln. Weiterhin entstehen bei Patienten mit chronischen Herz-Kreislaferkrankungen im Laufe der Krankheit oft chronische Nierenerkrankungen. Laut GBD-Projekt sterben außerdem weltweit jährlich 895.000 Menschen an Diabetes mellitus. Zur Zeit sind 170 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt, nahezu 30 % davon leiden an diabetischer Nephropathie, und diese Folgeerkrankung des Diabetes erhöht das Mortalitätsrisiko noch einmal zusätzlich. Allein in Deutschland gibt es derzeit mehr als 45.000 dialysepflichtige Patienten. Laut Remuzzi ist der Grad der Beteiligung der chronischen Nephropathie an der Gesamtlast der Erkrankungen (Global burden of disease) sogar noch höher einzuschätzen als die vom GBD-Projekt angegebenen Zahlen [16]. Neue Therapieansätze zur Intervention gegen die Progression von Nephropathien könnten also einem umfangreichen Patientenkollektiv zugute kommen.

2.1.2. Einteilung der Nephropathien

Der Begriff der Nephropathie beinhaltet eine Reihe von Erkrankungen mit unterschiedlichen pathologischen Mechanismen und morphologischen Erscheinungen. Nephropathien werden zum einen bezugnehmend auf eine extrarenale Beteiligung als primäre bzw. als sekundäre Nephropathie eingeteilt. Eine Charakterisierung kann weiterhin nach klinischen Symptomen

wie z.B. Proteinurie, Ödem, Aszites, Polyurie, Azotämie, Urämie erfolgen. Bezüglich des Grades der Proteinurie, die vorliegt, wenn eine Ausscheidung von >150mg Eiweiß/24h oder eine Abweichung vom physiologischen Proteinurienmuster zu beobachten ist, kann auf die verschiedenen Ursachen geschlossen werden:

Proteinurie	Proteintyp	Vorkommen
30-300mg/d	<u>Albumin</u> (Mikroalbuminurie)	Frühphasen der diabetischen und der hypertensiven Nephropathie
bis 1,5g/d	Niedermolekulare Proteine Höhermolekulare Proteine	Tubulopathien geringe Glomerulopathien
1,5 bis 3,0g/d	Nieder-und höhermolekulare Proteine	Chronische Glomerulonephritiden, Transplantatniere, Nephrosklerose
>3,0g/d	Höhermolekulare Proteine	Nephrotisches Syndrom

Abb. 1: Einteilung der Nephropathien nach den Ursachen der Proteinurie

Weiterhin wird nach dem immunpathologischen Typ sowie nach dem Verlauf, ob progressiv (=progredient) oder nicht progressiv, eingeteilt. Je nach Lokalisation der Hauptveränderungen können die Nephropathien grundsätzlich in Glomerulopathien und Tubulopathien unterteilt werden. Glomeruläre und tubuläre Veränderungen können dabei auch gemeinsam auftreten, und häufig sind tubuläre Erscheinungen Folge einer primären Schädigung der Glomerula. Vor allem bei längerem Bestehen eines Entzündungsprozesses ist es schwierig oder sogar unmöglich festzustellen, welche Gebiete der Niere zuerst und am stärksten verändert wurden, d.h. die ursprüngliche Form der Nephritis zu bestimmen. Während ein entzündlicher Prozess der Niere als Nephritis bezeichnet wird, definierte Zollinger [17] die Nephrose als eine doppelseitige, nicht vaskuläre und nicht eindeutig entzündliche Nierenveränderung, die sich in lokalen Stoffwechselstörungen äußert. Die Nephrose äußert sich durch degenerative Veränderungen und/oder Speicherungen verschiedener Stoffe. Während man früher die Nephrosen als rein degenerative Nierenerkrankungen definierte, weiß man heute, dass die größte Zahl der Nephrosen im Sinne einer Speicherung zu verstehen sind. Dementsprechend geht nur ein Teil der Nephrosen mit auffallenden klinischen Symptomen wie akutem Nierenversagen oder nephrotischem Syndrom einher.

So kann die Amyloidnephrose in Form einer idiopathischen (primären) Amyloidose ausschließlich in der Niere lokalisiert sein oder im Rahmen einer generalisierten Form vom Typ AA vorkommen. Histologisch zeigt sich, dass Amyloid bevorzugt im Mesangium der Glomerula abgelagert wird. Als Folge der durch die Amyloideinlagerungen bedingten erhöhten glomerulären Durchlässigkeit kommt es zu starker Proteinurie und je nach Dauer zur Ausbildung des nephrotischen Syndroms [18]. Eine Polyurie und ein mangelhaftes Harnkonzentrierungsvermögen treten häufig infolge der sekundären tubulären Schädigung auf.

Von diesen nicht-entzündlichen Formen der Glomerulopathien, zu denen auch die diabetische Glomerulosklerose gehört, sind die entzündlichen, die Glomerulonephritiden, zu unterscheiden.

Glomerulonephritiden (GN) werden definiert als abakterielle, beide Nieren symmetrisch befallende Entzündungen der Nierenrinde mit primärem Befall der Glomeruli. Wahrscheinlich liegt allen Formen der Glomerulonephritis eine Immunpathogenese zugrunde. Die Nieren sind wegen ihrer funktionellen und anatomischen Besonderheiten mehr als jedes andere Organ für die Manifestation immunpathologischer Reaktionen prädestiniert. Zum einen werden in der glomerulären Basalmembran im Rahmen des Filtrationsprozesses häufig Antigen-Antikörper-Komplexe abgelagert und zum anderen ist die glomeruläre Basalmembran wegen ihres hohen Anteils an organspezifischem Antigen der direkte Angriffspunkt für mehr oder minder nierenspezifische antikörpervermittelte Immunreaktionen.

Pathogenetisch sind drei Mechanismen, die zur Glomerulonephritis führen können, von Bedeutung, wobei diese noch nicht alle beim Menschen auftretenden Varianten erklären. Die Immunkomplex-Glomerulonephritis, hervorgerufen durch zirkulierende Immunkomplexe, die in den Glomeruli präzipitiert werden, oder durch Immunkomplexe, die auf glomerulären Strukturen durch Wechselwirkung zwischen lokalen Antigenen und zirkulierenden Antikörpern entstehen. Die Immunkomplexe aktivieren sekundäre Schädigungsmechanismen und können mit dem Fluoreszenzmikroskop als granuläre Depots nachgewiesen werden. Die Antigene in zirkulierenden Immunkomplexen sind nicht Strukturbestandteile der Niere, sondern extrarenale Antigene, z.B. Nukleosomen-DNS bei Lupus erythematodes etc. Die gebildeten Immunkomplexe werden in der Niere präzipitiert, die lediglich als „Innocent Bystander“ fungiert. Andere Beispiele einer Immunkomplex-Glomerulonephritis sind para- und periinfektiöse Glomerulonephritiden durch z.B. Streptokokken- oder Malariainfektionen. Ein anderer Pathomechanismus liegt bei der Antibasalmembran-Antikörper-Glomerulonephritis vor, bei der von Plasmazellen Antikörper gebildet werden, die gegen Bestandteile

der kapillären Basalmembran gerichtet sind. Klinisches Beispiel hierfür ist das „Goodpasture-Syndrom“. Die beteiligten Mechanismen bei der Begleit-Glomerulonephritis bei Vaskulitiden sind im Detail noch nicht aufgeklärt; eine Schlüsselrolle spielen Antikörper, welche gegen Zielantigene in zytoplasmatischen Granula polymorphkerniger Leukozyten gerichtet sind, wie klinisch z.B bei der Wegener-Granulomatose zu beobachten.

Bei immunologischen Schädigungen kommt es zur Ablagerung von Immunkomplexen. Der Ort der Ablagerungen hängt dabei in erster Linie von deren Größe ab: Große Immunkomplexe dringen noch durch das Endothel, werden aber subendothelial abgefangen und von Mesangiumzellen phagozytiert (mesangiale GN); kleinere können durch die glomeruläre Basalmembran (membranöse GN) in den subepithelialen Bereich gelangen. Die Ablagerungen sind zusammen mit den anderen morphologischen Veränderungen für die nosologische Einordnung und prognostische Bewertung der verschiedenen Glomerulonephritiden von ausschlaggebender Bedeutung.

Abzugrenzen von den primär immunologisch bedingten Nephropathien ist die von uns untersuchte Hypertensive Nephropathie, als Form der Nephrosklerose bzw. Glomerulosklerose, die sekundär zu Entzündung und Vernarbung führt.

Glomerulopathien	
Amyloidnephrose	
Membranöse Glomerulonephritis (GN)	a) membranöse GN mit spikes b) membranöse Gn ohne spikes
Membranoproliferative GN	a) mit mesangialer Proliferation b) mit mesangialer Sklerosierung
Mesangial-proliferative GN	
Mesangial-sklerosierende GN	
Tubulo-interstitielle Nephropathien	
Tubulonephrosen	a) ischämisch b) toxisch c) Speicherungsnephrosen
interstitielle Nephritis	

Abb. 2: Übersicht Einteilung der Nephropathien

2.1.3. Die Hypertensive Nephropathie

2.1.3.1. DOCA-Hypertensive Nephropathie

Das DOCA-Salz-Modell zur Induktion einer hypertensiven Nephropathie bei der Ratte wurde erstmals 1943 von Selye et al. mit den einzelnen Stadien der Erkrankung beschrieben [19]. Es wurde später von der Ratte auf die Maus übertragen und ist mittlerweile ein etabliertes, vielfach verwendetes Bluthochdruck-Modell. Das Mineralocorticoid DOCA ist ein Aldosteron-Agonist (**Abbildung 3**), induziert über Stimulation der tubulären Na^+ -Reabsorption in Kombination mit der Gabe 1%iger NaCl-Trinklösung eine dauerhafte Erhöhung des Blutdrucks und führt innerhalb von wenigen Wochen zu einer ausgeprägten Albuminurie; histologisch finden sich bei DOCA-behandelten Tieren glomeruläre Sklerosen, tubuläre Proteineinschlüsse und Atrophien, sowie interstitielle Entzündung und Fibrose [12], [20], [21]. DOCA-Salz führt in Kombination mit einer Salz-Diät (in Form von 1%iger Kochsalzlösung als Trinklösung) zu einer salzabhängigen Form der Hypertonie bereits binnen 3 Wochen. DOCA steigert durch Aktivierung von Natrium- und Kalium-Kanälen sowie der Natrium-Kalium-ATPase an der luminalen Membran der Tubuluszellen die Natrium-Retention und Kalium-Sekretion [22], [21].

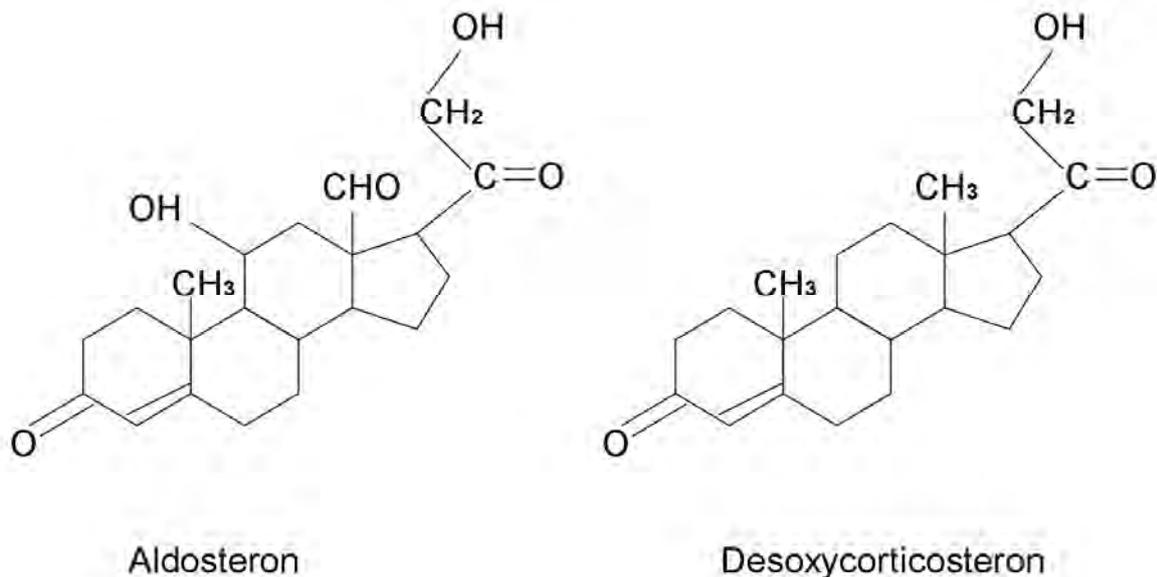


Abb. 3: Die Strukturformeln von Aldosteron und Desoxycorticosteron

Sekundär wird durch die vermehrte Retention von Natrium auch Wasser zurückgehalten [23], und es kommt schließlich zum Anstieg des Extrazellulärvolumens. Dies bewirkt eine Supprimierung des Renin-Angiotensin-Systems (RAAS) und hat damit eine hemmende Wirkung auf Durst und Salz-Appetit; die Folge ist eine Vasodilatation, NaCl- und Wasserausscheidung werden stimuliert. Durch gleichzeitige Gabe von 1%iger NaCl-Lösung als Trinkwasser im DOCA-Modell wird die Salz- und damit auch die Wasseraufnahme wieder gesteigert. Im Verlauf des Versuchs kommt es zu einer sich ständig steigenden Wasser- und Natriumaufnahme sowie Wasser-, Natrium- und Kalium-Exkretion, während Natrium- und Wasserretention sich ebenfalls weiter erhöhen und das Extrazellulärvolumen ansteigt. Dauerhafte Erhöhung des Blutdrucks und Hyperfiltration im Glomerulum resultieren dann in einer Schädigung des glomerulären Filters.

Ein Vorteil des gewählten Modells der DOCA-Nephropathie liegt im nichtimmunologischen Charakter der induzierten glomerulären Schädigung. Eine experimentelle Glomerulosklerose kann sowohl immunologisch als auch nicht immunologisch induziert werden. Als nicht immunologische Methoden wurden z. B. die Verabreichung von Aminonucleosiden [24], Protein-Overload-Modelle [25], [26], die partielle Nephrektomie [27], [28], die ADR-induzierte Nephropathie [29] und das Modell der DOCA-induzierten hypertensiven Nephropathie beschrieben. Die Schädigung des Glomerulums erfolgt bei der DOCA-induzierten hypertensiven Nephropathie ohne Beteiligung einer systemischen Immunreaktion. So kann die im Rahmen der Nephropathie entstandene renale Entzündungsreaktion nicht von einer systemischen immunologischen Reaktion als primärer Schädigung beeinflusst werden. Im Unterschied zu den anderen verfügbaren nichtimmunologischen Modellen eignet sich das DOCA-Modell besonders deshalb, weil der arterielle Hypertonus als häufigster pathophysiologischer Stimulus den Nierenschaden auslöst.

Der chronische Charakter des Modells ermöglicht die Untersuchung einer progredienten, mit persistierender Albuminurie verbundenen Nierenschädigung mit begleitender Infiltration von inflammatorischen Zellen und der daraus resultierenden interstitiellen Fibrose. Innerhalb von 6-wöchiger Behandlung bildet sich ein umfangreicher glomerulärer und tubulointerstitieller Schaden. Während neuerdings das DOCA-Modell auch mit einer Dauer von 9 oder 12 Wochen angewandt wird [21], reichte für unsere Untersuchungen, aufgrund der nach diesem Zeitraum bereits erhaltenen Schädigungen der Niere, ein Beobachtungszeitraum von 6 Wochen, was auch die etablierteste Dauer in diesem Modell ist. Die DOCA-induzierte Nephropathie spiegelt den Verlauf glomerulärer und interstitieller Veränderungen bei chronisch proteinurischen Nierenerkrankungen beim Menschen sehr gut wider [20], [30].

2.1.4 Die Pathogenese progredienter Nephropathien

Proteinurische Glomerulopathien führen bei Mensch und Tier durch fortschreitende Zerstörung des Parenchyms zu terminalem Nierenversagen – unabhängig von der Ursache der primären Schädigung [6, 31].

Einer anfänglichen Schädigung der Niere folgt meist ein Absinken der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Dieses Absinken wird auf hämodynamische Veränderungen, verursacht durch den Verlust von Nephronen, zurückgeführt [32]. Bei Verminderung der Nierenmasse hypertrophieren die verbleibenden Nephrone, einhergehend mit einem Absinken des Widerstandes in den Arteriolen und einem Anstieg des glomerulären Plasmaflusses [33], [34]. Der Druck der afferenten Arteriolen sinkt dabei mehr als der der efferenten Arteriolen, wodurch der hydraulische Druck in den glomerulären Kapillaren steigt [35] und die Menge des Filtrats eines Nephrons steigt. Diese Veränderungen erhöhen so zwar die Kapazität der verbleibenden Nephrone und minimieren damit die Folgen des Verlusts von Nephronen bezüglich der Funktion, sind aber äußerst schädlich [36].

Eine mögliche Erklärung ist, dass der hohe glomeruläre Kapillardruck, vermittelt teilweise über Angiotensin II, den Radius der Poren in der glomerulären Membran vergrößert. Diese Vergrößerung der Poren beeinträchtigt die permselektive Funktion der Membran, so dass der Proteingehalt des glomerulären Filtrats ansteigt. Das wiederum hat ein Ansteigen der Endozytose von Proteinen durch die Zellen des tubulären Epithels zur Folge und letztlich einen nephrotoxischen Effekt. Damit hat sich ein „Teufelskreis“ ergeben: Hämodynamische Veränderungen, verursacht durch den Verlust von Nephronen, führen zu einer Proteinurie und haben damit wiederum den Verlust von weiteren Nephronen zur Folge [37].

Therapien, die solche adaptiven Veränderungen vermindern, vermindern das Absinken der GFR und die Zerstörung der Struktur. In Übereinstimmung mit dem Tierversuch zeigten klinische Beobachtungen von Patienten mit Insulin-abhängigem Diabetes, dass eine Senkung des systemischen Blutdrucks mit Antihypertensiva das Absinken der GFR deutlich vermindert [38, 39], wobei dieser Effekt abhängig ist von der Dauer der Behandlung [40]. Es besteht außerdem eine Korrelation von Proteinultrafiltration und dem Fortschreiten der Nierenschädigung: Je höher bei Diabetespatienten die Mikroalbuminurie war, umso schneller das Absinken der glomerulären Filtrationsrate [41]. Im Normalzustand werden nur gelöste Stoffe mit einer Größe $\leq 15\text{kDa}$ in den Primärharn filtriert, größere Moleküle bis zu 80kDa werden nur eingeschränkt filtriert. Diese auch Permselektivität genannte Filterwirkung wird teils mechanisch, vorwiegend durch die Basalmembran, teils durch die negative Ladung sowohl

von Endothelzellen als auch von Podozyten an der Basalmembranaußenseite, erreicht. In der gesunden Niere werden nur kleinste Mengen von Albumin in den Primärharn filtriert und der Großteil davon dann wieder von den proximalen Tubuluszellen resorbiert. Ladungsveränderungen der negativ geladenen Basalmembran oder Vergrößerung der Poren in der Membran können eine Erhöhung der ausfiltrierten Menge an Protein zur Folge haben [42]. Übermäßige Proteinausscheidung mit dem Urin ist ein Hauptmerkmal, welches auf glomeruläre Schäden hindeutet. Patienten, bei denen eine sogenannte Mikroalbuminurie vorliegt, also eine Ausscheidungsrate von 20-200µg Albumin/min im Urin oder ein Verhältnis Albumin/Creatinin >20mg/g, haben ein um 10- bis 20-fach höheres Risiko, an einer Nephropathie zu erkranken als Patienten mit Normalalbuminurie [43], [44], [45], [46]. Eine persistierende Mikroalbuminurie wird definiert durch einen Albumin/Creatinin-Quotienten von 30-299µg/mg in mindestens zwei Urinproben. Bei darüberliegenden Werten spricht man von einer Proteinurie.

Nierenbiopsien von Ratten mit Adriamycin-induzierter Nephrose [47] oder altersabhängiger Proteinurie [48] zeigten eine Akkumulation der gefilterten Proteine im Zytoplasma der proximalen Tubuluszellen, die Brüche in der Basalmembran und eine Extravasation ihrer Bestandteile ins Interstitium verursachten, gefolgt von Entzündungsreaktion und tubulointerstitiellen sowie glomerulären Veränderungen [49]. In Studien, bei denen Ratten wiederholt Albumin intravenös injiziert wurde, folgten in allen Fällen auf die glomeruläre Filtration des Albumin interstitielle Schäden und Fibrose [25]. Die Abfolge der Ereignisse und die Art der renalen Schädigung waren so gut wie identisch mit denen der Ratten mit toxisch- oder immunbedingter proteinurischer Nephropathie [47], was auf einen gemeinsamen Weg der Schädigung schließen lässt [37].

Gefilterte Proteine werden über die proximalen Tubuluszellen reabsorbiert; bei einer Überladung mit Protein reagieren diese mit einer Änderung ihres Phänotyps [37], [50].

Infolge tubulärer Proteinüberladung, kommt es zu einer vermehrten Expression verschiedener proinflammatorischer, inflammatorischer, profibrotischer und fibrotischer sowie proliferativer Marker [5], [51], [52], [53], [54].

Das Tubulusepithel ist organisiert aus durchgehend polarisierten Schichten mit hoch spezialisierten luminalen und basolateralen Kompartimenten. In der Zellkultur zeigt das Tubulusepithel, bei dem diese Polarisierung erhalten ist, eine Sekretion von hauptsächlich Endothelin-1, MCP-1 und RANTES, einem immunregulatorischen Zytokin mit chemotaktischen

Eigenschaften für Monozyten und T-Gedächtniszellen, in das basolaterale Kompartiment [55], [8], [56]. In vivo kann von einem ähnlichen Ablauf ausgegangen werden [37], und die Freisetzung der genannten Substanzen in das Interstitium könnte so die Migration von Makrophagen und T-Lymphozyten induzieren [57]. Im „remnant-kidney“-Modell bei der Ratte und bei Ratten mit Heymann's Nephritis wurde eine Endothelin-1-Ausscheidung im Urin sowie erhöhte Endothelin-mRNA im Gewebe, immunhistologisch das vermehrte Vorkommen von Endothelin-1 und außerdem Endothelin-1 in den ins Interstitium infiltrierten mononukleären Zellen nachgewiesen [58]. Bei Ratten mit durch Proteinüberladung hervorgerufener Proteinurie lässt sich ein erhöhtes MCP-1-mRNA-Vorkommen und erhöhtes Vorkommen von MCP-1 in den proximalen Tubuluszellen nachweisen [37, 59]. Ähnlich ist bei proteinurischen Mäusen auch vermehrt RANTES-mRNA zu finden [60], [61]. Diese interstitielle Akkumulation von Chemokinen, die Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten rekrutieren, führt zur Proliferation von Fibroblasten und der erhöhten Synthese extrazellulärer Matrix [37]. TGF- β beeinflusst die drei Mechanismen der Matrixexpansion (vermehrte Produktion, verminderter Abbau und verminderte Produktion vernetzender Proteine) und die Regulation der einzelnen Reaktion [17;18]. TGF- β induziert die Expression von Kollagen, Fibronectin und Proteoglykanen. Weiterhin konnte für den verminderten Abbau extrazellulärer Matrix gezeigt werden, dass TGF- β die Synthese von Proteasen inhibiert und Proteaseinhibitoren (z.B Plasminogen-Activator-Inhibitor 1 [PAI-1]) stimuliert und auch die Synthese steigert. Für den Einfluss auf die Produktion von vernetzenden Proteinen wurde gezeigt, dass TGF- β die Expression von Integrinen aus Zelloberflächen steigert. Durch diesen Prozess werden Zell-Matrixinteraktionen und Matrixvernetzungen möglich. Zusammenfassend kann gesagt werden, das Ausmaß der Fibrosierung korreliert direkt mit der Höhe des TGF- β -Spiegels [10;18].

In **Abbildung 4** ist die Gesamtheit der beschriebenen Vorgänge in der Übersicht als Flussdiagramm dargestellt:

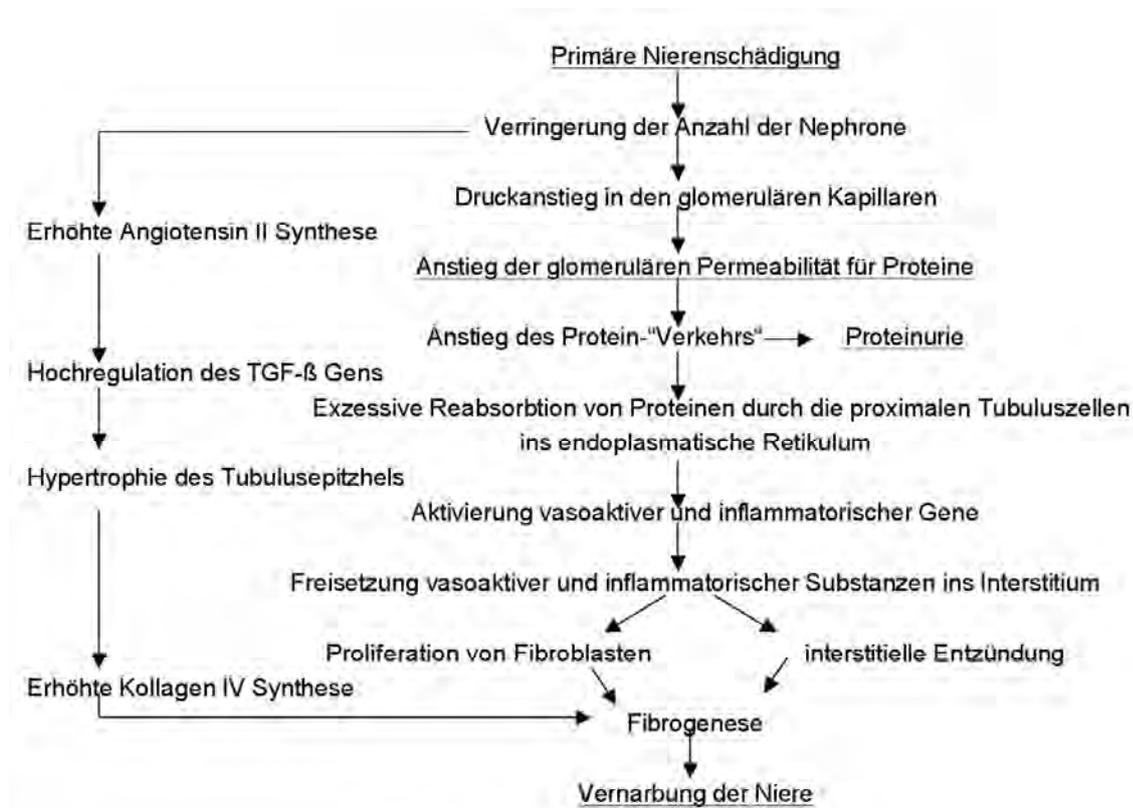


Abb. 4: Flussdiagramm Pathophysiologie des Verlaufs der Nephropathie nach Remuzzi: übermäßige Reabsorption von Proteinen als Folge erhöhter glomerulärer Permeabilität führt zu deren Akkumulation in den proximalen Tubuluszellen und induziert die Fibrogenese.

Neben der beschriebenen Proteinüberladung des Tubulusepithels, die über die Aktivierung vasoaktiver und inflammatorischer Substanzen zur Vernarbung und letztendlich zum Versagen der Niere führt, wird noch ein weiterer Weg für den Zusammenhang zwischen der glomerulären und der tubulären Schädigung diskutiert: dass es durch Schädigung des Podozyten zu einem Eindringen von Proteinablagerungen und proliferierten Zellen über glomerulotubuläre Verbindungen in das Tubulusepithel und so zu dessen Degeneration kommt [62]. Die einzelnen Vorgänge sind in **Abbildung 5** dargestellt.

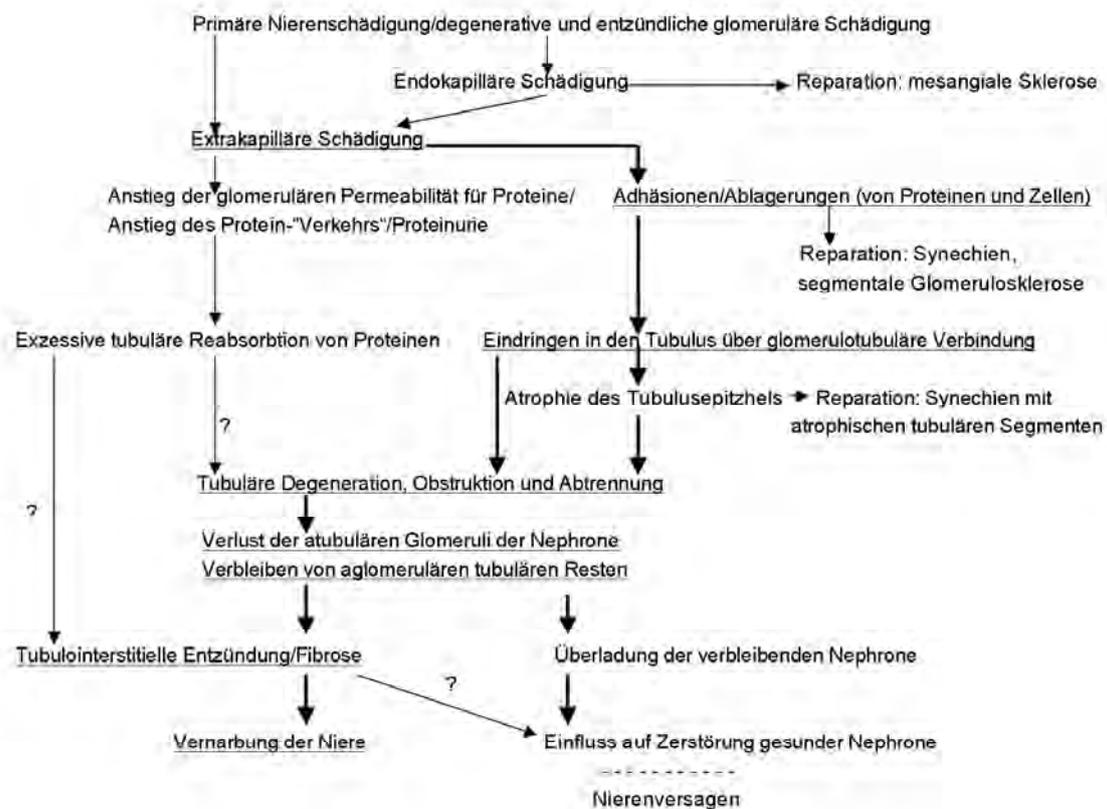


Abb. 5: Flussdiagramm Pathophysiologie des Verlaufs der Nephropathie nach Kriz [62]. Die Fragezeichen zeigen die von ihm in Frage gestellten Zusammenhänge auf. Der nach Kriz und LeHir direkteste Weg des Verlusts von Nephrone ist durch die stärkeren Pfeile markiert.

2.2. MEGALIN

2.2.1. Endozytose der Proteine in der proximalen Tubuluszelle

Zu den wesentlichen Funktionen der Niere gehören die Kontrolle der Salz- und Wasserausscheidung und damit die Konstanzhaltung von Volumen und Osmolalität des Extrazellulärraums sowie die ebenfalls damit verbundene Regulation des Säure-Basen-Haushaltes. Die Niere hat außerdem die Aufgabe der Eliminierung von Endprodukten des Stoffwechsels und von Fremdstoffen, einige Funktionen im Stoffwechsel wie Protein- und Peptidabbau, Glukoneogenese und Argininbildung und ist der Produktionsort von Hormonen wie Angiotensin II, Erythropoetin, Kalzitriol, Prostaglandinen.

Die funktionelle Einheit der Niere, das Nephron, setzt sich zusammen aus den (Malpighischen) Nieren-Körperchen, bestehend aus Bowmannscher Kapsel und Glomerulus, der

Henleschen Schleife und proximalem und distalem Tubulus. Die Niere des Menschen besitzt etwa 1 Million Nephrone, die bereits pränatal aus- und nach Zerstörung oder Verlust nicht nachgebildet werden können.

Nach Abfiltration des Primärharns im Glomerulus, wobei Proteine und Zellen zurückgehalten, während Wasser und alle sonstigen gelösten Stoffe in den Tubuluskanal aufgenommen werden, wird der größte Teil des Filtrats über den proximalen Tubulus wieder reabsorbiert. Das proximale Tubulusepithel zeigt in seiner Struktur deutliche Anpassungen an diese Aufgabe:

Die proximale Tubuluszelle besitzt lumenwärts einen hohen Bürstensaum (zum Zwecke der Vergrößerung der Zelloberfläche) und auf der blutwärts gerichteten, basolateralen Zellseite tiefe Einfaltungen (das basale Labyrinth, ebenfalls zur Vergrößerung der Zelloberfläche), die über parazelluläre „Lecks“ mit den „tight junctions“ in Verbindung stehen, über die der parazelluläre, passive Transport von Ionen und vermutlich auch von Wasser läuft. In der basalen Zellmembran ist außerdem die Na⁺/K⁺-ATPase lokalisiert und steht in engem Kontakt mit den zahlreichen und auffällig großen Mitochondrien. Dieser Mechanismus dominiert den transzellulären Transport. Der luminale Transporter des für den proximalen Tubulus spezifischen Na⁺-Eingangs ist der Na⁺/H⁺-Austauscher. Peptide und Proteine mit einer niedrigen molaren Masse unter 10 kDa werden an der Membran des Bürstensaums durch verschiedene Exopeptidasen gespalten und als Dipeptide oder Aminosäuren über Na⁺-abhängige Transportsysteme in die Zellen aufgenommen [63].

Neben den beschriebenen Transportvorgängen sticht ein lysosomales System, bekannt als der apikale vakuoläre Endozytoseapparat, hervor [64]. Die Reabsorption von Makromolekülen (Polypeptide und niedermolekulare Proteine ≥ 10 kDa wie Albumin (66 kDa)), die den glomerulären Filter passiert haben, findet ausschließlich im proximalen gewundenen und gestreckten Tubulus durch eine rezeptorvermittelte Endozytose statt.

Als rezeptorvermittelte Endozytose bezeichnet man einen Mechanismus, bei dem ein oder mehrere Liganden an Rezeptoren der Plasmamembran binden und anschließend selektiv in spezifischen Membrandomänen, den „clathrin-coated pits“, durch Plasmamembraninvagination in die Zelle aufgenommen werden [65, 66]. Die so gebildeten „clathrin coated vesicles“ verbinden sich nach Dissoziation des Clathrin-Gerüsts zu Endosomen, in denen eine Dissoziation der Rezeptor-Ligand-Komplexe erfolgt. Der aufgenommene Ligand unterliegt dabei im Lysosomen dem weiteren Abbau, während der Rezeptor durch spezifische

Vesikel (dense apical tubules) zur Plasmamembran rücktransportiert wird und im Sinne eines Rezeptorrecycling zur erneuten Bindung von Liganden zur Verfügung steht [66], [67]. Für die Bindung an den Rezeptor sind die Gesamtladung, die Konfiguration und die Verteilung der Ladung des Albuminmoleküls von Bedeutung, wobei Albumin-Kationen fünfmal mehr resorbiert werden als Anionen [68].

Auf der Suche nach den spezifischen Oberflächenrezeptoren in den Epithelzellen des proximalen Tubulus, die für die Bindung und endozytische Aufnahme von Proteinen, insbesondere von Albumin, und anderen Substanzen aus dem Ultrafiltrat verantwortlich sind, wurde Megalin/Glykoprotein 330 (GP330) identifiziert [66]. Der Vorgang der Proteinendozytose durch Megalin in der PTC ist in **Abbildung 6** dargestellt:

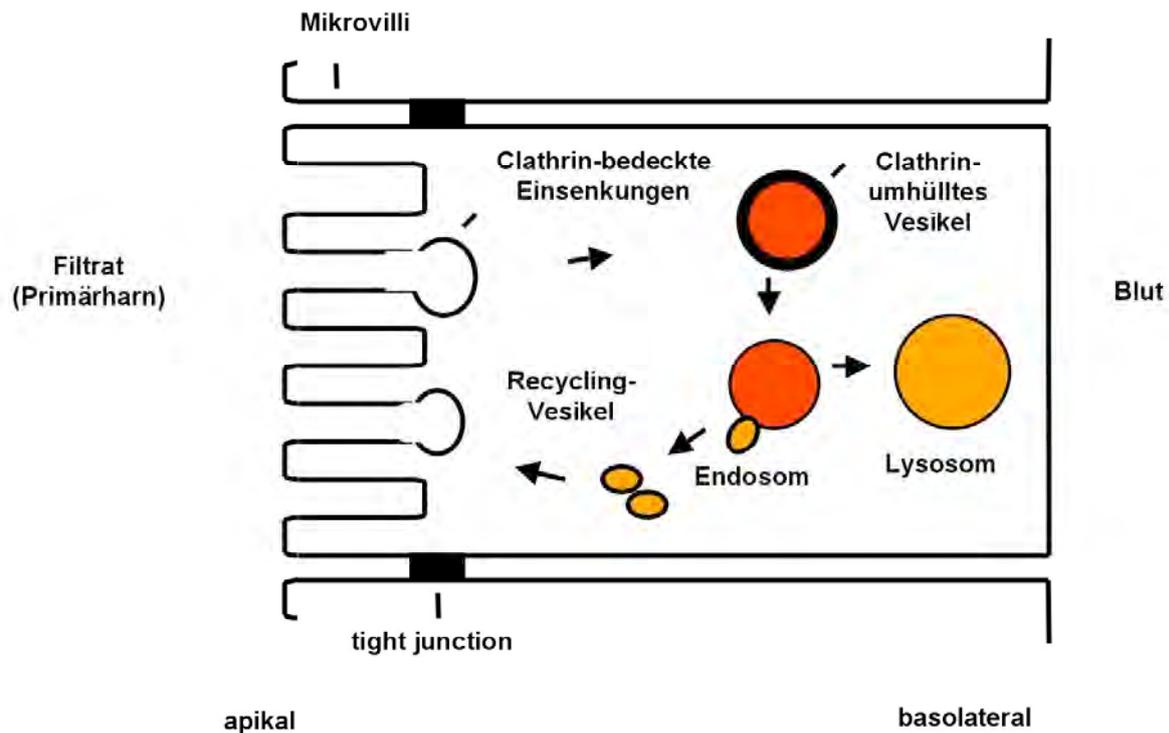


Abb. 6: Prinzip der Endozytose in der proximalen Tubuluszelle.

2.2.2. Die Struktur von Megalin

Megalin gehört zur Familie der LDL-Rezeptoren und stellt mit etwa 600 kDa das größte Mitglied der Familie dar. Die Zugehörigkeit zu dieser Rezeptorfamilie ergab sich durch Aufklärung der Primärstruktur mittels Klonierung der cDNA [69]. Die LDL-Rezeptorfamilie

wird von einer Gruppe endozytotischer Membranrezeptoren gebildet, die strukturell alle mit dem LDL-Rezeptor verwandt sind. Diese Rezeptorfamilie umfaßt bei den Säugetieren fünf bekannte Rezeptorproteine. Dazu gehören der Namensgeber der Familie, der LDL-Rezeptor (low-density lipoprotein receptor), der VLDL-Rezeptor (very low density lipoprotein receptor), ApoER2 (apolipoprotein ER2), LRP (LDL receptor related protein) und das mit einer Größe von etwa 600kDa größte Mitglied, Megalin, auch GP330 (epithelial glycoprotein 330) oder LRP-2 (LDL-receptor-related protein-2) genannt. Eine Übersicht der Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie ist in **Abbildung 7** dargestellt.

Alle diese Endozytoserezeptoren gehören zu den Membranproteinen der Klasse 1 und zeichnen sich durch große extrazelluläre N-terminale und kurze zytoplasmatische Domänen aus, die die Plasmamembran mit nur einer Transmembrandomäne durchspannen.

Bis zu 40 cysteinreiche LDLR-Klasse-A(LA)-Module (complement-type repeats), die auch als Ligandenbindungsdomänen bezeichnet werden und jeweils drei Disulfid-Brücken ausbilden können, bilden zusammen mit etwa genauso vielen epidermalen Wachstumsfaktor-Vorläufermodulen (EGF=epidermal growth factor like precursor repeats) mit ebenfalls drei Disulfid-Brücken und bis zu 50 Platzhalter-Modulen (spacer-repeats) mit einer F/YWXD-Aminosäuresequenz den extrazellulären Teil jedes Mitgliedes der LDL-Rezeptorfamilie.

Eine hydrophobe Transmembrandomäne und ein kurzer zytoplasmatischer Anteil, der wenigstens eine Aminosäuresequenz (NPxY) zur Sammlung der Rezeptoren an clathrin-bedeckten, zellulären Einsenkungen (coated pits) beinhaltet [70, 71], folgen. Abgesehen von diesem Teil gibt es im zytoplasmatischen Anteil kaum Homologien in der Aminosäuresequenz der Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie.

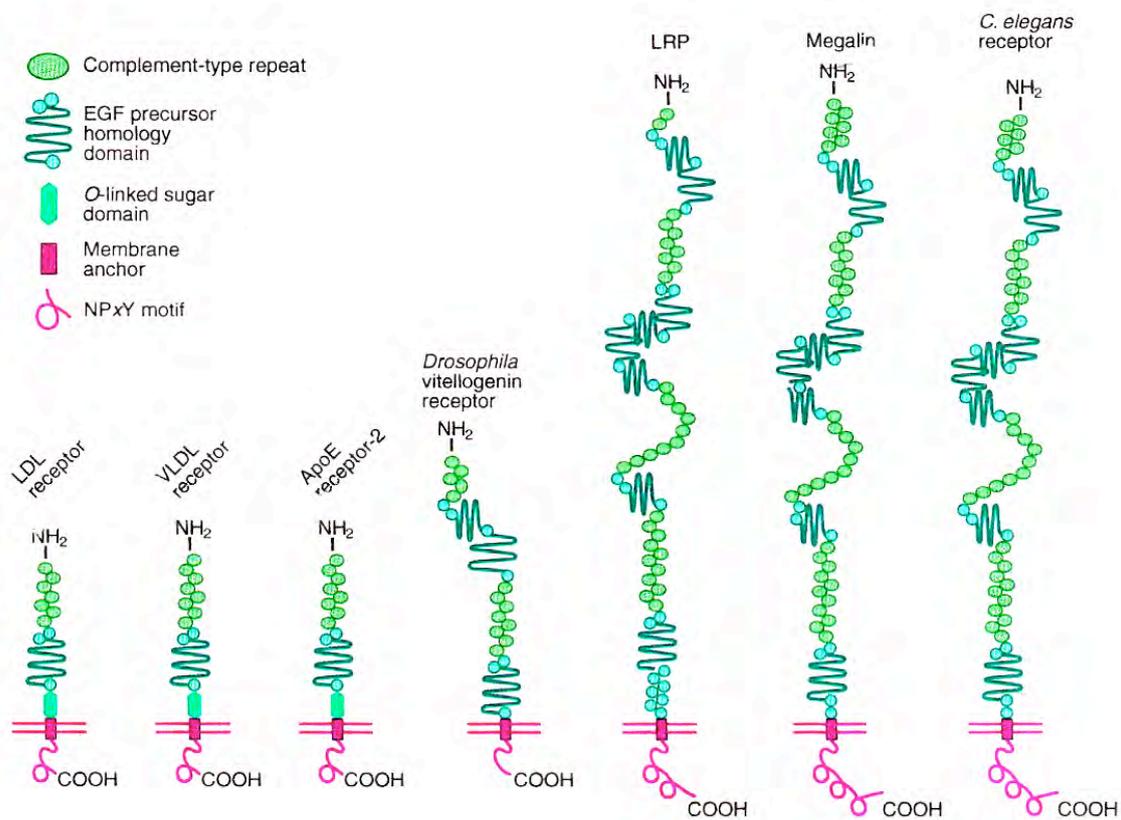


Abb. 7: Strukturelle Darstellung der Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie nach Willnow et al [72]. Über die Ligandenbindungsdomänen interagieren Liganden mit den Rezeptoren. Nicht dargestellt sind der kürzlich in *Drosophila melanogaster* entdeckte Rezeptor RME-2 = receptor-mediated-endocytosis und der der Familie assoziierte Rezeptor sorLA = sortilin protein related receptor containing LA repeats. Die epidermalen Wachstumsfaktor-Vorläufermodule (EGF) dienen der pH-abhängigen Dissoziation von Liganden und Rezeptoren in Endosomen. NPXY bezeichnet das Tetraamonsäuremotiv-Asparagin-Prolin-X-Tyrosin, welches die Rezeptoren in den clathrinbedeckten Einsenkungen (coated pits) aggregiert.

ApoE = Apolipoprotein E; *C. elegans* = *Caenorhabditis elegans*; LDL = low density lipoprotein, LRP = LDL receptor-related protein; VLDL = very low density lipoprotein.

2.2.3. Das Funktionsspektrum von Megalin

Megalin wurde erstmals als Antigen in den glomerulären Podozyten und im endozytotischen Apparat des proximalen Tubulus von Ratten mit einer induzierten membranösen Glomerulonephritis als das Heymann's-Nephritis-Antigen beschrieben [73, 74].

Zu den Liganden Megalins zählen hauptsächlich Proteine mit Carrier-Funktionen für Vitamine, Lipide und Hormone. Diese Ligandengruppe zeigt die große Bedeutung des Rezeptors hinsichtlich des Ernährungsaspekts auf. Andere durch Megalin gebundene Proteine wie

Albumin oder die leichten Ketten des Immunglobulins G reflektieren die generelle Funktion des Rezeptors bezüglich der Wiederaufnahme von Aminosäuren. Eine Bedeutung hinsichtlich der Ernährung hat diese Proteinaufnahme nur in der Niere und im Dottersack, wo der Rezeptor für eine sehr hohe Reabsorption von Proteinen zuständig ist. Enzyme, Enzym-Protein-Komplexe sowie Toxine stellen weitere Ligandengruppen dar [75]. Eine genaue Übersicht über alle Liganden ist in **Abbildung 8** aufgeführt:

Vitamin-carrier Komplexe	Transcobalamin-B12 Vitamin D-bindendes Protein, Vitamin D Retinol-bindendes Protein, Vitamin A
Lipid-bindende Proteine	Apo B Apo E Apo J/clusterin Apo H/_2-glycoprotein-I Apo (a)
Hormone/Hormon-bindende Proteine	PTH Transthyretin Thyroglobulin Insulin
Medikamente	Aminoglykoside Polymyxin B Aprotinin
Toxine	Trichosantin
Enzyme und Enzyminhibitoren	PAI-1 PAI-1-Urokinase PAI-1-tPA Pro-Urokinase Lipoprotein-Lipase Amylase
Weitere	Albumin RAP Ig-leichte Ketten Ca ²⁺ C1q Lactoferrin β-2-Microglobulin EGF Prolactin Lysozyme Cytochrome c β-1-Microglobulin PAP-1 Odorant-bindendes Protein Seminal-Vesikel-sekretorisches Protein II

Abb. 8: Übersicht über die Megalin-Liganden (mit Veränderungen adaptiert aus Moestrup und Verroust, [75])

Tc = Transcobalamin, B12 = Vitamin B12, IF = Intrinsic factor, Apo = Apolipoprotein, PTH = Parathyroid-Hormon, PAI = Plasminogen-Aktivator Inhibitor, tPA = tissue plasminogen activator, RAP = Rezeptor-assoziiertes Protein, Ig = Immunglobulin, EGF = epidermal growth factor, PAP = Pancreatitis-assoziiertes Protein.

Exprimiert wird Megalin während der Embryonalentwicklung zunächst im Trophoektoderm (äußere Zellschicht) der frühen Blastozyste, später im Dottersack, amniotischen Ektoderm, Neuroektoderm und dann im Neuroepithel [76, 77].

Im adulten Organismus sind Hauptexpressionsort die apikalen Epithelien zum einen des Glomerulus – nur bei Ratten – und ansonsten der proximalen Tubuli in der Niere als direkte Verbindung zwischen Primärharn und dem sich in den peritubulären Kapillaren befindenden Blut, worüber somit die Rückresorption der Liganden aus dem glomerulären Filtrat stattfindet. Neben dem tubulären Epithel der Niere sind weitere Hauptexpressionsorte des Rezeptors zum einen die den Phospholipidfilm auf der wässrigen Alveolarschicht des Lungenepithels bildenden Pneumozyten des Typs 2 sowie die ependymalen Zellen des ventrikulären Systems und des Choroid-Plexus´ im Gehirn. Hierbei handelt es sich ebenfalls um endozytotisch aktive Epithelien, die im direkten Kontakt mit einer Flüssigkeitsschicht stehen, in der der Rezeptor seine Liganden binden kann.

In geringerem Ausmaß findet man noch Megalin-Expression in den Darmepithelien des Ileums, den Epithelzellen des Innenohr-Labyrinths, dem Ciliarepithel im Auge, sowie in den Epithelzellen der Schilddrüse, Nebenschilddrüse, des Uterus (Endometrium), des Oviducts, des Vas deferens, der Ducti efferentes und der Prinzipalzellen der Nebenhoden [78-80]. Knockoutmäuse mit Megalin-Defizienz zeigten im Einklang mit dem Expressionsmuster des Rezeptors Anomalien in Niere und Lunge sowie starke Entwicklungsstörungen im zentralen Nervensystem [7]. Neben einem stark reduzierten Endozytoseapparat in der Niere und Anomalien in der Beschaffenheit des Lungenepithels mit aufgeblähten Alveoli, kollabierten oder verdickten Alveolarwänden war der Defekt im zentralen Nervensystem am auffälligsten. Den Megalin-Knockouttieren fehlte das Epithel des olfaktorischen Organs (Geruchszentrum), und die Vorderhirnhemisphären waren fusioniert (Holoprosenzephalie). Als Konsequenz fehlte den Knockouttieren außerdem fast durchweg das Corpus Callosum. Außerdem waren das ventrikuläre System, das normalerweise aus zwei lateralen und dem vierten Ventrikel besteht, fusioniert und der Choroid-Plexus vorgefallen. Da sich der Schädel während der Embryonalentwicklung um das Gehirn herumbildet, zeigt sich diese abnormale Gehirnentwicklung auch äußerlich in einer abnormalen Fazialstruktur: Neugeborene Megalin-Knockoutmäuse haben eine kurze Schnauze, eine abgeflachte Stirn, häufig eine offene Fontanelle mit durchdringendem Gewebe und oft kleinere (Mikrophthalmie) oder gar keine Augen (Anophthalmie). Die Untersuchung von Megalin-Knockoutembryonen bestätigte die neuronalen Defekte als Ausdruck einer gestörten Embryonalentwicklung [7]. Als grundlegende Ursache für den holoprosenzephalischen Phänotyp wird die Unterversorgung

des embryonalen Neuroektoderms und des späteren Neuroepithels mit cholesterinreichen Lipoproteinpartikeln aus der Amnionflüssigkeit angenommen. Bevor sich das Neuralrohr schließt, steht die apikale Oberfläche des sich schnell teilenden Neuroepithels in direktem Kontakt zur Amnionflüssigkeit. Bei gesunden Tieren kann dort eine Megalin-abhängige Endozytose cholesterinreicher Lipoproteine stattfinden [81, 82]. Dass Cholesterin hier eine entscheidende Rolle spielt, wird gestützt von der Beobachtung, dass die Unterbindung der endogenen Cholesterinsynthese durch die Blockierung der 7-Dehydrocholesterin- Δ_7 -Reduktase im Gehirn von Ratten zu einem holoprosenzephalischen Phänotyp führt [83]. Das gleiche Enzym des Cholesterinbiosyntheseweges ist bei Patienten mit dem Smith-Lemli-Opitz Syndrom (SLO) blockiert, die als Resultat ebenfalls eine Holoprosenzephalie aufweisen [84]. Nicht nur Cholesterin, sondern auch fettlösliche Vitamine wie z.B. Vitamin E (Tocopherol) können in Form ApoB100-haltiger Lipoproteinpartikel im Blutkreislauf transportiert werden [85, 86].

Unabhängig vom Mechanismus sind die Defekte in Megalin-Knockouttieren so gravierend, dass nur etwa 1-2 % der Neugeborenen bis ins adulte Stadium überleben. Dabei zeigt die Ausprägungsstärke der neuronalen Defekte der überlebenden Tiere eine sehr große Variationsbreite. Die meisten Knockouttiere sterben unmittelbar nach der Geburt, was vermutlich auf eine respiratorische Insuffizienz zurückzuführen ist. Andere erscheinen zwar nicht cyanotisch, werden aber nicht gesäugt und verhungern somit. Die männlichen Tiere sind fertil, bei den weiblichen ist dies noch nicht geklärt. Um die hohe perinatale Mortalitätsrate zu umgehen und aufgrund der starken Expression des Rezeptors in der Niere war die Generierung nierenspezifischer Megalin-Knockouttiere naheliegend.

Die von Thomas Willnow generierten nierenspezifischen Knockout-Mäuse weisen, wie der Vollknockout, eine niedermolekulare Proteinurie auf; in allen anderen Organen jedoch ist die Megalin-Expression unverändert. In **Abbildung 9** ist die das Tubulusepithel der Niere eines solchen Knockout-Tieres im Vergleich zur Niere eines Wildtyps dargestellt. In der Niere ist ausschließlich die durch Megalin vermittelte Endozytose niedermolekularer Plasmaproteine aus dem glomerulären Filtrat defekt, die Aufnahme von Elektrolyten, Glukose und Aminosäuren ist nicht beeinträchtigt [9, 87, 88], so dass mit diesem Tiermodell die Reabsorption durch Megalin als ein einzelner tubulärer Aufnahmeweg aus der Komplexität aller herausgegriffen und bezüglich seiner Bedeutung für die Proteinwiederaufnahme untersucht werden kann.

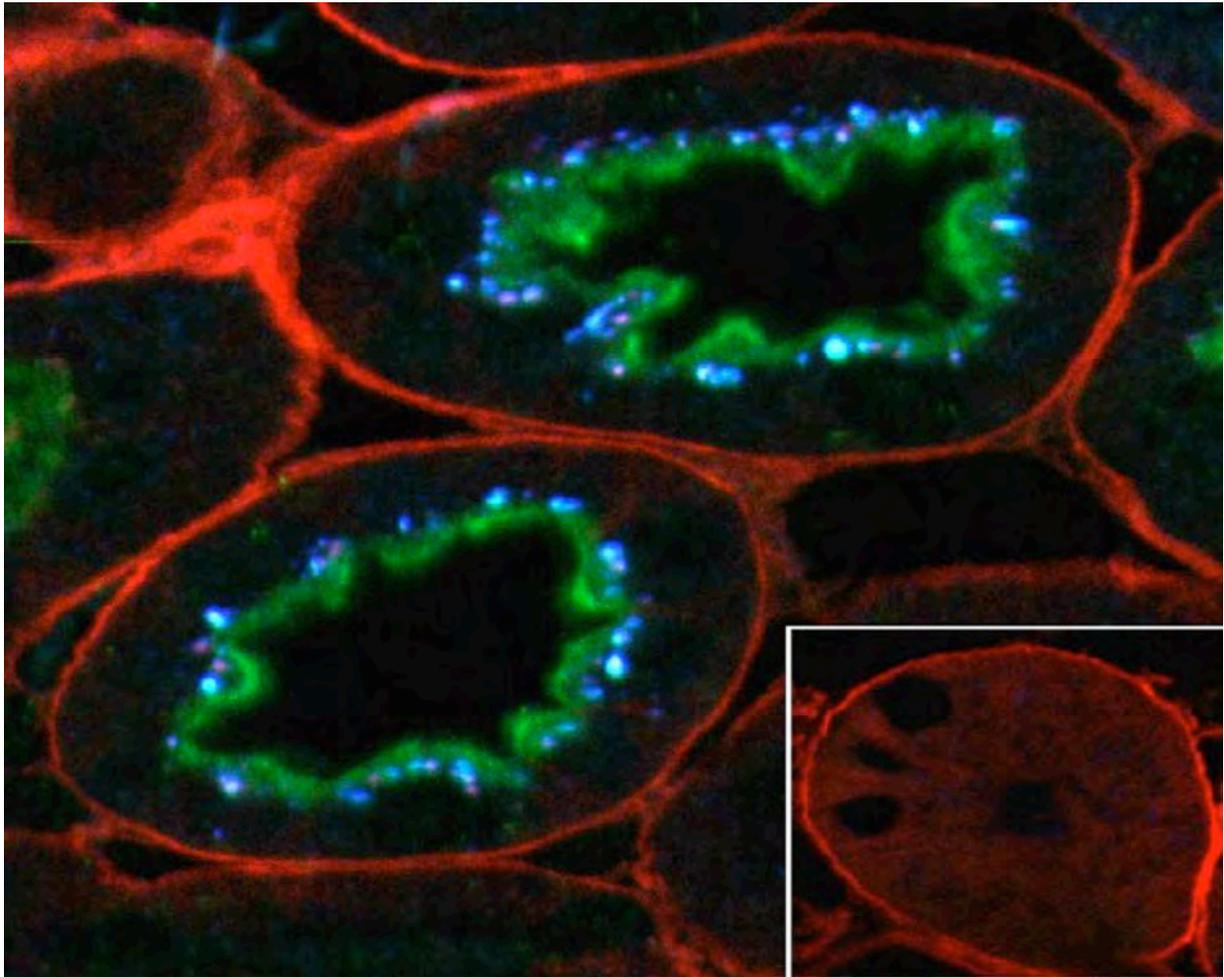


Abb. 9: Nierengewebe eines Wildtyps und eines Megalin-Knockout-Tieres (unten rechts): Rot dargestellt das Tubulusepithel, grün Megalin und blau Albumin als Ligand

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. MATERIAL

3.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamidlösung	Serva, Heidelberg
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Antikörper-Diluent	Dako, Kopenhagen, Dänemark
APS	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Corbitbalsam	I. Hecht, Kiel-Hassee
DEPC	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DOCA (Desoxycorticosteronacetat)- 21day-release-pellets	IRA, I Research USA
DNTPs	TIB Molbiol, Berlin
Eosin G	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe,
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glyzin	USB, Bad Homburg
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt

Isopropylalkohol	Merck, Darmstadt
Ketavet (Ketamin)	Upjohn GmbH, Erlangen
Nitrozellulose HybondC Membran	Amersham, Braunschweig
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Perjodsäure	Merck, Darmstadt
Phenol	Roth, Karlsruhe
Ponceau-S	Sigma, Deisenhofen
Proteingele (Tris-Glyzin)	BioRad, München
Reverse Transkriptase RevertAidM™- MuLVRT	TIB Molbiol, Berlin
random-hexamers	TIB Molbiol, Berlin
Reaction-buffer	Applied Bio Systems, Foster City, CA 94404,USA
Ribonuklease-Inhibitor	Applied Biosystems, Foster City, CA 94404, USA
RNAseZAP	Ambion Inc., Woodward Austin, TX78744 USA
Rompun (Xylazin)	Bayer, Leverkusen
Schiffsches Reagenz	Merck, Darmstadt
SDS	Fluka, Neu-Ulm
Taq-Polymerase	Applied Bio Sytems, Foster City, CA 94404,USA
TEMED TISSUE TEK OCT	Sigma, Deisenhofen
Compound Embedding Medium	Miles Inc. Diagnostic Division, Elkart IN, USA
TRIS-Hcl	Sigma, Deisenhofen
Trizol®	Invitrogen life technologies, Carlsbad, California
Xylol	Merck, Darmstadt

3.1.2. Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden verwendet:

Agarosegel	2g Agarose, 100ml TBE, 8µl Ethidiumbromid
Citratpuffer	
Coating buffer	0,05 M Natriumcarbonat pH 9,6
Coomassie-Färbelösung	0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250; 1 % Essigsäure; 4 % Methanol
Elektrophoresepuffer	25mM TrisCl, 192mM Glyzin, 7mM SDS
Eosin-Lösung	
Hämalaun-Lösung nach Mayer	
Natriumdodecylsulfatlösung (SDS)	1%ig
PBS	
Postcoat Solution	50 mM Tris, 0,15 M NaCl, 1 % BSA pH8
Sample/Conjugate Diluent	50 mM Tris, 0,15 M NaCl, 1 % BSA, 0,05 % Tween 20 pH8
TBE-Puffer (10x)	1 M Tris, 0,9M Borsäure, 10mM EDTA pH 8,4
TBS-Lösung (pH 7,6)	0,05 M Tris-Puffer: 1,5g Tris-HCl, 4,9g Tris-Base, 1 l aqua bidest. 0,15 m NaCl
Transferpuffer	25mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % Methanol
Wash Solution	50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05 % Tween 20 pH8

3.1.5. Antikörper

CD-3 (MCA 1477) Ratte Anti-Maus, <u>Clone: -12</u>	Serotec, Düsseldorf
F4-80 Ratte Anti-Maus <u>Clone:C1: A3-1</u>	Serotec, Düsseldorf
Ki-67 (M7249) Ratte Anti-Maus <u>Clone:TEC 3</u>	DAKO, Kopenhagen, Dänemark
MCP-1 (Sc1784) Ziege Anti-Maus polyclonal	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CAL, USA

3.1.6. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage, MC 1 Analytic AC 210 S	Satorius AG, Göttingen
Acrylamidgelelektrophoresesysteme	Bio-Rad, München
Agarosegelelektrophoresesysteme	Bio-Rad, München
Autoklav	WOLF. Med.-pharm-Geräte, Geislingen/Steige
Computer, Macintosh	Apple-Inc., Cupertino, California
Cryostat Leica CM 3000	Leica Instruments GmbH, Nussloch
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
DNA-Sequenzgelelektrophorese?	MWG, Ebersberg
Einmalkanülen	BRAUN, Melsungen
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, 755 Corporate woods parkway, Vernon Hills, IL 60061, USA
Elektroblotkammer	Bio-Rad, München
Elektrorührer (Monotherm)	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Fettstift	Dako, Kopenhagen, Dänemark
Gefrierkombination (+4°C, -20°C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank (-80°C)	Bosch, Berlin
Gelgießstand	Bio-Rad, München

Gel-Imager	MWG-Biotech, Ebersberg
Gewebeschneider Leica RM 2155	Leica Instruments GmbH, Nussloch
Glaswaren: Glasküvetten, Küvetteneinsatz, Bechergläser, Kolben, Messzylinder, Trichter, Flaschen	Glaswerk Wertheim
Heizplatte	Roth, Karlsruhe
Heizrührer MR 3001	Heidolph, Kelheim
Homogenisator Polytron PT20	Ika Labortechnik, Staufen
Camera (OM-4Ti)	Olympus Europe, Hamburg
Kochtopf	Fissler, Deutschland
Laborpipetten	Eppendorf, Hamburg
Lightcycler® und Zubehör (Kapillaren)	Roche, Mannheim
Mikroskop	Leica, Bensheim
Mikrotiterplatte Maxisorb	Nunc, Wiesbaden
Nahtmaterial	Ethicon, Norderstedt
Operationsbesteck: Scheren, Nadelhalter, Klemmen, Clips	Aesculap
Pasteurpipetten aus Glas	Glaswerk Wertheim
pH-Meter	Beckman Instruments, Inc., USA
Phosphoimager Fujix Bas 2000	Fuji, Tokyo, Japan
Photometer z. Bestimmung des RNA-Gehalts	Kontron, München
Rotationsmikrotom	Microm, Waldorf
Schüttelplattformen wt16	Biometra, Göttingen
Sterilisator	Heraeus Instruments, Hanau
Superfrost Plus Objektträger	Roth, Karlsruhe
Telemetrie-Sender und Zubehör	Data Sciences International (DSI) Global Sales, 4211 Lexington Avenue North, Suite 2244, St. Paul, MN 55126 U.S.A.

Thermocycler	Biozym, Heidelberg
Thermodrucker für Gel-Imager (UP-D890)	Sony, Kitashinagawa, Tokyo, Japan
Thermoblock (5432)	Eppendorf, Hamburg
Transferkammer	Bio-Rad, München
Transferschwämme	Bio-Rad, München
UV-Lampe	SVL Paris, Frankreich
Vortex-Genie 2TM (524)	Scientific Industries, Bohemia, USA
Whatman 3MM Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Zentrifugen: Tischzentrifugen, Ultrazentrifuge	Eppendorf, Hamburg

3.1.7. Software

Textverarbeitungsprogramm: Microsoft®-Office: Word, Excel, Powerpoint	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Zitierprogramm: Endnote®	Thomson Scientific, 2141 Palomar Airport Road, Suite 350, Carlsbad, CA 92011, USA
Statistik-Programm: SPSS®	SPSS Inc. Headquarters, 233 S. Wacker Drive, 11th floor, Chicago, Illinois 60606 USA
Bildbearbeitungsprogramm: Photoshop®	Adobe Systems Incorp., San Jose, CA, USA

3.2. METHODEN

3.2.1. Das Tiermodell

3.2.1.1. *Verwendete Mausstämmе und Zucht- und Haltungsbedingungen*

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurde ein gewebsspezifischer Knockout verwendet, der mittels eines Cre-Rekombinase/loxP-Systems generiert wurde. Der Knockout (cre+) weist eine Megalin-Defizienz in der Niere auf. Sein Phänotyp zeichnet sich durch eine aus der Megalin-Defizienz resultierende niedermolekulare Proteinurie aus. Die Erzeugung dieser Mäuse wurde in der Arbeitsgruppe von T. Willnow am Max-Dellbrück-Centrum in

Berlin-Buch in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe E. Wolf vom Institut für Haustiergenetik in München vorgenommen. Die dazu notwendigen Tiere des Stammes JLB mit gefloxtem Gen für Megalin inklusive *neo*-Gen (Megflox/flox/*neo*) und die *cre*-transgenen Linien apoE-Cre und KAP-Cre wurden am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin/Buch unter Leitung von Thomas Willnow hergestellt. Sie basieren alle auf einem gemischten genetischen Hintergrund von 129SvTer- und entweder C57/BL6J- oder BALB/c-Mäusen. Die Zukaufstämme mit genetischem Defekt stammen von „The Jackson-Laboratories“, Bar Harbor, MA, USA, die Wildtypstämme von „Charles River Laboratories inc.“, Wilmington, MA, USA.

Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen in einem Tag- Nachtrhythmus von 12 Stunden, bei konstanter Temperatur (20-22°C) und einer Luftfeuchtigkeit von 55 % gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Standardfutter und Wasser.

Der Tierversuch wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin unter der TVV-Nr.: G0078/02 genehmigt.

3.2.1.1.1. Generierung der nierenspezifisch Megalin-defizienten Mäuse

Die Generierung des gewebspezifischen Knockouts von Megalin wurde am MDC in Berlin-Buch von der Arbeitsgruppe T. Willnow in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von E. Wolf vom Institut für Haustiergenetik in München durchgeführt. Mittels eines Cre-Rekombinase/loxP-Systems konnten nierenspezifisch Megalin-defiziente Tiere generiert werden. Dazu wurde einem Mausstamm (**A**) das von zwei loxP-Stellen flankierte Zielgen, in diesem Fall das gefloxt Megalinalgen, eingesetzt. Dieser Mausstamm A wurde dann mit einem Stamm *cre*-transgener Tiere (**Mausstamm B**) gekreuzt. Beim *cre*-transgenen Tier befindet sich das Gen für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle gewebs- und entwicklungs-spezifischer Promoterelemente. So wird das gefloxt Zielgen nur in den Zellen entfernt, in denen gleichzeitig das *cre*-Gen transkribiert wird (**Abbildung 10**) [89].

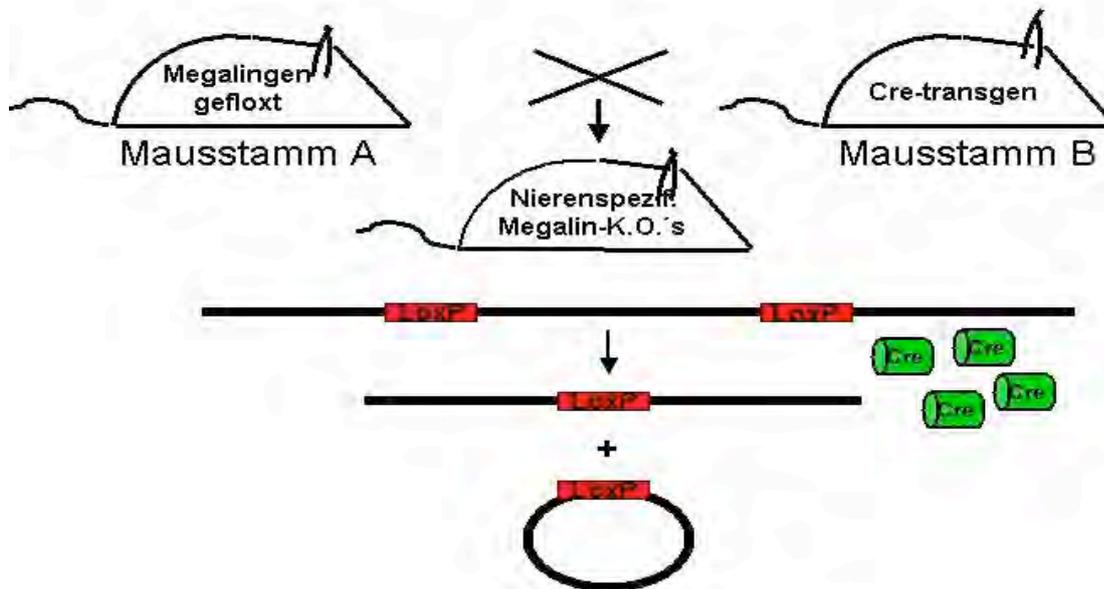


Abb. 10: Schematische Darstellung der Erzeugung des gewebsspezifischen Knockouts von Megalin. Das von zwei loxP-Stellen flankierte Megalin-Gen wird in Anwesenheit von cre über Schließung an der loxP-Stelle ausgeknockt (Abb. modifiziert nach K. R. Chien, To Cre Or Not To Cre, 2001)

3.2.1.1.2 Geno- und Phänotypisierung

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte durch die Arbeitsgruppe von T. Willnow am MDC in Berlin-Buch mit der zur Identifizierung eines bestimmten Gens entwickelten Southernblot-Methode. Hierbei wurde DNA, die aus der Schwanzspitze gewonnen wurde, auf das Vorhandensein des cre-Gens getestet.

Bei der Southern-Blot-Methode wird die DNA mit Restriktionsenzymen in unterschiedlich lange Fragmente unterteilt. Dieser sogenannte Restriktionslängenpolymorphismus wird im nächsten Schritt per Auftrennung durch Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Durch Zugabe von NaOH erfolgt eine Denaturierung der DNA zu Einzelsträngen. Nach Übertragung der Fragmente auf eine Nitrozellulosemembran werden darauf radioaktiv markierte einsträngige DNA-Sondenmoleküle, die dem gesuchten Abschnitt komplementär sind, gegeben. Die dann noch ungebundenen Sondenmoleküle werden abgewaschen, die radioaktiv markierte DNA stellt sich auf einem Röntgenfilm als schwarze Bande dar, welche mit am Rand aufgegebenen Proben verglichen werden kann.

Bei den so für das cre-Gen positiv eingestuft Tieren wurde dann per Westernblot weiter phänotypisiert durch Bestimmung der für den Megalin-defizienten Phänotyp charakteristischen Ausscheidung des 53kDa großen, Vitamin-D-bindendem Protein im Urin.

Dafür wurde ein Proteingel (siehe dazu SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) zunächst freigelegt und das Sammelgel entfernt. Danach wurden zwei Transferschwämme, drei Whatman-Filterpapiere sowie die Nitrozellulosemembran (Hybond C+) in Transferpuffer getränkt und von der Kathoden- (-,schwarz) zur Anodenseite (+,rot) wie folgt in die Halterung einer Biorad-Transferkammer luftblasenfrei eingebaut: Transferschwamm, ein eingeweichtes Filterpapier, ein trockenes Filterpapier, Proteingel, Membran, zwei eingeweichte Filterpapiere, Transferschwamm. Dieses „Gelsandwich“ wurde dann in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer eingesetzt, mit einem Kühlelement versehen und die Proteine entweder mit 30V 3h bei Raumtemperatur oder bei 20V über 24h bei 4°C transferiert. Der Übertragungserfolg wurde durch zweiminütiges Färben in 0,2%iger Ponceau-S-Lösung mit anschließendem Entfärben in ddH₂O getestet. Eine Bande auf Höhe des Vit.-D-bindenden Proteins galt dabei als Nachweis für einen cre-positiven Phänotyp.

3.2.1.2. *Das Modell der DOCA-hypertensiven Nephropathie*

Zu den Hauptursachen progredienter Nephropathien beim Menschen gehört der Bluthochdruck, der häufig eine Schädigung der glomerulären Kapillaren zur Folge hat. Aufgrund der großen Bedeutung des Bluthochdrucks als Ursache einer Nierenerkrankung haben wir uns für ein Modell einer Hypertensiven Nephropathie entschieden. Das DOCA-Salz-Modell ist das am häufigsten bei der Maus verwandte Modell einer durch Bluthochdruck induzierten Nephropathie.

Das DOCA-Modell hat vor allem in der Arbeitsgruppe von F.C. Luft aus Berlin-Buch als Maus-Modell für die hypertensive Nephropathie vielfach Anwendung gefunden. Dauerhafter Einfluss von DOCA als Aldosteron-Agonist führt, wie unter **2.1.3.1.** beschrieben, zu einer Erhöhung des Blutdrucks. F.C. Luft beschrieb bei diesem Modell neben einem deutlichen Anstieg des Blutdrucks bereits 3 Wochen nach Implantation eines 21-day-DOCA-release-pellet und Uninephrektomie zu beobachtende glomeruläre, tubuläre und interstitielle Schädigungen sowie hyaline Ablagerungen, Proteineinschlüsse im tubulären Lumen und Atrophie der distalen Tubuli [12].

Design des Experiments

Allen Versuchstieren wurde zuerst ein Messkatheter sowie ein Sender zur Erhebung der Blutdruckdaten implantiert. Eine Woche nach Implantation der Sender erfolgte eine Uninephrektomie bei allen Versuchstieren sowie die Implantation eines DOCA-pellets.

Protokoll 1: Implantation der Sender

Die Mäuse wurden zuerst per Isofluran-Gasnarkose narkotisiert und dorsal auf einer Wärmeplatte fixiert. Als Zugangsgefäß für den am Sender befindlichen Messkatheter wurde dann die rechte A. carotis communis präpariert. Das Gefäß wurde zunächst isoliert und rostral nahe der Bifurkation von A. carotis externa und A. carotis interna abgebunden. Dabei musste auf die Unversehrtheit des nahe an der Arterie verlaufenden N. Vagus geachtet werden. Im Anschluss wurde mit einer abgewinkelten Injektionsnadel ein Loch in die Gefäßwand gestochen und der Katheter eingeführt. Die Katheterspitze wurde ca. 1,5 cm bis in den Aortenbogen vorgeschoben und der Katheter im Gefäß eingebunden. Danach wurde der Sender subcutan fixiert, indem mit einer Schere stumpf die Haut gelöst und eine Tasche am Abdomen geformt wurde, in die, nach Spülen mit 0,9%iger NaCl-Lösung, der Sender hineingeschoben wurde.

Nach erneutem Einsetzen der zirkadianen Rhythmik von Blutdruck und Herzrate, die als Zeichen einer wiederhergestellten stabilen Kreislaufregulation gewertet wurde, ist mit der Aufnahme der Ausgangsdaten begonnen worden.

Protokoll 2: Uninephrektomie und Implantation der DOCA-pellets

Die abermals per Isofluran narkotisierten Tiere wurden linksseitig von der Flanke aus, nach Durchtrennen von Haut- und Muskelschicht mit einer etwa 0,8cm langen Inzision, Vorlagern der Niere und Ligieren der Nierengefäße nephrektomiert. Danach wurde die Muskelschicht mit einer fortlaufenden Naht wieder verschlossen. Bei den Tieren der DOCA-Gruppe wurde nach stumpfem Freipräparieren einer Hauttasche subcutan ein 50mg-21-day-release-DOCA-pellet implantiert und anschließend die Haut mit zwei Einzelheften wieder verschlossen; Nach 3 Wochen erfolgte unter Isofluran-Narkose die erneute Implantation eines 21-day-DOCA-release-pellets.

Alle Tiere wurden einzeln gehalten und erhielten Standardfutter, dazu erhielten die Tiere der DOCA-Gruppe 1%ige Kochsalzlösung, die Kontrolltiere Leitungswasser zu trinken, alles ad libitum.

Das Design des Experiments ist im folgenden noch einmal tabellarisch dargestellt:

Mäusestamm	Anzahl der Tiere	Gruppe	Uninephr. +Sender	DOCA+ 1 % NaCl-Trinklsg	Tötung nach Woche
C57/Bl6	N= 7	cre+	+	+	6
C57/Bl6	N= 7	cre-	+	+	6
C57/Bl6	N= 7	cre+	+	-	6
C57/Bl6	N= 7	cre-	+	-	6

3.2.1.3. Organentnahme

Die Tiere wurden am Versuchsende abermals per intraperitonealer Injektion narkotisiert und durch Anstechen des Venenplexus im medialen Augenwinkel mit einer Pasteurpipette aus Glas zur Gewinnung des Blutes ausgeblutet. Das Abdomen wurde dann mit einem Schnitt entlang der Linea alba eröffnet. Nieren und Herz wurden entnommen, von umgebendem Fett- und Bindegewebe befreit und gewogen. Anschließend wurden sie in jeweils vier Teile geteilt, wobei ein Teil in 4%iger Formalinlösung für die Histologie und Immunhistologie, ein mit TissueTec auf Filterpapier fixierter Teil für die Immunhistologie sowie ein weiterer Teil in einem Kryotube für molekularbiologische Untersuchungen in flüssigem Stickstoff konserviert wurde.

3.2.1.4. Monitoring der Nierenfunktion

Um die Nierenfunktion im Verlauf des Experiments zu dokumentieren, wurden wöchentlich die Urin-Kreatinin-, -Harnstoff-, -Albumin-, -Natrium-, und -Kaliumwerte sowie die ausgeschiedene Urinmenge der Tiere bestimmt. Dazu wurden die Mäuse jeweils 24 Stunden in Stoffwechselkäfigen gehalten, der abgefangene Urin bei 3000U/min fünf Minuten lang zentrifugiert, jeweils zwei Aliquots des Urins in Eppendorf-Gefäße abgefüllt, die dann bis zur Bestimmung der angegebenen Parameter, mit Ausnahme des Urin-Albumins, durch das Routinelabor der Charité bei -20°C gelagert wurden.

Blut zur Bestimmung des Serum-Kreatinins, -Harnstoffs, -Proteins, -Natriums und -Kaliums wurde am Ende des Experiments gewonnen. Dazu wurde mit einer Pasteurpipette der Venenplexus im medialen Augenwinkel angestochen, wodurch bis zu 1,5ml Blut gewonnen werden konnten. Diese wurden in ein Eppendorf-Gefäß gefüllt, bei 1000U/min fünf Minuten

lang zentrifugiert, das Serum abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß gefüllt und ebenfalls bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C gelagert.

3.2.2. Albumin-ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbant assay)

Die quantitative Bestimmung der Albuminurie per ELISA wurde von der Firma Celltrend in Luckenwalde vorgenommen. Hierbei kam ein kompetitiver ELISA zum Einsatz. Bei der kompetitiven ELISA-Technik wird eine absorbierende Mikrotiterplatte mit dem zu bestimmenden Antigen (Maus-Albumin) beschichtet. Im ersten Schritt werden die Proben und die entsprechenden Standards mit einem Peroxidase-markierten anti-Albumin-Antikörper auf die Platte gegeben und inkubiert. Das sich in der Probe befindende Albumin konkurriert mit dem an die Platte gebundene Albumin um die Bindungsstellen des Antikörpers. Zur quantitativen Bestimmung des durch Probenantigen gebundenen Primärantikörpers wird der Anteil an Antikörpern, der nicht spezifisch, gar nicht oder eben Probenantigen gebunden hat, aus der Platte durch mehrmaliges Waschen entfernt. Die Mikrotiterplatte wird dann mit Tetramethyl-Benzidin inkubiert, welches als Substrat für die enzymatische Reaktion der Peroxidase dient, und die Reaktion anschließend mit verdünnter Schwefelsäure gestoppt. Über die optische Dichte kann die Menge des gebundenen Albumins bestimmt werden, wobei gilt, dass die Farbintensität umgekehrt proportional zur Albuminkonzentration in der Probe ist.

3.2.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur zusätzlichen Kontrolle der Größe der Proteinurie wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Es kam dabei die diskontinuierliche SDS-PAGE zum Einsatz. Die diskontinuierliche SDS-PAGE von Proteinen, die im Gegensatz zur kontinuierlichen SDS-PAGE charakterisiert ist durch die Anwesenheit eines Sammelgels zur Proteinbündelung, wurde nach dem Prinzip von Laemmli [90] durchgeführt. Mit 10 ml pro Gel wurde das Trenngel aus einer Acryl-/Bisacryl-Mischung von 30:0,8 (w/v), 25 %, 1,5M Tris-HCl, pH 8,8 (final 0,5mM) und ddH₂O ad 0,9 ml, gefolgt von der Zugabe von 1 % (w/v) SDS und 0,875 % einer 10%igen Ammoniumpersulfat-Stocklösung (APS) und 0,05 % TEMED zur Polymerisation, zubereitet. Das Ganze wurde zwischen jeweils zwei im Gelgießstand fixierte und somit abgedichtete Glasplatten gegossen, mit Isopropanol überschichtet und bis zur völligen Polymerisation stehen gelassen.

Zur Proteinbündelung wurde ein 4%iges Sammelgel verwendet, das zu diesem Zweck einen niedrigeren pH-Wert aufwies. Für 4ml Gesamtvolumen wurden hierfür eine entsprechende

Menge der Acryl-/ Bisacryl-Mischung von 30:0,8 (w/v), 25 % 1,5M Tris-HCl, pH 6,8 (final 62mM), 50%iger (v:v) Glycerinstock (ad 3,9 ml) und 0,1 %SDS vermischt. Nach Zugabe von 1,06 % der APS-Stocklösung und 0,625 % TEMED wurde das Ganze auf das Trenngel gegeben und jeweils ein Kamm zur Herstellung der Geltaschen eingesetzt. Nach vollständigem Auspolymerisieren auch des Trenngels wurde das Gel in die Haltevorrichtung der Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer gesetzt, der Kamm gezogen und die Geltaschen ebenfalls mit Elektrophoresepuffer angefüllt. Zur Vorbereitung der Proben wurden jeweils 5µl des Probenpuffers vorgelegt, 15µl Urin-Probe dazupipettiert und das Gemisch in die einzelnen Taschen gegeben. So konnte bei 30mV im Sammelgel gebündelt und mit 100mV aufgetrennt werden. Als Referenz wurde ein Molekulargewichts-Standard von 4-250kDa der Firma invitrogen® verwendet.

Zur Anfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurde das entsprechende Acrylamidgel dann 5-10 Minuten in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend bis zum gewünschten Entfärbungsgrad mit Entfärbelösung entfärbt.

3.2.4. Histologie

Die zu bearbeitenden Gewebestücke von Niere und Herz wurden unmittelbar nach der Entnahme für 24 Stunden in 4%ige Formalinlösung gegeben und anschließend schrittweise dehydriert. Dazu wurden sie für jeweils zwei Stunden in 70%igen, zwei Stunden in 90%igen, über Nacht in 96%igen und dann dreimal für zwei Stunden in 100%ige Ethylalkohol und schließlich zweimal 20min in Xylol gelegt. Per Einbettautomat wurden die Schnitte dann in Paraffin eingebettet. Das paraffindurchtränkte Gewebe wurde in Blöckchen gegossen, von denen nach Aushärtung mit dem Rotationsmikrotom 2µm dicke Schnitte angefertigt wurden, die wiederum nach Glättung im Wasserbad mit einer Temperatur von 40°C auf Objektträger aufgetragen und 10 min im Wärmeschrank bei 60°C getrocknet wurden. Nach dem Schneiden und Trocknen im Brutschrank werden die Schnitte in Xylol entparaffiniert, durch die absteigende Alkoholreihe wieder in ein wässriges Milieu überführt und schließlich in den jeweiligen Färbelösungen gefärbt.

Als Übersichtsfärbung diente die HE-Färbung. Dabei wurden die deparaffinierten Schnitte zuerst für 15 min in Hämalun-Lösung nach Mayer gefärbt, dann 20 Minuten in Leitungswasser von ungebundenem Farbstoff befreit und anschließend für eine Minute in 1%ige Eosinlösung gegeben. Nach Abspülen mit destilliertem Wasser wurden die Präparate

in der aufsteigenden Alkoholreihe und mit Xylol wieder entwässert und mit Corbitbalsam luftdicht unter Deckgläschen eingedeckt.

Das Färbeergebnis im Überblick:

Bindegewebe	rosarot
Zytoplasma	rosarot
Zellkerne	blauviolett

Die PAS-Färbung (= Perjodsäure-Schiff-Färbung) beruht auf der Darstellung von zwei dichtgelagerten Aldehydgruppen mit Hilfe der fuchsinschwefeligen Säure. Zuvor hydrolysiert Perjodsäure Kohlehydrate zu Aldehydgruppen. Kohlehydrate werden purpur/pink, Kerne blau dargestellt. Auch Cerebroside, Ganglioside, Mukoproteide und Glykoproteide geben eine positive Reaktion.

Dazu wurden nach dem oben beschriebenen Entparaffinieren der Schnitte diese in einem Färbekorbchen für 10 Minuten in frisch angesetzte 1%ige Perjodsäure gegeben, danach für 5 Minuten unter Leitungswasser und anschließend kurz in alkoholischer Disulfidlösung (SO₂-Wasser) gespült. Dann kamen die Schnitte für 20 Minuten in auf 40°C erwärmtem Schiffschem Reagenz in den Wärmeofen und wurden daraufhin wieder kurz in SO₂-Wasser und für 10 Minuten in Leitungswasser gespült, gefolgt von einer 10 minütigen Gegenfärbung mit Hämatoxylin und anschließendem Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten. Schließlich wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe und mit Xylol (analog zur HE-Färbung) entwässert und mit Deckgläschen mit Corbit-Balsam eingedeckt.

Das Färbeergebnis im Überblick:

Neutrale Mukopolysaccharide	pink
Zellkerne	blauviolett
Bindegewebe	graublau
Zytoplasma	rosa

Zur morphometrischen Auswertung dieser PAS-gefärbten Schnitte wurden zuerst die glomerulären PAS-positiven Ablagerungen in den Glomeruli quantifiziert. Die Einteilung erfolgte in vier Schweregrade von milden (Grad 0, bis zu 25 %) über mäßige (Grad 1, 25-50 %) und schwere Veränderungen (Grad 2, 50-75 %) bis hin zu totaler Sklerose von mehr als 75 % des Glomerulums (Grad 3).

Bezüglich der tubulären Veränderungen wurde pro Schnitt und Tier der Durchmesser von 40 zufällig ausgewählten Tubuli bestimmt. Aus den pro Schnitt erhaltenen Werten wurde dann der Mittelwert bestimmt.

3.2.5. Immunhistologie

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Immunfärbemethoden basieren auf der Avidin-Biotin-Methode, die die hohe Affinität der beiden Substanzen zueinander nutzt. Das anzu-färbende Molekül wird hierbei mittels eines unmarkierten Primärantikörpers gebunden. Der Sekundärantikörper ist spezifisch gegen die F_c-Region des Primärantikörpers gerichtet und mit einem Biotinmolekül gekoppelt. Als Label wird ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex eingesetzt, der sich mit freien Avidin-Bindungsstellen an den biotinmarkierten Sekundärantikörper anlagern kann. Die Peroxidase des Labelkomplexes wird mittels eines Chromogens sichtbar gemacht.

Hierzu wurden Paraffinschnitte verwendet, die, wie für die Histologie beschrieben, auf Objektträger gebracht wurden. Nur für die F4/80-Darstellung erwies sich die Färbung am Kryoschnitt als geeigneter. Dazu wurde das hierfür bestimmte Gewebe unmittelbar nach der Entnahme aus dem narkotisierten Tier mit einem Tropfen kurz in flüssigen Stickstoff getaucht und so auf Filterpapier angefrorenen Tissuetec fixiert, zum Schutz mit Aluminiumfolie umwickelt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und dann bei -80°C gelagert. Die Gewebestücke wurden dann in einem Kryostaten mit einem Mikrotom bei einer Temperatur des Mikrotommessers und des Gewebeblocks von -18°C und -20°C in $6\mu\text{m}$ dicke Kryoschnitte geschnitten. Die Schnitte wurden vom Mikrotommesser direkt auf zimmerwarme fertigbeschichtete Superfrost-Plus-Objektträger gegeben, dann etwa 2h bei Zimmertemperatur getrocknet, dann 12min in kaltem Aceton fixiert, wieder 30min getrocknet und bei -20°C gelagert. Zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte in kaltes Aceton gegeben, anschließend bei Zimmertemperatur etwa 10min getrocknet und dann mit PBS gespült.

3.2.5.1. Antigenfreilegung

Bei den Paraffinschnitten findet, um die zu markierenden Gewebsantigene für die Primärantikörper besser verfügbar zu machen, zuerst eine Antigenfreilegung statt. Hierzu kommen in unserer Arbeitsgruppe je nach Antikörper zwei verschiedene Methoden zur Anwendung: in der Mikrowelle oder durch Kochen im Kochtopf. Zur Freilegung in der Mikrowelle werden die Schnitte in Küvetten in Zitratpuffer eingebracht und dreimal je 2,5 min mit 600W erhitzt.

Zwischen den Erhitzungszyklen wird der Flüssigkeitsverlust in der Küvette mit entmineralisiertem Wasser aufgefüllt, um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden.

Bei der Antigenfreilegung durch Kochen wird eine Proteinspaltung durch Temperatur und Druck erreicht. Dazu werden die Schnitte, ebenfalls in Zitratpuffer, für 5 min in den Schnelltopfkoch gegeben.

3.2.5.2. *Blockierungsschritte*

Die Blockierungsschritte dienen dazu, endogene Substrate zu eliminieren, die zu einem falschpositiven Ergebnis führen könnten. Darunter fallen vor allem die endogene Peroxidase, endogenes Avidin und Biotin, aber auch unspezifische Proteine, die mit dem Sekundärantikörper, Label oder Chromogen Bindungen eingehen und somit zu falschpositiven Ergebnissen führen könnten. Folgende Substanzen kamen zum Einsatz:

Reagens	Blockiert	Inkubationsdauer	Hersteller
Peroxidase Blocking Reagent	Peroxidase	8 min	DAKO Corporation, CA, USA
Avidin Solution	Endogenes Avidin	15 min	Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Biotin Solution	Endogenes Biotin	15 min	Avidin/Biotin Blocking Kit

3.2.5.3. *Allgemeines immunhistologisches Färbeprotokoll*

Die vorbereiteten Proben werden – je nach verwendetem Antikörper – den entsprechenden Blockierungsschritten unterzogen. Durch Einkreisen der Gewebsschnitte mit einem Fettstift wird das Herablaufen der Lösungen vom Objektträger verhindert. Zwischen allen Einzelschritten wird jeweils 3 mal für zwei Minuten mit PBS gewaschen. Nach dem Blocken wird das benötigte Volumen – 20µl im Fall der murinen Nieren – des entsprechend verdünnten Primärantikörpers hinzugegeben und für 1 Stunde inkubiert. Nach abermaligem Waschen mit PBS wird für 30 Minuten mit dem gleichen Volumen des Sekundärantikörpers und nach einem weiteren Waschschrift mit dem Label-Komplex ebenfalls 30 Minuten inkubiert. Das Chromogen wird hinzugefügt und unter dem Mikroskop der Erfolg kontrolliert: Die Färbereaktion wird bei gewünschter Signalintensität durch Einbringen in PBS gestoppt. Nach 10 Minuten werden die Schnitte zur Gegenfärbung für 30 Sekunden in Hämalaunlösung gefärbt

und mit reichlich Leitungswasser gespült. Nach weiteren 10 Minuten können die Präparate mit Deckgläschen versehen werden.

Für jede Färbereihe wurden obligatorisch Positivkontrollen (Isotypkontrolle mit Maus-IgG) und Negativkontrollen (Antikörper-Diluent) mitgeführt, um jeweils falsch positive oder falschnegative Reaktionen auszuschließen.

Die untenstehende Tabelle führt alle verwendeten Primärantikörper mit den entsprechenden Parametern für Antigenfreilegung, Blockierung und Verdünnung auf:

Antikörper	Antigenfreilegung	Blockierung	Verdünnung	Spezies
Ki-67	Dampfdruck-Kochtopf	Peroxidase Avidin-Biotin	1 : 100	Ratte
MCP-1	Dampfdruck-Kochtopf	"	1 : 50	Ziege
CD-3	Dampfdruck-Kochtopf	"	1 : 50	Ratte
F4-80	KRYO	"	1 : 100	Ratte

3.2.6. Genexpressionsanalyse

Um RNA vor dem vorzeitigen Abbau zu schützen wurden bei allen Arbeiten Schutzhandschuhe getragen, unnötige Wartezeiten vermieden und alle Arbeitsschritte auf Eis (Zentrifugation bei 4°C) und unter möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt. Da RNAsen durch Diethylpyrocarbonat (DEPC) inaktiviert werden, wurden alle verwendeten Lösungen, für die dies möglich war, mit DEPC versetzt und nach 2-3- stündiger Inkubation autoklaviert. Der Sterilität wegen wurden Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Puffer bei 121°C und 2bar Druck für 20 min autoklaviert. Glasgefäße wurden für fünf Stunden bei 250°C sterilisiert. Die Teile des elektrischen Homogenisators, die mit dem zu homogenisierenden Gewebe in Berührung kamen, sowie die Pinzette zur Entnahme des Gewebes aus dem Cryotube wurden mit aqua dest., mit RNaseZAP und dann mit DEPC gereinigt.

3.2.6.1. Isolierung von RNA aus dem Nierengewebe

Die Isolierung von RNA erfolgte mit der Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi [91]. Pro Kubik-cm aufzuschließendem Gewebe wurde dabei 1ml Trizol® eingesetzt. Das unmittelbar nach der Entnahme aus dem narkotisierten Tier in flüssigem Stickstoff schockgefrorene und bei -80°C im „Cryotube“ gelagerte Gewebe wurde per Pinzette auf das in ein Rundboden-Röhrchen vorgelegte Trizol® gegeben und etwa 1min mit

dem elektrischen Homogenisator homogenisiert, in ein „NUNC-tube“ gegeben und zur Dissoziation der Nukleotidkomplexe 2min 30sek stehen gelassen. Nach Vermischen durch 15-sekündiges Schütteln mit 200µl Chloroform pro ml eingesetztem Trizol® wurde zur Trennung der RNA-Phase von Phenol-Chloroform- und von der die DNA enthaltenden Interphase 15 Minuten bei 4000U/min und 4°C zentrifugiert, die wässrige RNA-Phase dekantiert, in ein autoklaviertes Eppendorf-Röhrchen gegeben und mit 500µl Isopropylalkohol pro eingesetztem ml Trizol® zur RNA-Fällung versetzt. Nach 10minütiger Reaktionszeit wurde 10 Minuten bei 14.000U und 4°C zentrifugiert und die RNA durch „vortexen“ des erhaltenen gelartigen Pellets nach Entfernen des Überstandes in 70%igem Ethanol gewaschen. Nach abermaligem Entfernen des Überstandes wurde das pellet 5-10 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet, in 30µl DEPC aufgenommen, zur Zerstörung der Sekundärstruktur 10 Minuten bei 60°C im Thermoblock geschüttelt und bei -80°C eingefroren.

Zur Bestimmung der Reinheit der RNA-Isolate wurde 1µl der im Thermoblock bei 60°C für 10 Minuten aufgetauten RNA-Probe mit 9µl DEPC-Wasser versetzt, mit 8µl Ladungspuffer mittels Pipette gemischt, auf ein 2%iges Agarosegel überführt und ca. 1 Stunde bei 120V und 120mA in der mit 1%iger TBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer „laufen gelassen“. Unter UV-Strahlung wurden die durch Ethidiumbromid sichtbar gemachten und für RNA-Anwesenheit spezifischen Banden kontrolliert.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde ebenfalls 1µl des RNA-Isolates in 99µl DEPC-Wasser aufgenommen und im Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen. Die gemessene optische Dichte wurde multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor 100 und dem Faktor 40 (1OD entspricht bei einer Wellenlänge von 260 nm 40µg/ml), um die Konzentration zu erhalten.

3.2.6.2. *Reverse Transkription von RNA in cDNA*

Da die Taq-Polymerase nur DNA erkennt, muß RNA vor ihrem Einsatz in einer PCR in cDNA umgeschrieben werden. Zur reversen Transkription von RNA in cDNA werden zuerst Hexanukleotid-Triphosphate (Hexamere) mit zufälliger Basenabfolge an die Gesamtheit der präparierten RNA gebunden und von dem viralen Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Daraus können dann mit Hilfe spezifischer DNA-Primer bestimmte Genabschnitte durch PCR amplifiziert und später kloniert werden.

Bei der reversen Transkription wurden Ansatzgrößen von 20µl verwendet, welche sich wie folgt zusammensetzten:

DEPC-Wasser	7,2µl
random-hexamers	1 µl
5x reaction buffer	4 µl
DNTP-Mix	2 µl
Ribonuclease Inhibitor	0,9µl
Reverse Transkriptase (5000U)	0,9µl
RNA-Isolat	4 µl

Die Ansätze wurden bei 42°C für 60min, gefolgt von 95°C für 10min inkubiert und danach auf Eis gestellt. Die cDNA wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.6.3. *Quantitative Real-Time Online PCR mit dem Lightcycler®*

Die PCR dient der Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche, die über die Auswahl von bestimmten DNA-Primern festgelegt werden, um nachweisbare Mengen des ausgewählten DNA-Bereiches zu erhalten. Im ersten Schritt werden die DNA-Doppelstränge durch hohe Temperatur (>65°C) aufgeschmolzen. Im zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung sequenz-spezifischer DNA-Primer 5´am (+)-Strang und 5´am (-)-Strang, d.h. die Primer flankieren dann den zu amplifizierenden DNA-Bereich. Dabei ist die Anlagerungstemperatur in erster Linie von der Primersequenz abhängig. Im dritten Schritt amplifiziert die hitzestabile Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*) den dazwischenliegenden Bereich bei 72°C (Extension). 30-40 Zyklen liefern normalerweise eine ausreichend hohe DNA-Konzentration der Amplifikate. Im Anschluß an die PCR kann dann durch gelelektrophoretische Auftrennung eine qualitative Einordnung des Produkts nach seiner Größe vorgenommen werden.

Das Lightcycler®-System erlaubt eine quanti- und qualitative online PCR, wobei zwei Detektionsformate zur Verfügung stehen, zum einen die sequenzunabhängige Detektion von DNA unter Anwendung von SYBR Green I, zum anderen die sequenz-spezifische mit Hilfe

von Hybridisierungssonden. Da einfacher und preisgünstiger zu etablieren, kam zuerst die SYBR Green I-Methode, nach deren Etablierung dann aufgrund der höheren Spezifität das Hybridisierungssonden-Format zur Anwendung.

Der interkalierende Farbstoff SYBR Green I fluoresziert bei Bindung an Doppelstrang-DNA (dsDNA) und kann so zum Produktnachweis der PCR dienen; bei der Methode mit Hybridisierungssonden werden zusätzlich zu den PCR-Primern zwei sequenzspezifische Oligonucleotide, gelabelt mit fluoreszierenden Farbstoffen, dem Reaktions-Ansatz zugesetzt, wobei durch Hybridisierung der Hybridisierungsproben an die Ziel-DNA die beiden Farbstoffe zusammenkommen und durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) vom Donor-Farbstoff an das Akzeptor-Fluorophor zum Fluoreszieren gebracht werden und die emittierte Fluoreszenz bei der entsprechenden Wellenlänge gemessen werden kann.

Der Beginn der exponentiellen Produktzunahme, die lineare logarithmische Phase der PCR, wird anhand der Fluoreszenzzunahme bestimmt und crossing point genannt. Dieser korreliert mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden cDNA-Sequenz und kann deshalb zur Quantifizierung der Transkripte herangezogen werden.

Im Anschluss an die letzte Replikationsphase dieser PCR erfolgt jeweils eine Schmelzkurvenanalyse zur Identifizierung des spezifischen Produkts. Dies ist möglich, da jedes PCR-Produkt eine charakteristische Schmelztemperatur (T_M) besitzt, die sowohl von seiner Länge als auch von seinem Gehalt an Guanin/Cytosin Basenpaaren abhängig ist. Durch die Ermittlung der T_M einer Probe ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte als post-PCR-Schritt überflüssig.

Als Reaktionsansatz wurde ein Mastermix angefertigt und von diesem jeweils 18 μl in die speziell für den Lightcycler® konzipierten Glaskapillaren verbracht und dazu 2 μl cDNA (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) bzw. H₂O (DEPC) für die Negativkontrolle pipettiert.

Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

MgCl ₂ (3mM)	1,6 μl
H ₂ O	11,4 μl
Primer (sense) (7 μM)	1,5 μl
Primer (antisense) (7 μM)	1,5 μl
SYBR Green Mix	2,0 μl

Um zu vermeiden, dass auftretende Primerdimere bei der Fluoreszenzmessung der Markertranskripte miterfasst wurden, erfolgte diese Messung bei einer Temperatur oberhalb des Schmelzpunktes der Primerdimere und unterhalb der T_M der PCR-Produkte.

Die nachgewiesenen PCR-Produkte hatten folgende Größen:

β2-Microglobulin	99 Basenpaare
MCP-1	153 Basenpaare
TGF-β	141 Basenpaare
Collagen III	Basenpaare

Folgende Primer, Annealing- und Messtemperaturen kamen zum Einsatz:

Primer	Sequenz	Annealing	Messung
β2-Microglobulin (b2m-s/r)	5'- gAAATCCAA ATgCTgAAgAACg 5'- CAAATgAATCTTCAgAgCATCATg	62°C	86°C
MCP-1 (mCCL2_S/R)	5'- ggC TCA gCC AgA TgC AgT 5'- CTC TCT CTT gAg CTT ggT gAC	60°C	86°C
TGF-β	5'- GGT GGC AGG CGA GAG CGC TGA 5'-GGC ATG GTA GCC CTT GGG CT	66°C	86°C
Collagen III	5'- AGG CTG AAG GAA ACA GCA AA 5'- TAG TCT CAT TGC CTT GCG TG	66°C	86°C

β 2-Microglobulin wurde als "housekeeping gene" eingesetzt. Das "housekeeping gene" ist ein Referenzgen, da es definitionsgemäß in der immer gleichen Menge exprimiert. Es ist somit ein Maß dafür, wie erfolgreich die PCR verlaufen ist und wie viel cDNA in den einzelnen Proben vorhanden war.

3.2.7. Statistische Methoden

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde auf einem PC mit einem entsprechenden Computerprogramm (SPSS, Statistical Product and Service Solution, SPSS Inc. Headquarters, Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte einschließlich des Standardfehlers (SEM = „Standard Error of Means“). Die Mittelwerte der ent-

sprechenden Gruppen untereinander wurden auf signifikante Unterschiede per Mann-Whitney-U-Test untersucht. Die statistisch signifikante Grenze wurde bei $P = 0,05$ festgesetzt.

4. ERGEBNISSE

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse bezüglich Blutdruck, Organfunktion, Pathohistologie und Immunhistologie sowie Genexpressionsanalyse dargestellt. Zur Kontrolle der erfolgreichen Induktion einer hypertensiven Nephropathie werden die Werte der Tiergruppen mit DOCA-Implantat entweder mit der jeweiligen uninephrektomierten Kontrollgruppe oder mit den vor DOCA-Implantation ermittelten Werten verglichen. Der Schwerpunkt liegt auf dem Vergleich cre-positiver und cre-negativer DOCA-behandelter Tiere.

4.1. Blutdruck

Wie unter **3.2.1.2** beschrieben, wurde den Tieren zu Versuchsbeginn ein Katheter in die Arteria carotis implantiert, der, in Verbindung mit dem ebenfalls implantierten Sender stehend, dort zur telemetrischen Messung des Blutdrucks über die gesamte Dauer des Versuchs verblieb. Nach sieben Tagen Adaptionszeit (baseline) wurden dann Uninephrektomie und Implantation des DOCA-pellets vorgenommen und mit der Gabe einer 1%igen Kochsalzlösung als Trinklösung begonnen.

Aus den per Telemetrie erhaltenen 24h-Mittelwerten wurden Wochenmittelwerte errechnet, welche in **Abbildung 11 und 12** im Versuchsverlauf dargestellt sind. Die „baseline“ als Mittelwert der einwöchigen Messung vor DOCA-Implantation galt als Bezugswert für die im weiteren Versuchsverlauf erhaltenen Blutdruckwerte.

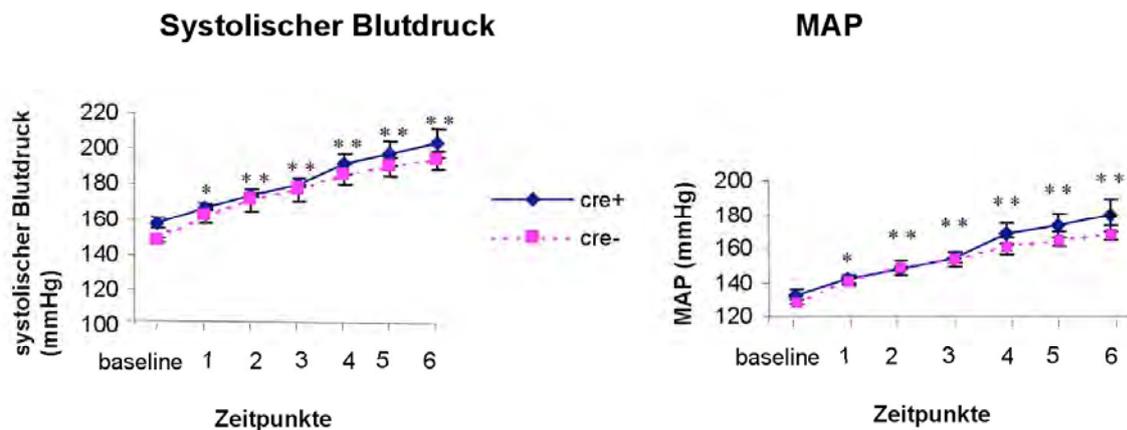


Abb. 11: Systolischer Blutdruck und MAP cre+ - und cre- -Tiere vor (=baseline) und nach Uninephrektomie und DOCA-Implantation im Versuchsverlauf über 6 Wochen. Alle Parameter sind als Wochenmittelwerte + SEM angegeben. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ versus baseline.

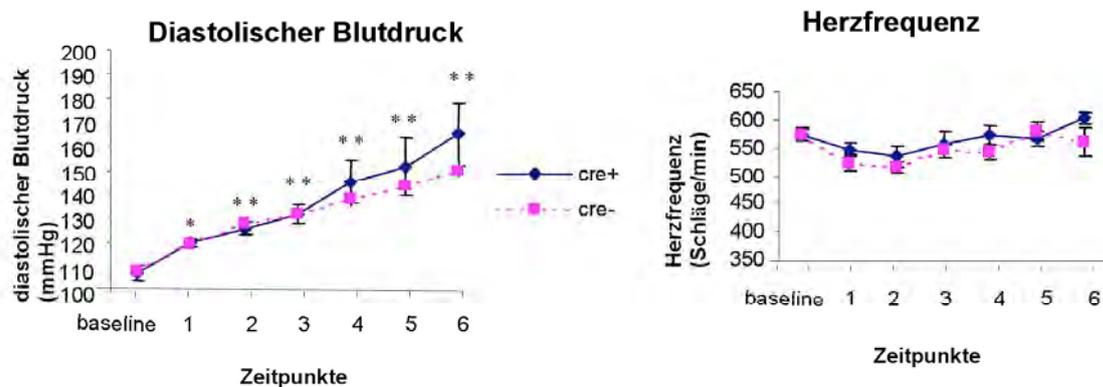


Abb. 12: Diastolischer Blutdruck und Herzfrequenz cre-positiver und cre- negativer-Tiere vor (=baseline) und nach Uninephrektomie und DOCA-Implantation im Versuchsverlauf über 6 Wochen. Alle Parameter sind als Wochenmittelwerte + SEM angegeben. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ versus baseline.

Alle Tiere entwickelten bereits in Woche 1 nach DOCA-Implantation einen im Vergleich zur baseline signifikant ($*P \leq 0,05$) höheren mittleren arteriellen (MAP), systolischen und diastolischen Druck, der von Woche zu Woche weiter stieg und vom Zeitpunkt 2 an signifikant im Sinne von $**P \leq 0,01$ im Vergleich zur baseline erhöht war.

Der systolische Blutdruck stieg bei den cre-positiven Tieren von $156,8 \pm 2,5$ mmHg auf $202,7 \pm 8,5$ mmHg, bei den cre-negativen Tieren von $148,7 \pm 1,8$ mmHg auf $192 \pm 4,8$ mmHg zum Zeitpunkt 6 an.

Die MAP-Werte stiegen bei den cre-positiven Tieren von $132,5 \pm 3,3$ mmHg auf $179,2,7 \pm 9,8$ mmHg, bei den cre-negativen Tieren von $128,1 \pm 1,1$ mmHg auf $169 \pm 3,7$ mmHg zum Zeitpunkt 6 an.

Der diastolische Blutdruck stieg bei den cre-positiven Tieren von $107,75 \pm 3,48$ auf $164,82 \pm 12,63$ mmHg, bei den cre-negativen Tieren von $108,56 \pm 1,33$ auf $149,89$ mmHg $\pm 2,52$ zum Zeitpunkt 6 an.

Die Herzfrequenz der Tiere blieb mit Werten zwischen $572,5 \pm 11,4$ Schlägen pro Minute bei Beginn der Messung und $602,7 \pm 11,3$ Schlägen pro Minute nach 6 Wochen DOCA bei den cre-positiven Tieren und Werten zwischen $573,7 \pm 12,5$ und $560 \pm 25,8$ Schlägen pro Minute bei den cre-negativen Tieren über die gesamte Versuchsdauer ohne signifikante Veränderungen.

Cre-positive und cre-negative Tiere, miteinander verglichen, zeigten bezüglich Blutdruckverhalten und Herzfrequenz während der gesamten Dauer der Messungen ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass DOCA-Implantation in Kombination mit Uninephrektomie und 1%iger Kochsalz-Trinklösung eine dauerhaft signifikante Erhöhung des Blutdrucks bei gleichbleibender Herzfrequenz zur Folge hatte, cre-positive und cre-negative Tiere hierbei aber keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

4.2. Körper-, Nieren- und Herzgewicht

Vor Versuchsbeginn und während des gesamten Versuchsverlaufs wurde am Ende jeder Woche das Körpergewicht (KGW) jedes Versuchstieres gemessen. In **Abbildung 13** sind die Körpergewichte der verschiedenen Gruppen im gesamten Versuchsverlauf dargestellt.

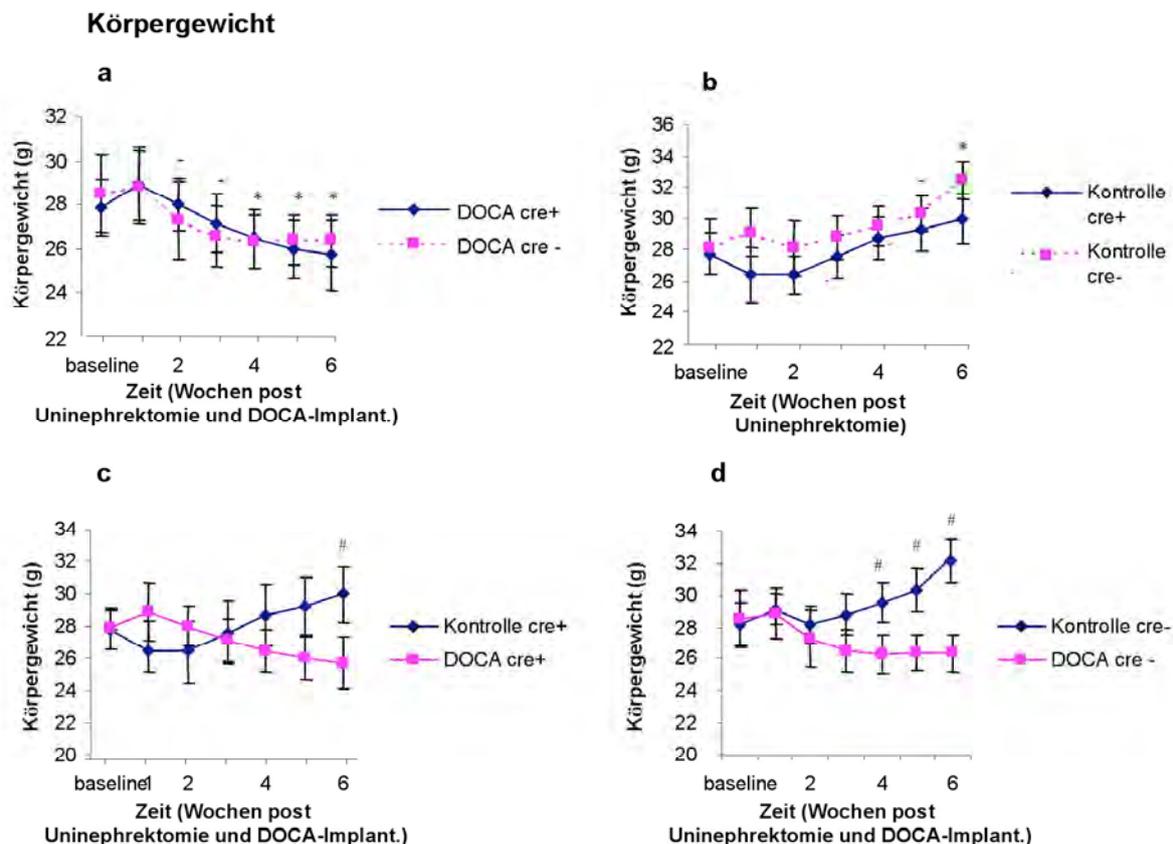


Abb. 13: Körpergewichte im Versuchsverlauf über 6 Wochen nach Uninephrektomie und DOCA-Implantation. Dargestellt sind DOCA cre+ und cre- im Vergleich (A), Kontrollen cre+ und cre- im Vergleich (B), sowie cre-positive (C) und cre-negative (D) Kontrollen und DOCA im Vergleich. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ versus baseline (cre-positive und cre-negative Tiere), - $P < 0,05$ Werte cre-negative Tiere versus Ausgangswert; # $P < 0,05$ DOCA-Werte versus Kontrollen.

Im Vergleich zum Ausgangswert zeigten die cre-negativen Tiere der DOCA-Gruppe ab Woche 2 ein signifikant (* $P \leq 0,05$) gesunkenes Körpergewicht, die cre-positiven Tiere der DOCA-Gruppe ab Woche 4 ein signifikant (** $P \leq 0,05$) gesunkenes Körpergewicht (DOCA-cre- von $28,51\text{g} \pm 1,78$ zu Beginn auf $26,36\text{g} \pm 1,19$ am Versuchsende, DOCA-cre+ von $27,86\text{g} \pm 1,28$ zu Beginn auf $25,71\text{g} \pm 1,33$ am Versuchsende) (**Abb. 13 A**).

Bei den ausschließlich uninephrektomierten Kontrolltieren war das Körpergewicht ab Woche 5 (cre-) bzw. Woche 6 (cre+) signifikant (* $P \leq 0,05$) im Vergleich zum Ausgangswert gestiegen (cre- -Kontrollen von $27,75\text{g} \pm 1,33$ zu Beginn auf $29,96\text{g} \pm 0,8$) am Versuchsende, cre+ von $28,2\text{g} \pm 1,28$ zu Beginn auf $32,43\text{g} \pm 1,72$ am Versuchsende) (**Abb. 13 B**). Zwischen cre-positiven und cre-negativen Tieren zeigte sich dabei weder in der DOCA- noch in der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied.

DOCA-behandelte cre-positive Tiere versus cre+ -Kontrolltiere zeigten nur in Woche 6 signifikante ($\#P \leq 0,05$) Gewichtsunterschiede (Kontrollen: von $27,75 \text{ g} \pm 1,28$ zu Beginn auf $30,46 \text{ g} \pm 1,29$ am Versuchsende. DOCA: von $27,86 \text{ g} \pm 1,27$ zu Beginn auf $25,71 \text{ g} \pm 1,57$ am Versuchsende) (**Abb. 13 C**).

DOCA-behandelte cre-negative Tiere versus cre-negative Kontrolltiere zeigten signifikante ($\#P \leq 0,05$) Gewichtsunterschiede ab Woche 4 (Kontrollen: von $28,20 \text{ g} \pm 1,33$ zu Beginn auf $31,65 \text{ g} \pm 1,18$ am Versuchsende. DOCA: von $28,51 \text{ g} \pm 1,78$ zu Beginn auf $26,34 \text{ g} \pm 1,17$ am Versuchsende) (**Abb. 13 D**).

Weiterhin wurden die am Versuchsende entnommenen Organe Niere (NGW) und Herz (HGW) gewogen und das Verhältnis beider zum Körpergewicht (ratios NGW/KGW und HGW/KGW) bestimmt.

In **Abbildung 14** sind die Körpergewichte und die ratios von Nieren- und Körpergewicht sowie von Herz- und Körpergewicht zum Zeitpunkt des Versuchsendes dargestellt.

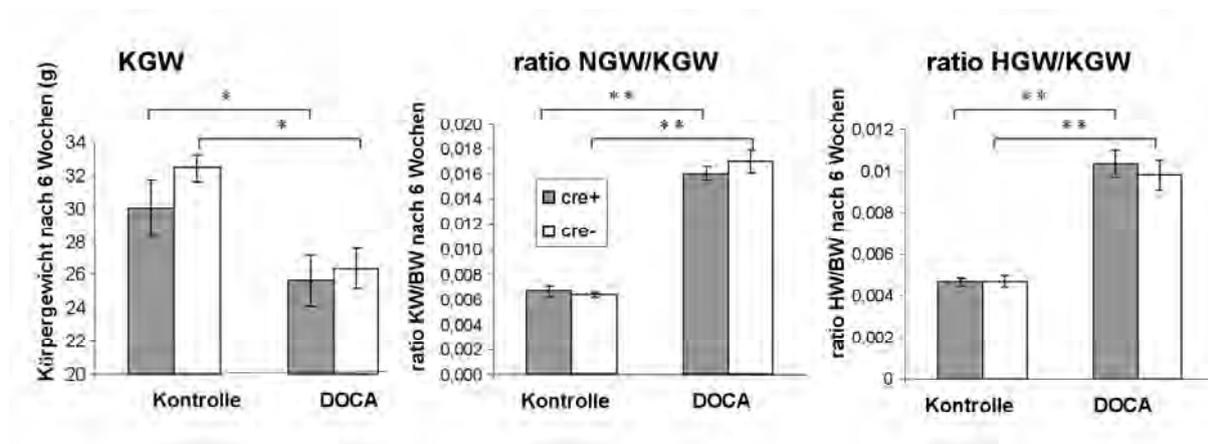


Abb. 14: Körpergewicht (KGW) und ratio von Nierengewicht (NGW) und KGW sowie von Herzgewicht (HGW) und KGW zum Zeitpunkt des Versuchsendes. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Alle DOCA-Tiere hatten, wie bereits beschrieben, am Versuchsende ein signifikant ($*P \leq 0,05$) niedrigeres Körpergewicht als die uninephrektomierten Tiere der Kontrollgruppe.

Die Tiere der DOCA-Gruppe zeigten außerdem eine signifikant ($**P \leq 0,01$) höhere ratio von Nieren- zu Körpergewicht (NGW/KGW) als die uninephrektomierten Kontrolltiere (ratio

NGW/KGW: DOCA cre-positiv $0,016 \pm 0,0005$, DOCA cre-negativ $0,017 \pm 0,0008$, Kontrollen cre-positiv $0,0066 \pm 0,0004$, Kontrollen cre-negativ $0,0063 \pm 0,0002$).

Ähnlich verhielt es sich bei der ratio von Herz- und Körpergewicht (HGW/KGW): Diese war bei den Tieren der DOCA-Gruppe signifikant ($*P \leq 0,01$) höher als bei den uninephrektomierten Kontrolltieren (ratio HGW/KGW: DOCA cre-positiv $0,01 \pm 0,0005$, DOCA cre-negativ $0,009 (\pm 0,0008)$, Kontrollen cre-positiv $0,0066 \pm 0,0001$, Kontrollen cre-negativ $0,0063 \pm 0,0003$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Tiere der DOCA-Gruppe ein signifikant geringeres Körpergewicht, ein signifikant höheres relatives Nierengewicht, und ein signifikant höheres relatives Herzgewicht als die Tiere der uninephrektomierten Kontrollgruppe zeigten.

Cre-positive Tiere der DOCA-Gruppe wiesen ein tendenziell relativ geringeres Nierengewicht sowie höheres Herzgewicht als die cre-negativen Tiere der DOCA-Gruppe auf, jedoch war dabei keine statistische Signifikanz zu verzeichnen.

4.3. Nierenfunktionsparameter

4.3.1. Serumkreatinin, -harnstoff, -natrium, -kalium und Kreatinin-Clearance

Zum Zeitpunkt des Versuchsendes wurde bei allen Tieren wie im Methodenteil beschrieben Blut gewonnen und daraus die Serumharnstoff- und -kreatinin-, -natrium-, -kalium- sowie -albuminwerte bestimmt und die Kreatinin-Clearance errechnet.

In **Abbildung 15** sind Harnstoff- und Kreatininwerte im Serum in mg/dl cre-positiver und cre-negativer Tiere von DOCA- und Kontrollgruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes dargestellt.

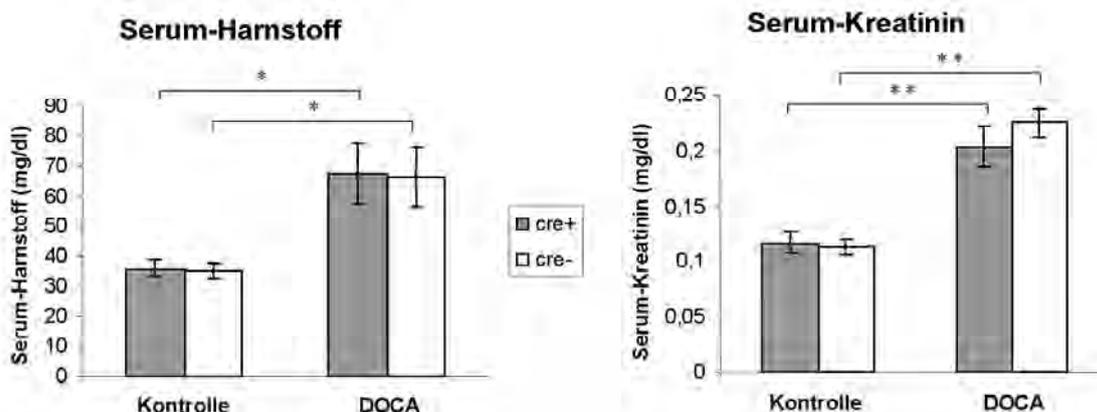


Abb. 15: Harnstoff- und Kreatininwerte im Serum in mg/dl bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Die Harnstoffwerte im Serum waren bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-Gruppe signifikant (* $P < 0,05$) höher (cre-positive 67,5 \pm 9,75, cre-negative 66,17 \pm 9,86 mg/dl) als bei den Tieren der Kontrollgruppe (cre-positive 35,83 \pm 2,87, cre-negative 35 \pm 2,81 mg/dl).

Keine signifikanten Unterschiede gab es zwischen den Harnstoffwerten im Serum cre-positiver und -negativer Tiere sowohl innerhalb der DOCA- als auch innerhalb der Kontrollgruppe.

Die Kreatininwerte im Serum waren bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-Gruppe signifikant (** $P \leq 0,01$) höher (cre-positive 0,203 \pm 0,02 mg/dl, cre-negative 0,255 \pm 0,01 mg/dl) als bei den Tieren der Kontrollgruppe (cre-positive 0,117 \pm 0,01 mg/dl, cre-negative 0,113 \pm 0,01 mg/dl). Keine signifikanten Unterschiede gab es zwischen den Kreatininwerten im Serum cre-positiver und -negativer Tiere innerhalb der Kontrollgruppe. Innerhalb der DOCA-Gruppe zeigten die cre-negativen Tiere stärker erhöhte Serumkreatininwerte als die cre-positiven Tiere, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen ($P \geq 0,05$).

Abbildung 16 zeigt die Kreatinin-Clearance in ml/min cre-positiver und -negativer Tiere der DOCA- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes.

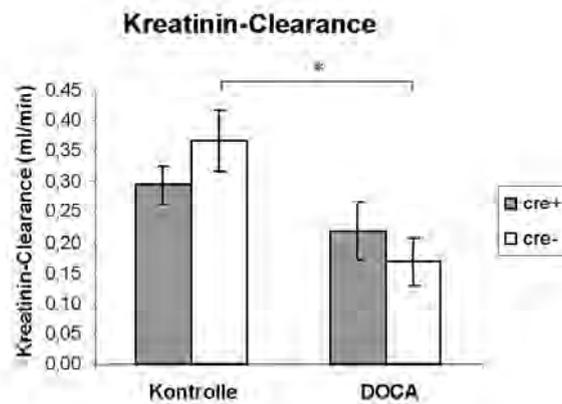


Abb. 16: Kreatinin-Clearance in ml/min bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes. Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM. * $P \leq 0,05$.

Die Kreatinin-Clearance war bei den cre-negativen Tieren der DOCA-Gruppe signifikant (* $P \leq 0,05$) niedriger ($0,17 \pm 0,04$ ml/min) als bei den Tieren der Kontrollgruppe ($0,37 \pm 0,05$ mg/dl). Bei den cre-positiven Tieren war kein signifikanter Unterschied zwischen DOCA- ($0,22 \pm 0,05$ ml/min) und Kontrollgruppe ($0,29 \pm 0,03$ ml/min) zu beobachten. Zwischen cre-positiven und -negativen Tieren sowohl innerhalb der DOCA- als auch innerhalb der Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

In **Abbildung 17** sind Natrium- und Kaliumwerte im Serum in mmol/l cre-positiver und cre-negativer Tiere von DOCA- und Kontrollgruppe im Vergleich zum Zeitpunkt des Versuchsendes dargestellt.

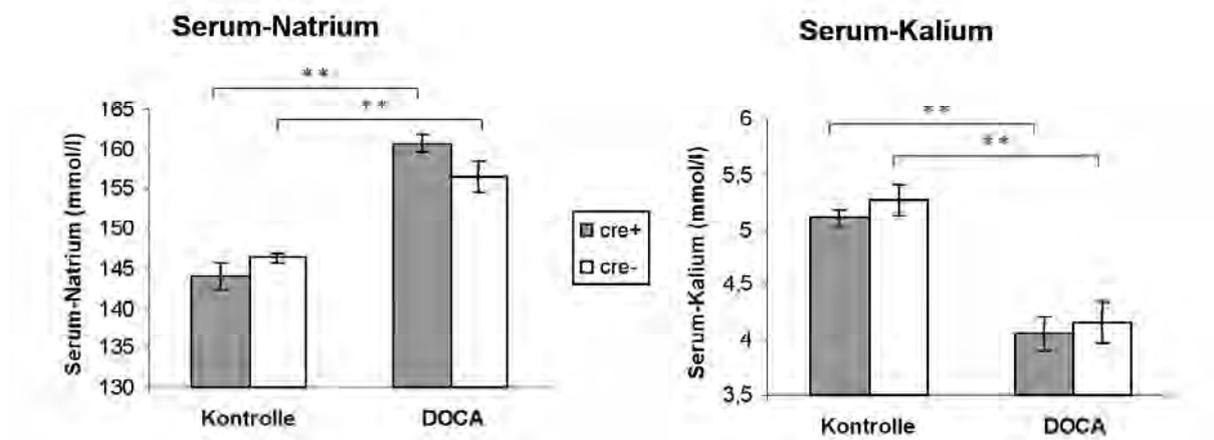


Abb. 17: Natrium- und Kaliumwerte im Serum in mmol/l bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes. Alle Werte sind Mittelwerte + SEM. $**P < 0,01$.

Die Natriumwerte im Serum waren bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-Gruppe signifikant ($**P \leq 0,01$) höher (cre-positive $160,67 \pm 1,08$, cre-negative $166,05 \pm 1,87$ mmol/l) als bei den Tieren der Kontrollgruppe (cre-positive $144 \pm 1,76$, cre-negative $146,3 \pm 0,67$ mmol/l). Keine signifikanten Unterschiede gab es zwischen den Natriumwerten im Serum cre-positiver und -negativer Tiere innerhalb der DOCA- und der Kontrollgruppe.

Die Kaliumwerte im Serum waren bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-Gruppe signifikant ($**P < 0,01$) niedriger (cre-positive $5,11 \pm 0,07$, cre-negative $5,27 \pm 0,14$ mmol/l) als bei den Tieren der Kontrollgruppe (cre-positive $4,6 \pm 0,16$, cre-negative $4,15 \pm 0,19$ mmol/l). Bei den Kaliumwerten im Serum waren zwischen cre-positiven und -negativen Tieren innerhalb der DOCA- und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Abbildung 18 zeigt die Albuminwerte im Serum in g/dl cre-positiver und -negativer Tiere der DOCA- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes.

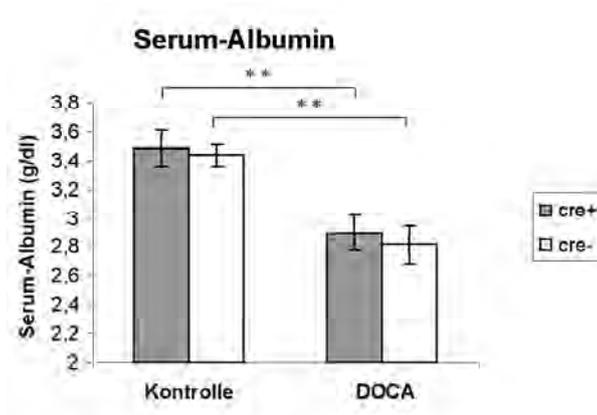


Abb. 18: Albuminwerte im Serum in g/dl bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM. $**P \leq 0,01$.

Die Albuminwerte im Serum waren bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-Gruppe signifikant ($**P \leq 0,01$) niedriger (cre-positive $2,9 \pm 0,11$, cre-negative $2,82 \pm 0,13$ g/dl) als bei den Tieren der Kontrollgruppe (cre-positive $3,48 \pm 0,12$, cre-negative $3,43 \pm 0,07$ g/dl). Keine signifikanten Unterschiede gab es zwischen den Albuminwerten im Serum cre-positiver und -negativer Tiere innerhalb der DOCA- und der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Tieren der DOCA-Gruppen Serumharnstoff-, -kreatinin- und -natrium-Werte signifikant ($**P \leq 0,01$) anstiegen, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen cre-positiven und -negativen Tieren. Die Kreatinin-Clearance war nur bei cre-negativen DOCA-Tieren erniedrigt. Die Serumkalium- und -albumin-Werte waren bei allen Tieren der DOCA-Gruppe signifikant erniedrigt ($**P \leq 0,01$), wiederum jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen cre-positiven und -negativen Tieren.

4.3.2 . Urin-, Natrium-, Kalium- und Albumin-Exkretion

Vor Versuchsbeginn und im weiteren Versuchsverlauf 1x wöchentlich wurde von allen Tieren in Stoffwechsellkäfigen über 24h Urin gesammelt und Menge sowie Natrium-, Kalium- und Albumin-Werte im Urin bestimmt.

In **Abbildung 19** ist die Urinausscheidung in ml/24h aller DOCA-Tiere im Versuchsverlauf vor und über 6 Wochen post DOCA-Implantation und Uninephrektomie dargestellt.

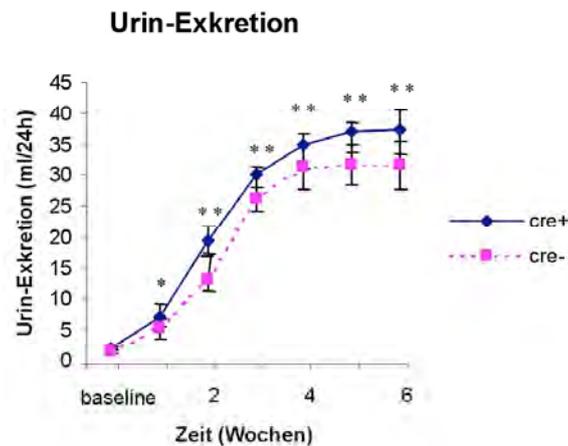


Abb. 19: Urin-Exkretion in ml/24h vor (=baseline) und nach Uninephrektomie und DOCA-Implantation im Versuchsverlauf über 6 Wochen. Alle Parameter sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM.: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ cre+ - und cre- -Werte zu den Versuchszeitpunkten versus baseline.

Sowohl bei den cre-positiven als auch bei den cre-negativen Tieren stieg die Menge des ausgeschiedenen Urinvolumens ab Woche 1 post DOCA-Implantation signifikant (* $P \leq 0,05$, ab Woche 2: ** $P \leq 0,01$) an und erreichte ihr Maximum in Woche 6 post DOCA-Implantation (bei cre+: von $2,11 \pm 0,22$ auf $37,27 \pm 3,24$ ml/24h, bei cre-: von $1,53 \pm 0,37$ auf $31,69 \pm 3,61$ ml/24h).

Cre-positive versus cre-negative Tiere zeigten im gesamten Versuchsverlauf untereinander keine signifikanten Unterschiede bezüglich des ausgeschiedenen Urinvolumens.

In **Abbildung 20** sind Natrium- und Kaliumwerte im Urin in mmol/24h aller DOCA-Tiere im Versuchsverlauf dargestellt.

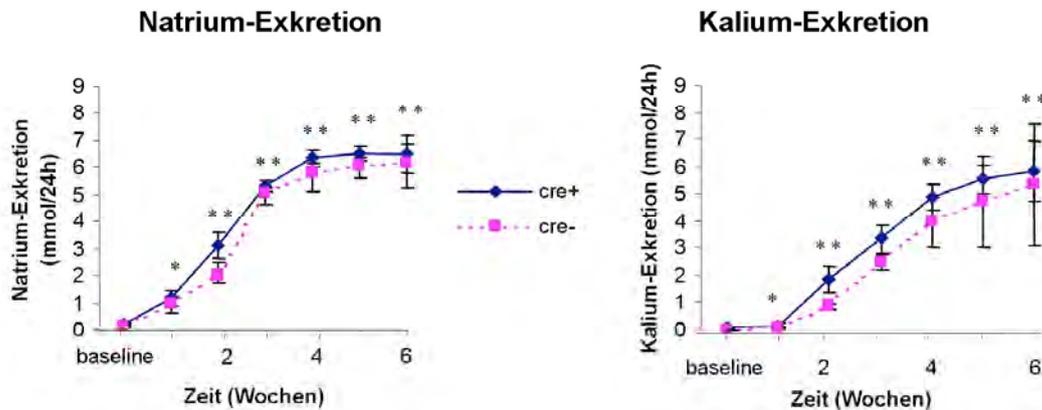


Abb. 20: Natrium- und Kalium-Exkretion in mmol/24h im Urin cre-positiver und cre-negativer Tiere vor (=baseline) und nach Uninephrektomie und DOCA-Implantation im Verlauf über 6 Wochen. Alle Parameter sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$. Alle Werte versus baseline.

Die Natriumwerte stiegen sowohl bei den cre-positiven als auch bei den cre-negativen Tieren ab Woche 1 post DOCA-Implantation signifikant ($*P \leq 0,05$) an und blieben auch im gesamten weiteren Versuchsverlauf dauerhaft signifikant erhöht (bei cre+: von $2,27(\pm 0,22)$ auf $41,08(\pm 3,24)$ ml/24h, bei cre-: von $1,53(\pm 0,37)$ auf $31,39(\pm 3,61)$ ml/24h).

Die Kaliumwerte stiegen sowohl bei den cre-positiven als auch bei den cre-negativen Tieren ab Woche 1 post DOCA-Implantation signifikant ($*P \leq 0,05$) und blieben auch im gesamten weiteren Versuchsverlauf dauerhaft signifikant erhöht (bei cre+: von $2,27(\pm 0,22)$ auf $41,08(\pm 3,24)$ ml/24h, bei cre-: von $1,53(\pm 0,37)$ auf $31,39(\pm 3,61)$ mmol/l).

Cre-positive und cre-negative Tiere im Vergleich zeigten im gesamten Versuchsverlauf keine signifikanten Unterschiede bezüglich der ausgeschiedenen Natrium- und Kaliummengen.

In **Abbildung 21** ist die Albuminausscheidung im Urin in mg/24h aller DOCA-Tiere im vor (**A**) und im gesamten Versuchsverlauf inklusive baseline über 6 Wochen post DOCA-Implantation und Uninephrektomie (**B**) dargestellt.

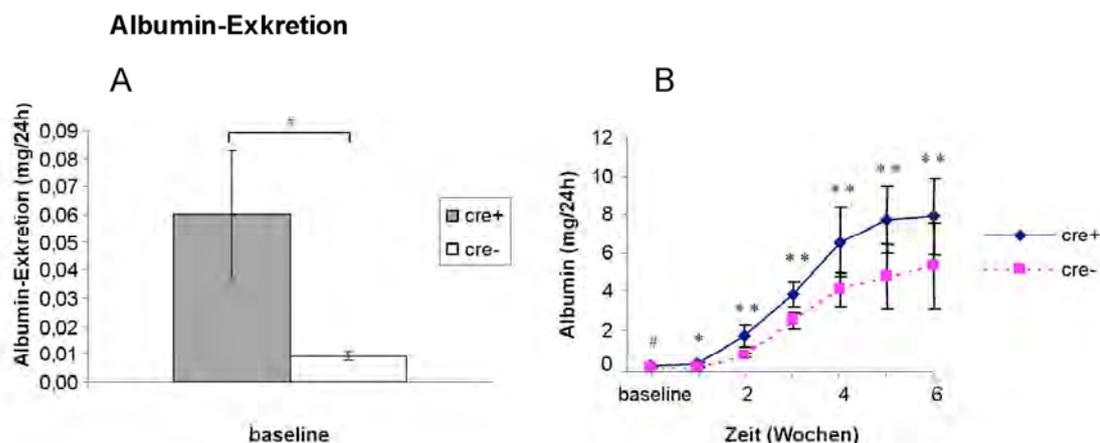


Abb. 21: Albuminausscheidung im Urin in mg/24h. **A:** Cre-positive und cre-negative Tiere vor DOCA-Implantation und Uninephrektomie. **B:** Cre-positive und cre-negative Tiere vor und nach Uninephrektomie und DOCA-Implantation im Versuchsverlauf über 6 Wochen. Alle Parameter sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM. # $P \leq 0,05$ cre+ versus cre-. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ cre+ und cre- Werte versus baseline.

Die cre-positiven Tiere zeigten vor DOCA-Implantation eine signifikant ($\#P \leq 0,05$) höhere Albuminausscheidung als die cre-negativen Tiere. Die im Urin ausgeschiedene Albuminmenge stieg sowohl bei den cre-positiven als auch bei den cre-negativen Tieren ab Woche 1 post DOCA-Implantation signifikant (* $P \leq 0,05$) an und blieb dann dauerhaft signifikant (** $P \leq 0,01$) erhöht (cre+: von $0,06 \pm 0,02$ auf $7,90 \pm 1,92$ mg/24h; cre-: von $0,01 \pm 0,001$ auf $5,34 \pm 1,96$ mg/24h). Im weiteren Versuchsverlauf war eine höhere Albuminausscheidung bei cre-positiven Tieren als bei cre-negativen Tieren festzustellen, jedoch ohne dass sich dabei eine statistische Signifikanz zwischen den beiden Gruppen gezeigt hätte.

4.4. Pathohistologische Analyse

Zur pathohistologischen Analyse wurden die PAS-gefärbten Paraffinschnitte der entnommenen Organe aller Tiere auf die für die DOCA-Hypertensive Nephropathie typischen morphologischen Veränderungen [12] untersucht: Hierzu gehören hochdruckgeschädigte Glomeruli, welche Sklerosen, vermehrt hyaline Matrix und kollabierte Kapillarschlingen aufweisen, Tubuluszellen mit Verlust des Bürstensaumes, tubuläre Proteineinschlüsse, Tubulus-Dilatationen und -Atrophien sowie interstitielle Infiltration mit Entzündungszellen, Proliferation und Fibrose.

Abbildung 22 zeigt PAS-Färbungen der Niere eines cre-negativen und der eines cre-positiven Kontrolltieres (**A, B**), sowie der Niere eines cre-negativen und der eines cre-

positiven Tiers der DOCA-Gruppe (**C, D**). Die PAS-Färbung färbt Karboanhydrate und epitheliales Muzin lila-dunkelrot an, so dass sich hiermit besonders gut epitheliale und andere Basalmembranen und Expansion der extrazellulären Matrix darstellen lassen.

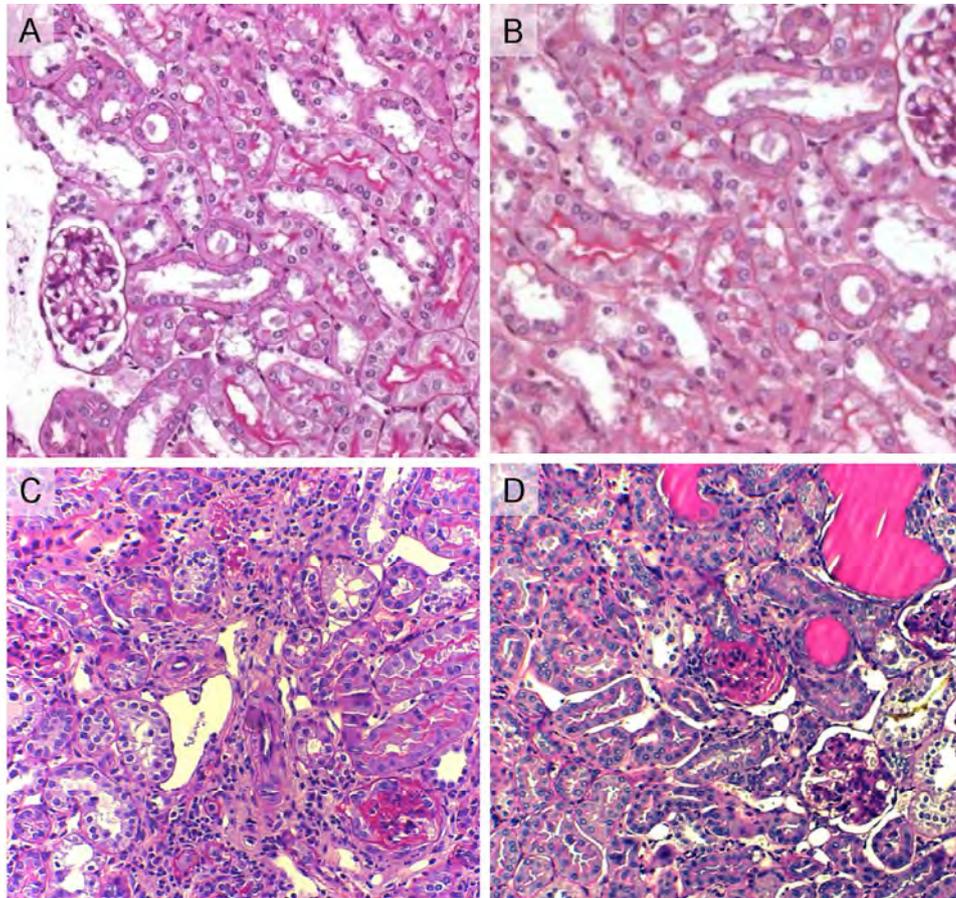


Abb. 22: PAS-Färbung von Nierengewebe. (A) Kontrolltier cre-; (B) Kontrolltier cre+; (C) DOCA-Tier cre-; (D) DOCA-Tier cre+.

Sowohl cre-positive ($1,67 \pm 0,15$) als auch cre-negative ($1,72 \pm 0,19$) Tiere der DOCA-Gruppe zeigten einen signifikant ($P \leq 0,01$) höheren Grad glomerulärer Sklerosierung als die Tiere der Kontrollgruppe (cre-negative $0,05 \pm 0,05$, cre-positive $0,04 \pm 0,04$) (**Abbildung 23**). Zwischen cre-positiven und cre-negativen Tieren innerhalb der DOCA- und der Kontrollgruppe gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Glomerulosklerosegrades (Methode wie unter **3.2.4.** beschrieben).

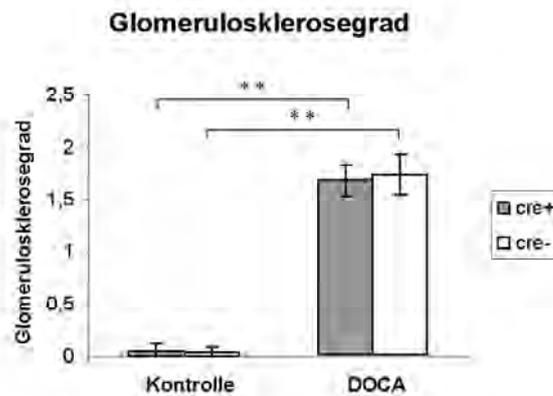


Abb. 23: Glomerulosklerosegrad, errechnet aus dem Anteil PAS-positiven Materials im Glomerulum, dabei galt: 0-25 % = 0, 25-50 % = 1, 50-75 % = 2, 75-100 % = 3. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM. ** $P \leq 0,01$.

Bezüglich der tubulären Veränderungen wurde pro Schnitt und Tier der Durchmesser von 40 zufällig ausgewählten Tubuli bestimmt, wobei die Tiere der DOCA-Gruppe signifikant ($P \leq 0,01$) größere Tubulusdurchmesser (cre-positive Tiere $51,21 \mu\text{m} \pm 1,28$, cre-negative $56,99 \mu\text{m} \pm 0,20$) als die Kontrolltiere (cre-positive Tiere $38,21 \mu\text{m} \pm 1,06$, cre-negative $39,07 \mu\text{m} \pm 1,05$) aufwiesen (**Abbildung 24**). Unter DOCA-behandelten Tieren zeigten Megalin-defiziente signifikant kleinere Durchmesser als nicht-defiziente Tiere.

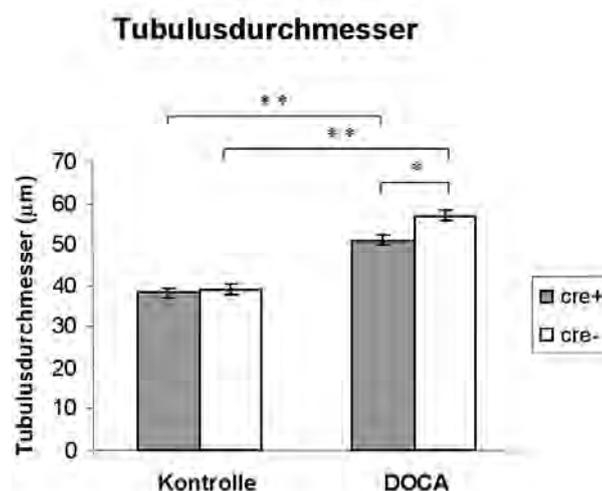


Abb. 24: Tubulusdurchmesser bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes. Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte + SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

Bei der mit hypertensiver Nephropathie häufig einhergehenden dilatativen Kardiomyopathie führen oft beteiligte chronisch entzündliche Prozesse zum Umbau der extrazellulären Matrix und zu fibrotischen Veränderungen des kardialen Bindegewebes [92]. Daher wurde auch von allen Herz-Gewebeproben jeweils eine PAS-Färbung angefertigt. Im PAS-gefärbten Herzgewebe zeigten sich bei DOCA-behandelten Tieren deutlich hypertrophe Kardiomyozyten sowie interstitiell Infiltration und Fibroseherde (**Abbildung 25**).

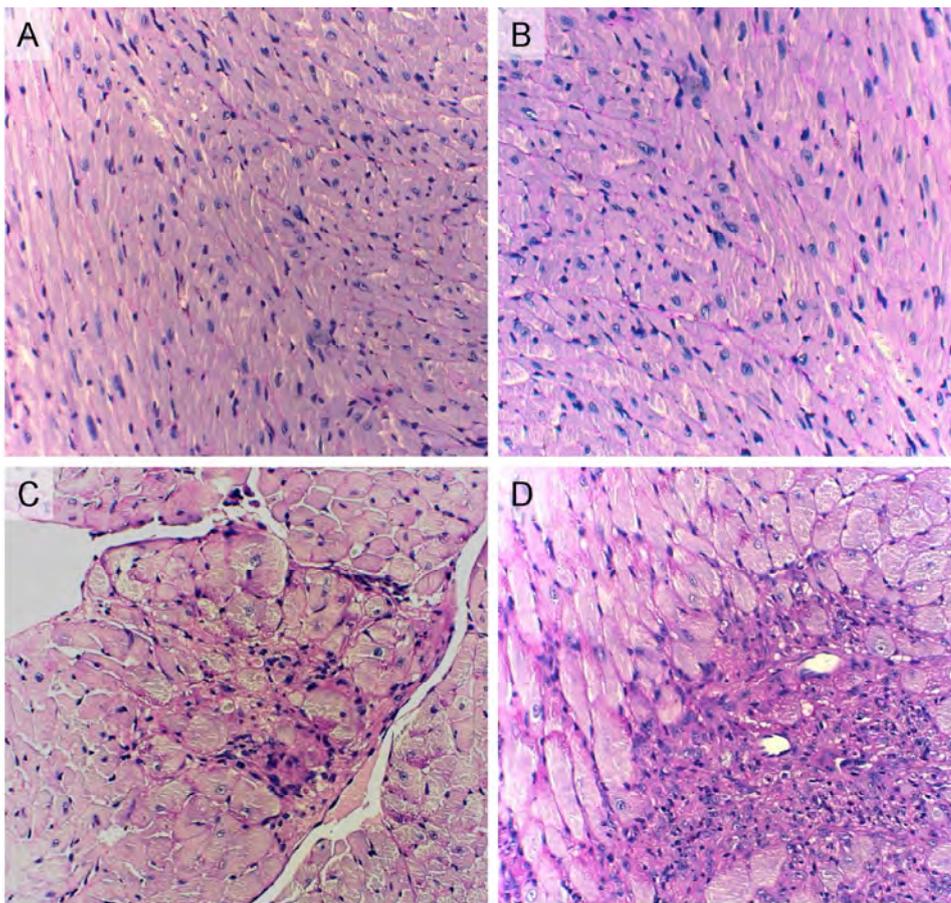


Abb. 25: PAS-Färbung von Herzgewebe. (A) Kontrolltier cre- ; (B) Kontrolltier cre+ ; (C) DOCA-Tier cre- ; (D) DOCA-Tier cre+.

Eine weitergehende Analyse bezüglich Infiltration und Proliferation der Gewebeproben fand statt per immunhistologischem und RT-PCR-Nachweis anhand von Zellen und Zytokinen, die an Proinflammations-, Inflammations- und Proliferationsprozessen beteiligt waren.

4.5. Immunhistologie

Die Gewebeschnitte der aus den unterschiedlichen Gruppen gewonnenen Organe wurden mit der Avidin-Biotin-Methode im Hinblick auf wichtige Zellen proinflammatorischer sowie inflammatorischer und proliferativer Prozesse gefärbt. Das Gewebe wurde auf folgende Marker untersucht:

Auf das zur Familie der CC-Chemokine zählende MCP-1, das im Rahmen proinflammatorischer Änderungen von Endothelzellen, Zellen der glatten Muskulatur und Tubuluszellen exprimiert wird, chemoattraktiv auf Monozyten wirkt und für deren Rekrutierung zum Ort einer Entzündung sorgt. Weiterhin wurde das Gewebe auf F4/80, als Marker für murine Makrophagen, auf CD3, das von T-Lymphozyten exprimiert wird, als weiterer Entzündungszellmarker, und Ki-67 als Marker für proliferative Aktivität von Zellen untersucht.

In den folgenden Abbildungen sind Avidin-Biotin-positive Farbreaktionen auf die oben angeführten Antigene als rot gefärbte Areale erkennbar, während sich die Zellkerne blau darstellen.

4.5.1. MCP-1, F4-80 und CD3+

Die Infiltration des Nierengewebes durch mononukleäre Zellen wie Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen ist die Voraussetzung für das Entstehen der histologischen Veränderungen, die für die chronische Nephropathie charakteristisch sind. Ihnen wird die Induktion von Glomerulosklerose und interstitieller Fibrose zugeschrieben.

Die Überladung der proximalen Tubuluszellen mit Albumin stimuliert die Transkription des MCP-1-Gens [37]. In den Nieren der Tiere, bei denen mittels DOCA-release-pellet, Uninephrektomie und NaCl-Trinklösung dauerhaft ein signifikant erhöhter Blutdruck induziert worden war, zeigten sich deutliche Farbreaktionen für MCP-1. **Abbildung 26** zeigt die immunhistochemische Färbung von Nierengewebe eines cre-negativen (**A**) und eines cre-positiven (**B**) Tieres aus der DOCA-Gruppe mit einem Antikörper gegen MCP-1.

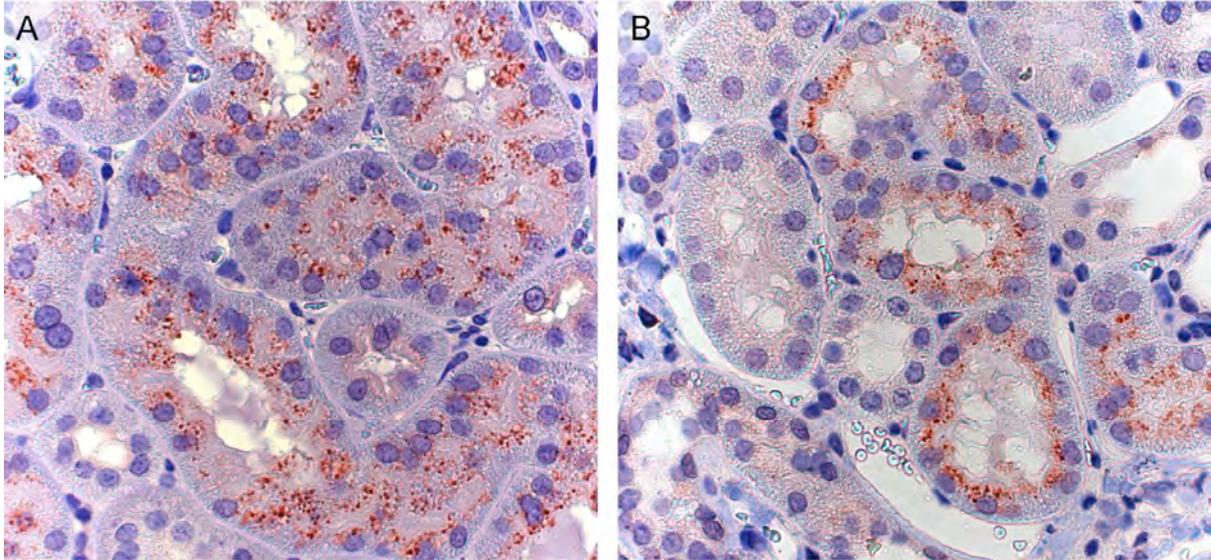


Abb. 26: Immunhistologischer Nachweis von MCP-1-Expression in der Niere (A) eines cre-negativen und (B) eines cre-positiven Tieres nach 6 Wochen DOCA.

MCP-1-positiv färbten sich Tubuluszellen sowohl der cre-positiven als auch der cre-negativen DOCA-behandelten Tiere an. Sichtbar wurde eine etwas weniger stark ausgeprägte MCP-1-Expression in den Tubuluszellen der Niere der cre-positiven (B) Tiere als der cre-negativen Tiere (A);

Zur Quantifizierung der MCP-1-Expression im Nierengewebe wurden alle positiven Signale in jeweils zehn zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern pro Schnitt ausgezählt und der Mittelwert errechnet (Abb. 27).

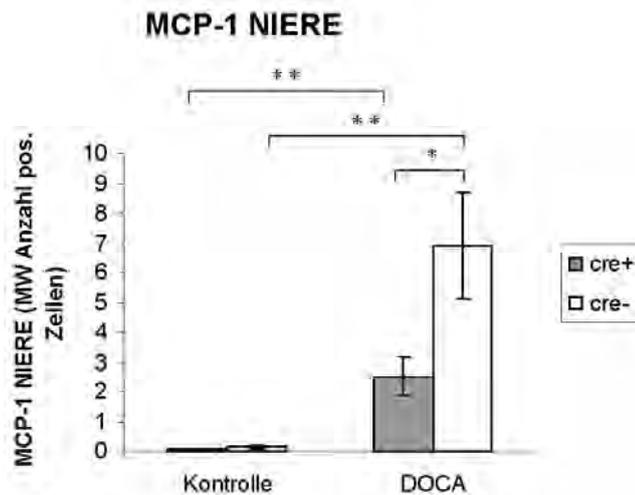


Abb. 27: MCP-1-Expression in der Niere bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA- und der Kontrollgruppe. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM der Anzahl positiv markierter Zellen pro Gesichtsfeld (GF) aus 10 zufällig gewählten GF in Gewebeschnitten cre-positiver (grau) und cre-negativer (weiß) Tiere. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$.

Während die Anzahl positiver Zellen in den Nieren der Kontrolltiere bei $0,04 \pm 0,04$ (cre+) bzw. $0,11 \pm 0,08$ (cre-) pro Gesichtsfeld lag, war sie signifikant ($P \leq 0,01$) höher bei den Tieren der jeweiligen DOCA-Gruppe (cre+: $2,5 \pm 0,65$ /cre-: $6,89 \pm 1,78$). Dabei zeigten die cre-negativen Tiere der DOCA-Gruppe eine signifikant ($P \leq 0,05$) ausgeprägtere MCP-1-Expression als die cre-positiven Tiere.

Abbildung 28 zeigt die immunhistochemische Färbung von Nierengewebe eines cre-negativen (A) und eines cre-positiven (B) DOCA-behandelten Tieres mit einem Antikörper gegen das von murinen Makrophagen exprimierte F4-80.

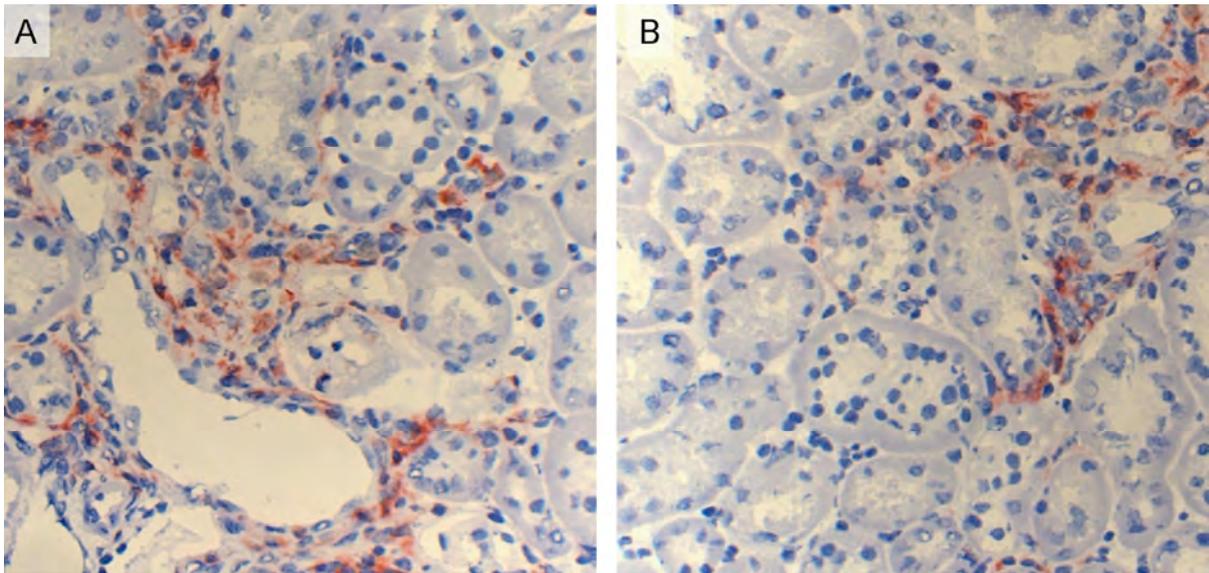


Abb. 28: Immunhistologischer Nachweis für Makrophagen per F4-80-Färbung am Kryoschnitt von Nierengewebe. (A) cre- negatives (B) cre- positives Tier nach 6 Wochen DOCA.

F4-80-positive Zellen waren im Interstitium sowohl cre-negativer als auch cre-positiver Tiere zu finden. Auch für F4-80 zeigte sich eine stärker ausgeprägte Expression im Nierengewebe der cre-negativen Tiere (**A**) als der cre-positiven Tiere (**B**). Die Quantifizierung der F4-80-Expression unter Einbezug der Werte der Kontrollgruppe ist in **Abbildung 29** grafisch dargestellt.

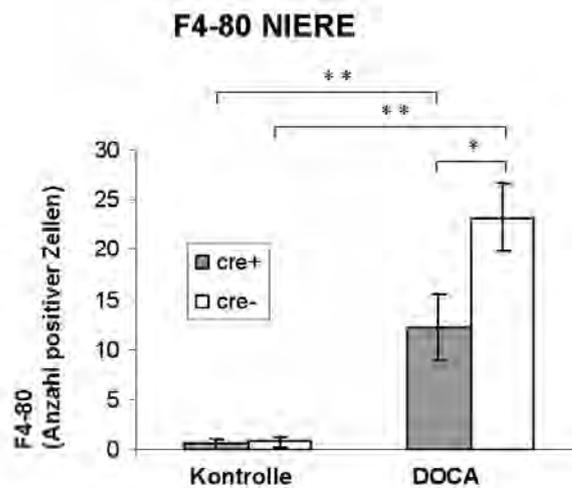


Abb. 29: F4-80-Expression in der Niere bei cre-negativen und cre-positiven Tieren der DOCA-Gruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM der Anzahl positiv markierter Zellen pro Gesichtsfeld (GF) aus 10 zufällig gewählten GF in Gewebeschnitten cre-positiver (grau) und cre-negativer (weiß) Tiere. ** $P \leq 0,01$.

Die cre-negativen Tiere ($22,03 \pm 3,61$ F4-80-positive Zellen pro GF) der DOCA-Gruppe wiesen eine signifikant ($P \leq 0,01$) ausgeprägtere F4-80-Expression in der Niere als die cre-positiven Tiere ($12,71 \pm 3,34$ F4-80-positive Zellen pro GF) auf und hatten damit beide signifikant ($P \leq 0,05$) höhere Werte positiver Signale als die jeweiligen Kontrolltiere (cre+: $0,53 \pm 0,47$ /cre-: $0,73 \pm 0,57$).

Abbildung 30 zeigt die immunhistochemische Färbung von Nierengewebe eines cre-negativen (**A**) und eines cre-positiven (**B**) Tieres mit einem Antikörper gegen CD3 als T-Zell-Marker.

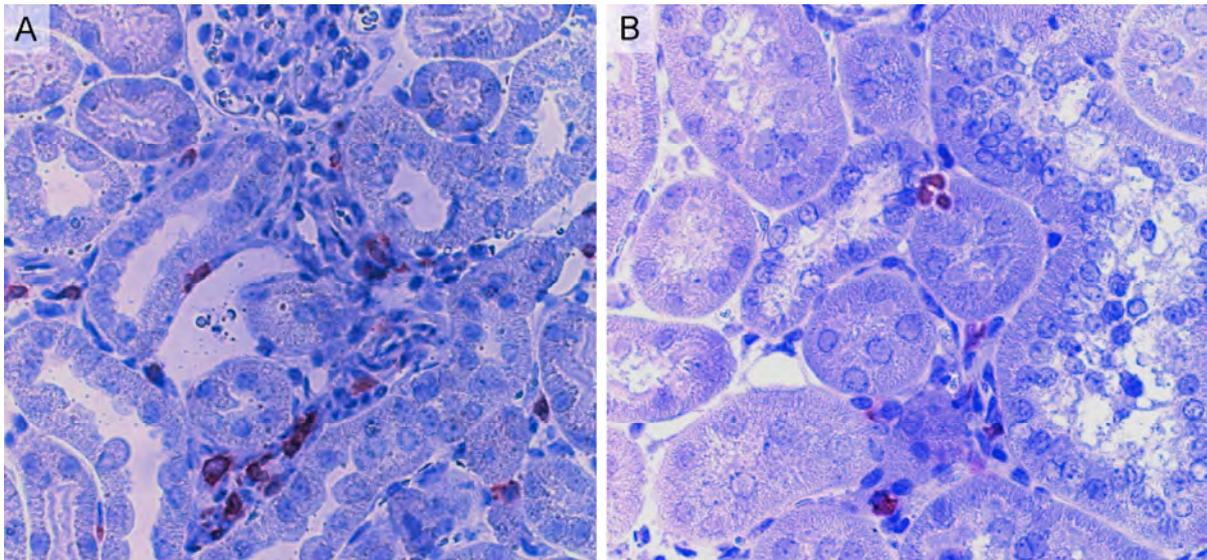


Abb. 30: Immunhistologischer Nachweis von T-Lymphozyten-Infiltration über CD3-Färbung in Nierengewebe. (A) cre-negatives (B) cre-positives Tier nach 6 Wochen DOCA.

CD3-positive Zellen waren bei cre-positiven wie bei cre-negativen Tieren im Interstitium, vor allem in Gefäßnähe, zu finden. Sichtbar auch bei der Färbung auf CD-3 eine stärker ausgeprägte Expression im Nierengewebe der cre-negativen Tiere (A) als der cre-positiven Tiere (B).

Abbildung 31 zeigt die Auswertung der immunhistochemischen Färbung von Nierengewebe cre-positiver und -negativer Tiere von DOCA- und Kontrollgruppe gegen CD3 als T-Zell-Marker.

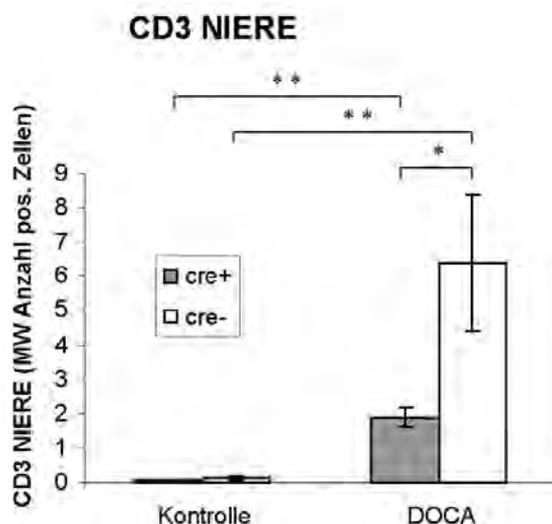


Abb. 31: CD3-Expression in der Niere bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-Gruppe zum Zeitpunkt des Versuchendes. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM der Anzahl positiv markierter Zellen pro Gesichtsfeld (GF) aus 10 zufällig gewählten GF in Gewebeschnitten cre-positiver (grau) und cre-negativer (weiß) Tiere. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

Die cre-negativen Tiere ($9,5 \pm 1,51$ CD3-positive Zellen pro GF) der DOCA-Gruppe wiesen eine signifikant ($P \leq 0,05$) ausgeprägtere CD3-Expression in der Niere als die cre-positiven Tiere ($4,13 \pm 1,41$ CD3-positive Zellen pro GF) auf und hatten damit beide signifikant ($P \leq 0,01$) höhere Werte positiver Signale als die jeweiligen Kontrolltiere (cre+: $0,1 \pm 0,09$ / cre-: $0,14 \pm 0,1$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl der proinflammatorische Marker MCP-1 als auch die beiden Entzündungszellmarker F4/80 (murine Makrophagen) und das von T-Lymphozyten exprimierte CD3 im Nierengewebe der DOCA-Tiere signifikant ($P \leq 0,01$) erhöht waren; dabei waren signifikant ($P \leq 0,05$) mehr positive Signale im Nierengewebe cre-negativer DOCA-Tiere als im Nierengewebe der cre-positiven DOCA-Tiere auszuzählen.

4.5.2. Ki-67

Als Proliferationsmarker erlaubt das nukleäre Protein Ki-67 eine Beurteilung der Wachstumsaktivität des untersuchten Gewebes.

Abbildung 32 zeigt die immunhistochemische Färbung von Nierengewebe eines cre-negativen (**A**) und eines cre-positiven (**B**) Tieres mit einem Antikörper gegen Ki-67.

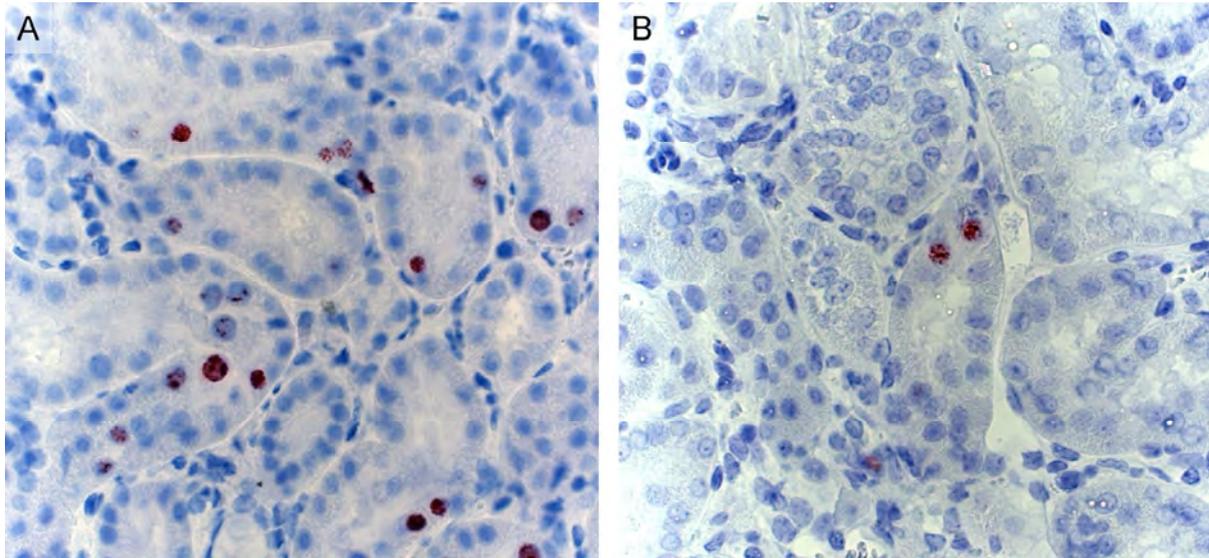


Abb. 32: Immunhistologischer Nachweis für proliferative Aktivität per Ki-67-Färbung in der Niere cre-negativer (A) und -positiver (B) Tiere nach 6 Wochen DOCA. 400-fache Vergrößerung.

Ki-67-positive, proliferierende Zellen waren bei beiden Gruppen vor allem in Tubuli und Interstitium zu finden. Sichtbar war auch bei der Anfärbung auf Ki-67 eine stärker ausgeprägte Expression im Nierengewebe der cre-negativen Tiere (A) als der cre-positiven Tiere (B).

Abbildung 33 zeigt die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen des Nierengewebes cre-positiver und -negativer Tiere von DOCA- und Kontrollgruppe mit dem Antikörper gegen Ki-67 als Proliferationsmarker.

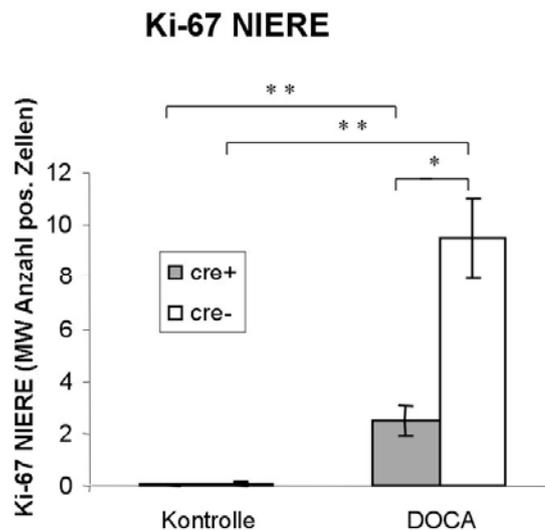


Abb. 33: Ki-67-Expression in der Niere bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-Gruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM der Anzahl positiv markierter Zellen pro Gesichtsfeld (GF) aus 10 zufällig gewählten GF in Gewebeschnitten cre-positiver (grau) und cre-negativer (weiß) Tiere. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

Positive Signale fielen auch bei der Anfärbung des Herzgewebes auf den Proliferationsmarker Ki-67 auf. **Abbildung 34** zeigt die immunhistochemische Färbung von Herzgewebe eines cre-negativen (**A**) und eines cre-positiven (**B**) Tieres mit einem Antikörper gegen Ki-67. Ki-67-positive Zellen waren hier vorwiegend im Interstitium zu finden, jedoch wurde auf eine weitergehende Auswertung der Herzgewebeschnitte verzichtet, da der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der Niere liegt.

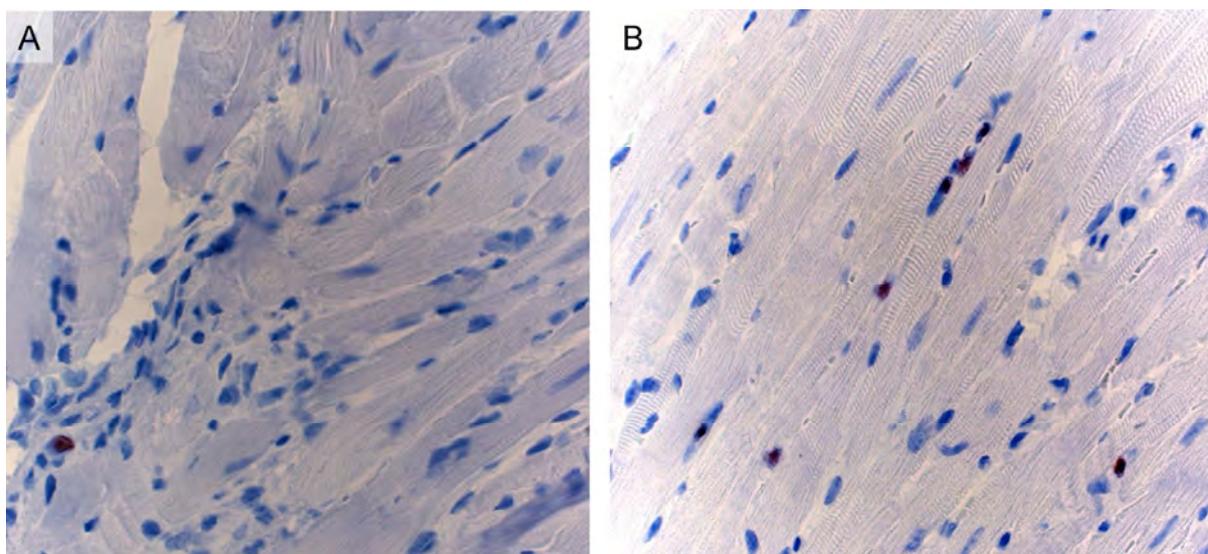


Abb. 34: Immunhistologischer Nachweis für proliferative Aktivität per Ki-67-Färbung im Herzgewebe cre-negativer (A) und -positiver (B) Tiere nach 6 Wochen DOCA. 400-fache Vergrößerung.

4.6. Genexpressionsanalyse

Zur Verifizierung des immunhistologischen Ergebnisses wurde die renale Expression der mRNA für MCP-1 per Real-Time-PCR (RT-PCR) evaluiert. Zusätzlich wurden in die Messungen mit aufgenommen das profibrotische Zytokin TGF- β (Transforming Growth factor) und Kollagen III, dessen Expression durch TGF- β induziert wird.

4.6.1. MCP-1-, TGF- β - und Kollagen III- mRNA

Im Nierengewebe der cre-positiven DOCA-behandelten Tiere war eine 7,1-fach höhere MCP-1-Expression als in der cre-positiven Kontrollgruppe zu messen, während die cre-negativen Tiere eine 8,6-fach höhere MCP-1-Expression als ihre Kontrollgruppe aufwiesen und damit statistisch signifikant ($P \leq 0,05$) höher als die cre-negativen Tiere lagen. Innerhalb der Gruppe der DOCA-behandelten Tiere zeigten die cre-negativen Tiere eine signifikant ($P \leq 0,05$) höhere MCP-1-mRNA-Expression als die cre-positiven Tiere (**Abbildung 35**).

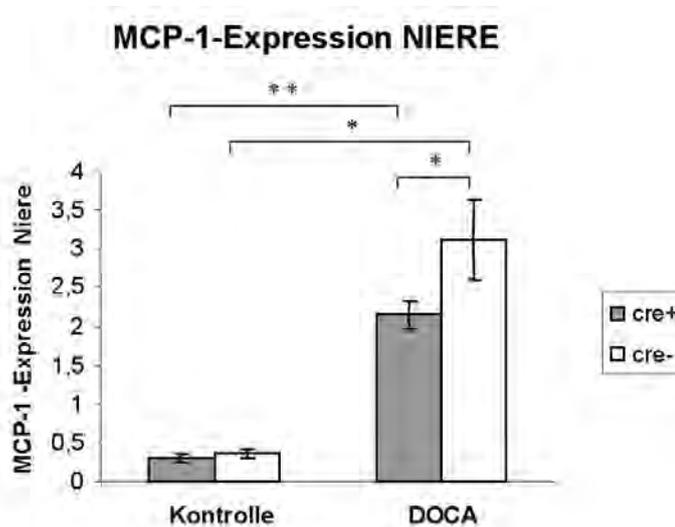


Abb. 35: MCP-1-mRNA-Expression in der Niere bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-Gruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

Ähnlich verhielt es sich bei der Evaluation der renalen Expression von TGF- β -mRNA: Im Nierengewebe der cre-positiven DOCA-behandelten Tiere war eine 1,7-fach höhere TGF- β -Expression als in der cre-positiven Kontrollgruppe zu messen. Die cre-negativen Tiere zeigten eine 1,8-fach höhere TGF- β -Expression als ihre Kontrollgruppe und waren damit statistisch signifikant ($P \leq 0,05$) höher als die cre-negativen Tiere. Innerhalb der Gruppe der DOCA-behandelten Tiere zeigten die cre-negativen Tiere eine signifikant ($P \leq 0,05$) höhere TGF- β -mRNA-Expression als die cre-positiven Tiere (**Abbildung 36**).

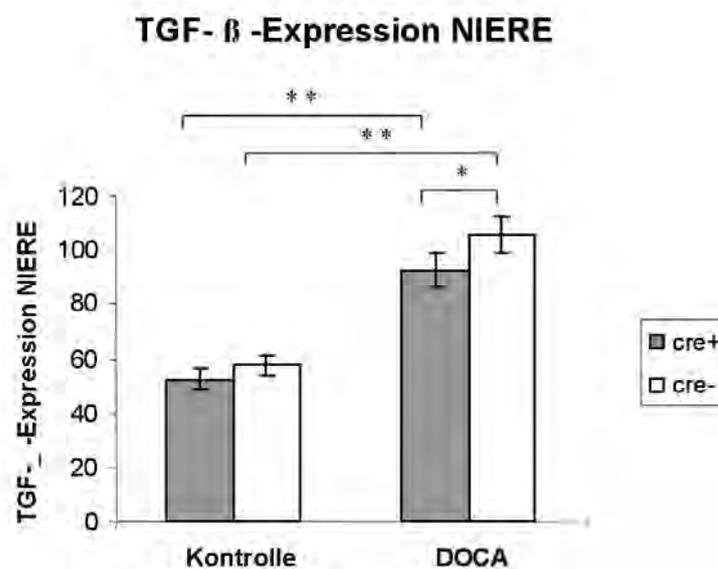


Abb. 36: TGF- β -mRNA-Expression in der Niere bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-Gruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Bei der Evaluation der renalen Expression von Kollagen-III-mRNA zeigte sich bei der Gruppe cre-positiver DOCA-behandelter Tiere eine 6,6-fach höhere Expression als in der cre-positiven Kontrollgruppe, während die cre-negativen Tiere eine 10,11-fach höhere Kollagen-III-Expression als ihre Kontrollgruppe aufwiesen und damit ebenso statistisch signifikant ($P \leq 0,05$) höher als die cre-negativen Tiere lagen. Innerhalb der Gruppe der DOCA-behandelten Tiere zeigten die cre-negativen Tiere eine signifikant ($P \leq 0,05$) höhere Kollagen-III-mRNA-Expression als die cre-positiven Tiere (**Abbildung 37**).

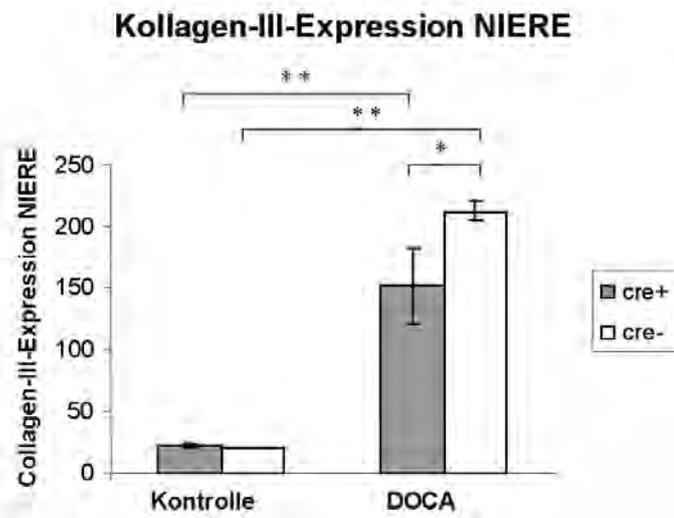


Abb. 37: Kollagen-III-mRNA-Expression in der Niere bei cre-positiven und -negativen Tieren der DOCA-Gruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

5. DISKUSSION

In unserem Experiment wurden Tiere einer nierenspezifisch Megalin-defizienten Mauslinie mit dem Modell der DOCA-induzierten hypertensiven Nephropathie konfrontiert. Ziel war es, die Megalin-vermittelte Proteinrückresorption in der proximalen Tubuluszelle als möglichen zentralen regulatorischen Mechanismus bei der Pathogenese und Progression von Nephropathien zu untersuchen. Neben telemetrischer Messung des Bluthochdrucks wurden Nierenfunktionsparameter bestimmt, eine patho- und immunhistologische Analyse des Nierengewebes sowie eine Genexpressionsanalyse hinsichtlich proinflammatorischer und profibrotischer Marker durchgeführt. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf dem Vergleich Megalin-defizienter (cre+) und nicht Megalin-defizienter (cre-) Phänotypen.

Durch DOCA-Implantation konnten wir unabhängig vom Megalin-Phänotyp eine dauerhaft signifikante Erhöhung des Blutdrucks bei gleichbleibender Herzfrequenz induzieren. Die DOCA-behandelten Tiere entwickelten im Laufe des Versuchs signifikant geringere Körpergewichte bei höheren relativen Nieren- und Herzgewichten im Vergleich zur uninephrektomierten Kontrollgruppe. Cre-positive Tiere der DOCA-Gruppe wiesen ein tendenziell geringeres relatives Nierengewicht sowie höheres relatives Herzgewicht als die cre-negativen Tiere der DOCA-Gruppe auf. DOCA-Behandlung führte bei allen Tieren zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion, welche jedoch nur bei cre-negativen Tieren signifikant abnahm. Außerdem führte DOCA zu den erwarteten Serumelektrolytverschiebungen. Der Albumin-Spiegel im Serum war bei allen Tieren der DOCA-Gruppe unabhängig vom Megalin-Phänotyp signifikant erniedrigt. Parallel dazu entwickelten die Tiere eine signifikante Zunahme der Natrium-, Kalium- und Albumin-Exkretion bei gesteigerter Diurese. Megalin-defiziente Phänotypen zeigten bezüglich aller untersuchten Urin-Parameter tendenziell höhere Exkretionswerte als die nicht defizienten Tiere.

DOCA-Behandlung induzierte eine gesteigerte inflammatorische Antwort, die immunhistologisch durch signifikant stärkere Infiltration des Nierengewebes mit Makrophagen und T-Lymphozyten sowie erhöhte Expression des proinflammatorischen Zytokins MCP-1 nachgewiesen wurde. Auch der Proliferationsmarker Ki-67 konnte signifikant stärker exprimiert bei Doca-behandelten Tieren nachgewiesen werden. Megalin-Defizienz resultierte in einer signifikant geringer ausgeprägten Entzündungs- und Proliferationsreaktion. Analog hierzu wiesen Megalin-defiziente Tiere in der Genexpressionsanalyse eine geringere Aktivierung von MCP-1 und der profibrotischen Marker TGF- β und Kollagen III auf.

5.1. Megalin und renale Fibrose

Durch chronische Entzündung induzierte Organfibrosen mit progredientem Funktionsverlust sind ein nach wie vor ungelöstes therapeutisches Problem in der Nephrologie. In vielen Fällen ist der transplantationsmedizinische Organersatz letztes Mittel, um die Lebensqualität der Patienten in befriedigendem Umfang aufrechterhalten zu können. Chronische Entzündungen im Nierengewebe mit nachfolgender fibrotischer Vernarbung entwickeln sich nach primärer glomerulärer Schädigung in Regionen, in denen proximale Tubuluszellen mit Proteinen aus dem glomerulären Filtrat überladen werden, unabhängig von der Natur der Primärschädigung [6]. Die durch den Rezeptor Megalin vermittelte Endozytose der Proteine in die proximale Tubuluszelle und die Weiterverarbeitung durch den Endozytose-Apparat könnten grundlegende Voraussetzung für entzündliche Signale sein, die zur interstitiellen Fibrose führen. Eine Blockade der Protein-Endozytose könnte daher die physiologische Funktion erhalten und der tubulointerstitiellen Fibrose sowie dem Funktionsverlust entgegenwirken.

Zur Überprüfung dieser Hypothese fand das neu generierte Tiermodell der nierenspezifisch-Megalin-defizienten Maus Anwendung, indem in Megalin-defizienten Tieren eine progrediente Nephropathie induziert wurde. Der Schweregrad der Nephropathie in Abhängigkeit von der Megalin-Defizienz wurde anhand von Nierenfunktionsparametern, Histomorphologie, Immunhistologie und Genexpressionsanalyse bestimmt.

5.2. Die nierenspezifisch-Megalin-defiziente-Maus als Tiermodell

Zuallererst stellt sich bei der tierexperimentellen Arbeit stets die Frage nach Alternativen zum Versuch am lebenden Organismus. Physiologische Fragestellungen bieten in dieser Hinsicht nur wenig Handlungsspielraum. Aus der verfügbaren Literatur [93, 94] und persönlicher Kommunikation mit anderen Gruppen (T. Willnow und E.I. Christensen) ist bekannt, dass die aus in-vitro Experimenten an primären Kulturen von proximalen Tubuluszellen und unterschiedlichen, kommerziell erhältlichen Tubuluszelllinien gewonnenen Ergebnisse keineswegs auf die in vivo Situation übertragbar sind. Ein zentrales Problem bei der Untersuchung von Tubuluszellen ist der Verlust der Polarität dieser hochspezialisierten Zellpopulation durch die Präparation aus dem Gewebsverband und anschließende Kultivierung. Insbesondere polar exprimierte Proteine wie Megalin können die polare Lokalisation verlieren oder generell nicht mehr exprimiert werden. Weiterhin handelt es sich bei den zugrunde liegenden Fragestellungen des vorliegenden Versuchsvorhabens um komplexe pathophysiologische

Vorgänge, welche sich nur tierexperimentell im lebenden Organismus untersuchen lassen. Für das Fortschreiten chronischer Nephropathien spielen systemische Veränderungen wie der arterielle Hypertonus eine Schlüsselrolle. Die Blutdruckregulation unterliegt in ihrer Funktion dem Einfluss des autonomen Nervensystems und des endokrinen Systems. Dieser Einfluss ist an isolierten Organen unterbrochen. Es handelt sich bei den zu untersuchenden Vorgängen somit um ein komplexes Geschehen im Gesamtorganismus, das die Fokussierung auf nur ein Organ bzw. Organsystem nicht zulässt. Daher war die Durchführung der Experimente am lebenden Tier unumgänglich.

Zur Anwendung kam das Tiermodell der nierenspezifisch-Megalin-defizienten Maus. Mit diesem Modell steht erstmals ein methodischer Ansatz zur Verfügung, mit dem ein einzelner tubulärer Resorptionsmechanismus aus der Komplexität aller herausgegriffen und untersucht werden kann.

Das Tiermodell der nierenspezifisch-Megalin-defizienten Maus wurde auf der Basis zweier Tierstämme gezüchtet. Dabei wurde ein Cre-Stamm zur gewebsspezifischen Rekombination in Tiere mit gefloxtem Megalinen eingekreuzt. Bei den so gezüchteten Tieren kann die Restexpression des Megalings von Individuum zu Individuum unterschiedlich sein [95]. Deshalb wurde bei allen verwendeten Tieren neben einem Test auf das Vorhandensein des cre-Gens per Southernblot-Methode mittels DNA aus der Schwanzspitze auch der Phänotyp charakterisiert [9, 95]. Hierfür wurde mit Westernblot die Änderung der Ausscheidung des Megalin-Liganden, Vitamin-D-bindendes Protein (DBP), im Urin getestet [96]. Aus den als cre-positiv genotypisierten Tieren wurden für die Experimente Phänotypen gewählt, die deutlich DBP-positiv im Urin waren, um eine möglichst homogene Gruppe zu erhalten. Bezüglich der basalen Albuminurie trat bei cre-positiven Tieren eine breite Varianz auf (siehe **4.1.3.2, Abbildung 21**). Die Albuminurie bei cre-positiven Tieren war im Mittel signifikant höher als bei cre-negativen Tieren, was auf einen gesteigerten tubulären Verlust hindeutet.

Mit dem eingesetzten Tiermodell ließen sich die pathophysiologischen Zusammenhänge untersuchen zwischen Megalin-Rezeptor-vermittelter Endozytose von Proteinen in die proximale Tubuluszelle, der Weiterverarbeitung durch den Endozytose-Apparat und entzündlichen Signalen infolge tubulärer Proteinablagerung, die zur interstitiellen Fibrose führen.

5.3. Die DOCA-induzierte hypertensive Nephropathie als Modell der chronisch-progredienten Nephropathie

Der irreversible Funktionsverlust durch Zerstörung des Nierenparenchyms ist die gemeinsame Endstrecke aller mit chronischer Proteinurie einhergehenden Nephropathien, unabhängig von der Ursache der primären Schädigung [6]. Die DOCA-induzierte hypertensive Nephropathie ist ein etabliertes Modell einer progredienten Nephropathie mit glomerulärer Primärschädigung und sekundär interstitiell vernarbender Entzündung. Wir haben uns für dieses Modell der hypertensiven Nephropathie entschieden, weil neben der diabetischen Nephropathie Bluthochdruck die häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz beim Menschen darstellt [6]. Ein suffizientes murines Modell einer diabetischen Nephropathie stand außerdem zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns nicht zur Verfügung; beim Modell des Streptozocin-induzierten Diabetes war eine reproduzierbare Induktion einer Glomerulosklerose nicht hinreichend etabliert [97].

Das DOCA-Salz-Modell zur Induktion einer hypertensiven Nephropathie bei der Ratte, das erstmals 1943 von Selye et al. mit den einzelnen Stadien der Erkrankung beschrieben [30] wurde, ist später von der Ratte auf die Maus übertragen und stellt mittlerweile ein etabliertes, vielfach verwendetes Bluthochdruck-Modell dar. Das Mineralocorticoid DOCA induziert als Aldosteron-Agonist über Stimulation der tubulären Na^+ -Reabsorption in Kombination mit der Gabe 1%iger NaCl-Trinklösung eine dauerhafte Erhöhung des Blutdrucks und führt so innerhalb von wenigen Wochen zu einer ausgeprägten Albuminurie; histologisch finden sich bei DOCA-behandelten Tieren glomeruläre Sklerosen, tubuläre Proteineinschlüsse und Atrophien sowie interstitielle Entzündung und Fibrose [12], [20], [21]. Das Mineralocorticoid DOCA-Salz als Aldosteron-Agonist in Kombination mit einer Salz-Diät (in Form von 1%iger Kochsalzlösung als Trinklösung) führt zu einer salzabhängigen Form der Hypertonie bereits binnen 3 Wochen. DOCA steigert durch Aktivierung von Natrium- und Kalium-Kanälen sowie der Natrium-Kalium-ATPase an der luminalen Membran der Tubuluszellen die Natrium-Retention und Kalium-Sekretion [21, 22]. Durch die vermehrte Retention von Natrium wird auch Wasser zurückgehalten [23], so dass als Endeffekt u.a. ein Anstieg des Extrazellulärvolumens resultiert. Dies bewirkt eine Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems (RAAS) und verringert so Durst und Salz-Appetit; es kommt zur Vasodilatation, NaCl- und Wasserausscheidung werden stimuliert. Dadurch, dass die Tiere gleichzeitig zum DOCA-Implantat ausschließlich 1%ige NaCl-Lösung zu trinken erhalten, wird die Salz- und damit auch die Wasseraufnahme wieder gesteigert. Im Verlauf des Versuchs kommt es zu einer sich ständig steigenden Wasser- und Natriumaufnahme sowie Wasser-, Natrium- und

Kalium-Exkretion, während Natrium- und Wasserretention sich ebenfalls weiter erhöhen und das Extrazellulärvolumen ansteigt. Dauerhafte Erhöhung des Blutdrucks und Hyperfiltration im Glomerulum resultieren dann in einer Schädigung des glomerulären Filters.

Generell kommt es infolge der durch den glomerulären Schaden bedingten massiven Proteinurie zur Proteinüberladung der proximalen Tubuluszellen [6], [37], [98], [6, 99], [100]; die Proteinüberladung stimuliert die Produktion der Chemokine MCP-1 und RANTES, die Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten rekrutieren [37]. Makrophagen sind wesentliche zelluläre Mediatoren des fibrotischen Gewebeumbaus [101], Akkumulation der Makrophagen führt zur Proliferation von Fibroblasten, einer erhöhten Synthese extrazellulärer Matrix und Entzündung.

Ein Vorteil des gewählten Modells der DOCA-Nephropathie liegt im nichtimmunologischen Charakter der induzierten glomerulären Schädigung. Die Schädigung des Glomerulums erfolgt bei der DOCA-induzierten hypertensiven Nephropathie ohne Beteiligung einer systemischen Immunreaktion. So kann die im Rahmen der Nephropathie entstandene renale Entzündungsreaktion [51] nicht von einer systemischen immunologischen Reaktion als primärer Schädigung beeinflusst werden. Im Unterschied zu den anderen verfügbaren nicht immunologischen Modellen eignet sich das DOCA-Modell auch besonders deshalb, weil der arterielle Hypertonus als häufigster pathophysiologischer Stimulus den Nierenschaden auslöst.

Der chronische Charakter des Modells ermöglicht die Untersuchung einer progredienten, mit persistierender Albuminurie verbundenen Nierenschädigung mit begleitender Infiltration von inflammatorischen Zellen und der daraus resultierenden interstitiellen Fibrose. Innerhalb von 6-wöchiger Behandlung bildet sich ein umfangreicher glomerulärer und tubulointerstitieller Schaden [12]. Während neuerdings das DOCA-Modell auch mit einer Dauer von 9 oder 12 Wochen angewandt wird [21] reichte für unsere Untersuchungen, aufgrund der nach diesem Zeitraum bereits erhaltenen Schädigungen der Niere, ein Beobachtungszeitraum von 6 Wochen, was auch die etablierteste Dauer in diesem Modell ist. Unter all diesen Gesichtspunkten erschien das Modell der DOCA-induzierten Nephropathie geeignet, um Effekte des Fehlens von Megalin auf den Verlauf der primären glomerulären Entzündung und der folgenden sekundären interstitiellen Nephritis und Fibrose zu untersuchen.

Von besonderer Bedeutung bei der Wahl des Modells für die Überprüfung des therapeutischen Wertes einer Megalin-Blockade beim Menschen ist die Tatsache, dass die DOCA-induzierte Nephropathie im Verlauf glomerulärer und interstitieller Veränderungen den

Verlauf chronischer proteinurischer Nierenerkrankungen beim Menschen sehr gut widerspiegelt [21], [30].

5.4. Megalin-Defizienz reduziert den Nierenfunktionsverlust bei chronisch progredienter Nephropathie

DOCA-Salz-Behandlung führte zu einer dauerhaften und signifikanten Erhöhung des Blutdrucks ohne signifikante Unterschiede zwischen cre-positiven und cre-negativen Tieren. Mit der DOCA-induzierten Hypertonie ging eine signifikante Verschlechterung der Nieren-Funktionsparameter sowie eine deutliche Senkung des Serum-Kaliumspiegels einher. Natrium- und Kalium-Exkretion sowie Urinmenge waren bei allen DOCA-behandelten Tieren stark erhöht. Diese funktionellen Veränderungen sind vergleichbar mit Ergebnissen aus anderen experimentellen Arbeiten zum DOCA-Modell [102] und anderen vergleichbaren Nephropathie-Modellen wie z.B. der Adriamycin-induzierten Nephropathie [29]. Analog hierzu führte DOCA-Behandlung bei Tieren mit intakter Megalin-Expression zu einer signifikanten Reduktion der Kreatinin-Clearance. Dagegen war dieser Funktionsverlust beim Megalin-defizienten Phänotyp deutlich geringer ausgeprägt und nicht signifikant. Diese Resultate unterstützen die Annahme, dass der Megalin-Rezeptor einen Einfluss auf die Progression der Erkrankung im verwendeten Modell hat und eine mögliche protektive Wirkung durch eine reduzierte Proteinrückresorption ins Tubulointerstitium ausübt [37].

Relevant für die Interpretation der funktionellen Unterschiede ist eine von der Proteinrückresorption über Megalin unabhängige DOCA-Wirkung. Unterschiedliche Wirkmechanismen und -lokalisationen in den einzelnen Nephronsegmenten sowie differente Transport- und Metabolisierungsprozesse der Mineralokortikoide sprechen für eine unabhängige Wirkweise. Bestätigt wird dies durch parallele Veränderungen im Elektrolythaushalt und Blutdruck beider Untersuchungsgruppen als unmittelbarer Effektoren der Mineralokortikoidwirkung. Die unter **5.3.** beschriebenen pathophysiologisch relevanten Änderungen der Elektrolytresorption und -sekretion unter dem Einfluss von DOCA finden im proximalen und distalen Tubulus sowie in der Henle'schen Schleife über verschiedene aktive und passive Mechanismen statt. Die Protein-Endozytose über Megalin erfolgt ausschließlich im proximalen Tubulus. In diesem Nephron-Abschnitt läuft die Elektrolytresorption und -sekretion vorrangig über passive, gradientenabhängige Mechanismen ab, die unabhängig vom DOCA stattfinden. Die pathogenetische Wirkung von DOCA auf Elektrolytauscheidung im Urin und Blutdruck war in den untersuchten Gruppen unabhängig von der Megalin-Expression. Das strukturelle Analogon im Organismus zum eingesetzten Mineralokortikoid DOCA ist

Aldosteron. Im Gegensatz zu anderen Steroidhormonen wird Aldosteron im Blut nur zu 65 % an Albumin und in geringem Maße an das Transportprotein Transcortin (THUN 1987) gebunden. Es besitzt somit eine hohe Bioverfügbarkeit. Wirkung und Metabolismus werden durch die Ausscheidung niedermolekularer Proteine nicht wesentlich beeinflusst. Die Serum- und Urinspiegel von Albumin waren in Megalin-defizienten Tieren nicht signifikant verändert. Zusammenfassend lässt sich deshalb schlussfolgern, dass die Verbesserung der Nierenfunktion bei Megalin-defizienten Tieren über DOCA-unabhängige Mechanismen erfolgte.

5.5. Megalin-Defizienz hat keinen Einfluss auf den glomerulären Schädigungsgrad trotz ausgeprägter Proteinurie

Die histomorphologische Untersuchung des Nierengewebes DOCA-behandelter Tiere wies die charakteristischen Zeichen einer Glomerulosklerose auf. Durch DOCA-Behandlung kam es zur Vermehrung hyaliner Matrix und zum Kollaps von Kapillarschlingen betroffener Glomeruli. DOCA-behandelte Tiere zeigten unabhängig von Megalin einen signifikant höheren Anteil PAS-positiver Areale in den Glomeruli als die Tiere der Kontrollgruppe. Das erzeugte Krankheitsbild war unter anderem charakterisiert durch massive Albuminurie und Hypoalbuminämie.

DOCA-Salz-hypertensive Nephropathie führt zu degenerativen Mechanismen im Glomerulum. Der persistierende glomeruläre Hochdruck bewirkt eine Schädigung der Podozyten. Funktional betrachtet führt dieser Podozytenschaden zum Verlust der Größenselektivität des glomerulären Filters und damit zur exzessiven Ausscheidung von Albumin in den Primärharn [62], [103]. Mikrostrukturell kommt es zu einer stereotypen Abfolge von Schädigungsvorgängen, die zur Störung der Interaktion von Podozyten und Kapillarwand führen und letztlich einen zunehmenden Podozytenverlust zur Folge haben. Die Verringerung der Zelldichte resultiert in einer Hypertrophie der verbleibenden Podozyten, um die Integrität der Filtrationsbarriere zu erhalten. Die erhöhte Belastung der restlichen Podozyten beschleunigt deren Untergang und bildet so schließlich einen *circulus vitiosus*.

Die analogen Schädigungsverläufe im glomerulären Segment bei cre-positiven und -negativen Tieren spiegeln die parallele Entwicklung der Blutdruckwerte in beiden Gruppen wider und unterstreichen die vorrangige Bedeutung des Blutdrucks für die Entwicklung der Glomerulosklerose mit einhergehender Proteinurie. Systemische Blutdrucksteigerung führt konsekutiv zu intraglomerulärem Druckanstieg. Als Folge des chronisch persistierenden physikalischen Stresses im glomerulär-kapillären Bereich manifestiert sich längerfristig eine

Glomerulosklerose. Diese Assoziation zwischen Bluthochdruck und Glomerulosklerosegrad ist aus diversen klinischen und tierexperimentellen Arbeiten bekannt [103], [11], [104] [105].

Folge der massiven glomerulären Schädigung war in beiden Untersuchungsgruppen eine exzessive Zunahme der Proteinurie um bis zu 500 %. Tendenziell lag die Albuminurie bei Megalin-defizienten Tieren höher. Ursache hierfür ist vermutlich, dass neben der reduzierten Rückresorption niedermolekularer Proteine auch die Albuminaufnahme in Tubuluszellen erniedrigt war. Aus den Megalin-abhängigen Veränderungen im Proteinmetabolismus der Niere resultieren möglicherweise die beobachteten protektiven Effekte auf Nierenfunktion und tubulointerstitiellen Schaden, die eine direkte schädigende Wirkung auf die Tubuluszelle durch Proteinüberladung nahe legen [5].

Die hohe Relevanz des Ausmaßes der Proteinurie für die Progression chronischer Nephropathien konnte in diversen klinischen und tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden und ist ein etablierter prognostischer Marker [106],[6]. Es konnte zudem eine direkte Korrelation zwischen tubulointerstitieller Schädigung und Grad der Proteinurie aufgezeigt werden. Diese Korrelation deutet auf eine direkte pathogenetische Wirkung der ausgeschiedenen Proteine auf die Schädigung und Inflammation des Tubulusapparats und des angrenzenden Interstitiums hin. Unterstützt wird diese Theorie durch Interventionsstrategien, die auf eine Reduktion der Eiweißausscheidung abzielen. Die Verringerung der Proteinexkretion verlangsamt oder stoppt das weitere Absinken der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Derzeit üblich zur Therapie der chronisch proteinurischen Nephropathie ist der Einsatz von Blockern des Renin-Angiotensin-Systems, um die Proteinurie zu senken [107], [15], [108]. Eine Intervention auf der Ebene der tubulären Reabsorption stellt somit einen neuartigen Ansatzpunkt bei der Therapie progredienter Nephropathien dar.

Über den organspezifischen Knockout des Megalinrezeptors konnte bei den untersuchten Gruppen erstmals gezeigt werden, dass trotz gleicher glomerulärer Schädigung durch verminderte Proteinrückresorption auf Tubulusebene der Nierenfunktionsverlust aufgehalten werden kann. Dies entschlüsselt nicht nur einen pathogenetischen Mechanismus, sondern eröffnet auch neue Therapiekonzepte.

5.6. Megalin-Defizienz wirkt protektiv und antiinflammatorisch auf das Tubulointerstitium

DOCA-Behandlung führte zu einer massiven Tubulusdilataion mit hyalinen Ausformungen. Ursache dieser Schädigung des Tubulusepithels ist eine Adaption an die DOCA-Salz-

induzierte Volumenbelastung mit konsekutiver glomerulärer Hyperfiltration. Zusätzlich führt die zunehmende Proteinurie bei fortschreitender glomerulärer Schädigung zu einer Eiweißüberladung der Epithelzellen infolge gesteigerter Rückresorption. Megalin-defiziente Tiere wiesen eine signifikant reduzierte Zunahme des Tubulusquerschnitts auf. Parallel zur geringeren Tubulusschädigung fiel die inflammatorische Antwort im Nierenparenchym und umgebenden interstitiellen Gewebe deutlich gemildert bei cre-positiven Tieren aus. Infiltration mit Entzündungszellen, Expression proinflammatorischer und profibrotischer Zytokine sowie der proliferative Gewebeumbau waren signifikant niedriger als bei cre-negativen Tieren.

Bereits in den 1920er Jahren wurden von Vollhard & Fahr sowie Mollendorf & Stohr Proteineinschlüsse in Tubulusepithelzellen mit einem progredienten Nierenfunktionsverlust assoziiert. Seitdem konnte in einer Vielzahl von experimentellen und klinischen Arbeiten ein möglicher Zusammenhang zwischen der Proteinüberladung der Tubuluszellen und Epithelschaden mit entzündlichem Gewebsumbau hergeleitet werden [3]. So führt beispielsweise Koinkubation von proximalen Tubuluszellen mit Plasmaproteinen (Albumin, IgG und Transferrin) zu gesteigerter Expression verschiedener an Entzündung und Umbau beteiligter Zytokine in vitro [8], [109]. Diese Ergebnisse konnten durch Albumininjektion im Tiermodell bestätigt werden. Eiweißüberladung führte bei Ratten zu tubulointerstitieller Entzündung und fibrotischem Umbau [110]. Plasmidbasierte Anti-MCP-1-Gentherapie konnte die beobachteten Veränderungen bessern [111]. In verschiedenen experimentellen Nephropathiemodellen konnte unabhängig vom Schädigungsmechanismus ein Zusammenhang zwischen Akkumulation von Plasmaproteinen in Tubuluszellen und begleitender Gewebeschädigung mit Entzündungsreaktion gezeigt werden [5], [112]. Zudem konnte in klinischen Studien an großen Patientenkollektiven mit chronisch progredienten Nephropathien unterschiedlicher Genese eine enge Korrelation zwischen Grad der Albuminurie, MCP-1-Expression, Makrophageninfiltration und Progredienz der Erkrankung ermittelt werden [113].

Andere Autoren folgern dagegen ausgehend von verschiedenen tierexperimentellen und klinischen Untersuchungen, dass die tubulointerstitielle Entzündung und Degeneration vom geschädigten Glomerulus ausgeht [114], [115].

Erwiesen ist, dass der tubulointerstitiellen Degeneration immer ein glomerulärer Schaden, einhergehend mit exzessiver Proteinurie, vorausgeht. Die Frage, ob Proteinüberladung des Tubulusepithels oder überschießende Proliferation mit Obstruktion am tubuloglomerulären Übergang der initiale Auslöser ist, konnte bisher nicht eindeutig beantwortet werden. Mit den verfügbaren experimentellen Möglichkeiten war eine Klärung dieses entscheidenden

Schlüsselmechanismus nicht möglich. Mit dem Megalin-Knockout-Modell konnte erstmals die Bedeutung der Proteinrückresorption für die Pathogenese des tubulointerstitiellen Umbaus isoliert untersucht werden.

Die beobachteten protektiven Effekte bei reduzierter Megalinexpression hinsichtlich Entzündung, Gewebeumbau und Nierenfunktion unterstreichen einen möglichen direkten pathogenetischen Einfluss der gesteigerten Proteinrückresorption auf die Schädigung tubulärer Epithelzellen und des umgebenden Interstitiums.

5.7. Perspektiven und mögliche therapeutische Konsequenzen

Im Modell der DOCA-Salz-induzierten hypertensiven Nephropathie zeigte Megalin-Defizienz eine nephroprotektive Wirkung. Eine verbesserte Nierenfunktion korrelierte mit histomorphologisch geringeren Schäden im tubulointerstitiellen Segment, einer reduzierten Infiltration von Entzündungszellen und niedrigerer Gewebeexpression inflammatorischer und fibrotischer Zytokine. Innerhalb des 6-wöchigen Beobachtungszeitraums blieb die Progression der Albuminurie und glomerulärer Schäden von der Megalinexpression unbeeinflusst. Die beschriebenen Beobachtungen sprechen für eine wichtige Rolle des Endozytoserezeptors Megalin bei der Proteinrückresorption in die Tubuluszelle und den daraus resultierenden progressiven fibrotischen Prozesse.

Progrediente Nephropathien haben analog zu den vorwiegend zugrunde liegenden Erkrankungen Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie eine kontinuierlich steigende Inzidenz [15]. Mit dem Fortschreiten der Krankheit und Übergang in die terminale Niereninsuffizienz sind ein hoher Verlust an Lebensqualität für den Patienten und erhebliche Kosten für das Gesundheitssystem verbunden. Bisherige therapeutische Interventionen können den Progress nur teilweise verzögern. Die Entwicklung neuer Behandlungsansätze ist deshalb dringend erforderlich. Eine pharmakologische Blockade von Megalin mit einem Antagonisten könnte eine neue Therapiemöglichkeit in der Behandlung chronisch proteinurischer Nierenerkrankungen darstellen.

Ein natürlicher Antagonist der LDL-Receptor-Related-Proteine (LRP), zu denen auch Megalin (LRP2) zählt, ist das Rezeptor-assoziierte Protein (RAP). RAP ist ein 39 kDa großes Protein, das vornehmlich in Gehirn und Leber exprimiert wird. Unter physiologischen Bedingungen befindet sich RAP hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat, während nur ein kleiner Teil in den Endosomen und an der Zelloberfläche lokalisiert ist.

Bei Überexpression von RAP wird dieses von der Zelle sezerniert, gelangt so in den Extrazellulärraum und blockiert über autokrin/parakrine Mechanismen die Funktion von LRPs.

Durch kompetitive Bindung an LDL-Receptor-Related-Protein-1 (LRP1) und LDL-receptor-related-protein-2 (LRP2 oder Megalin) wird die Endozytose anderer Liganden dieser Proteine verhindert [116]. RAP ist an der posttranslationalen Modifikation und dem Transport der Lipoproteinrezeptoren an die Zelloberfläche beteiligt. RAP-Knockout-Mäuse weisen einen unauffälligen Phänotyp auf. In Leber und Gehirn ist die LRP-Expression signifikant reduziert [116].

Eine Blockade von LRP durch RAP konnte bereits *in vitro* beobachtet werden. Bei Fibroblasten konnte durch RAP konzentrationsabhängig die Ligand-Rezeptor-Interaktion blockiert werden [117, 118]. Im Tiermodell konnten LRPs ebenfalls durch RAP erfolgreich blockiert werden. Doppel-Knockout-Mausembryos für LRP sind bereits *in utero* letal. Im adulten Organismus ist die Blockade von LRP jedoch möglich. Per Adenovirus-Vektor konnte RAP-cDNA in die Leber ausgewachsener Mäuse transferiert werden und hatte eine RAP-Überexpression zur Folge. Die so in LDLR-Knockout-Mäusen zusätzlich erzielte LRP-Blockade führte nach einer Woche zu einer deutlich gestörten Clearance von Lipoproteinen sowie dem LRP-spezifischen Liganden α 2-Makroglobulin aus der Zirkulation, während beim Wildtyp diese Veränderungen nicht auftraten [119].

Die dargestellten Ergebnisse aus Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen, dass eine pharmakologische Blockade von Megalin erfolgreich durchgeführt werden kann. Mit RAP steht ein potenter Inhibitor zur Verfügung, der allerdings mit einer wenig spezifischen Inhibition im Organismus verbunden ist. Aufgrund der Vielzahl essentieller Liganden von Megalin und des parallelen Vorkommens in den Zentralorganen Lunge, Gehirn und Niere ist eine dauerhafte systemische Blockade voraussichtlich mit erheblichen unerwünschten Wirkungen verbunden. Im Tiermodell wurde beispielsweise ein signifikanter Anstieg der Plasmaspiegel von Gesamtcholesterol und LDL-Cholesterol beobachtet. Zudem muss mit einem gestörten zellulären Transport verschiedener Vitamine (Cholecalciferol, Cobalamin, Retinol), Hormone (Thyroglobulin, Insulin, PTH) und anderer Plasmaeiweiße gerechnet werden. Insbesondere der bereits *intrauterin* letale, homozygote Megalinknockout zeigt die Notwendigkeit einer organspezifischen Intervention, um Eingriffe in zentrale vitale Stoffwechselprozesse zu vermeiden.

Bisher steht noch keine entsprechend pharmakologisch-modifizierte Substanz zur Verfügung, die eine isolierte Inhibition von Megalin in der Niere bewirkt. Möglich wäre beispielsweise eine Kopplung mit pH-abhängiger Freisetzung des Wirkstoffs aufgrund der bestehenden pH-Wert-Differenzen zwischen Urin und Blut. Eine Blockade von Megalin über den Urin wäre außerdem aufgrund der luminalen Expression des Endozytoserezeptors in proximalen Tubuluszellen effektiv.

In vitro Untersuchungen zur hemmenden Wirkung von RAP an proximalen Tubuluszellen stehen noch aus. Im Zellkulturmodell ließe sich zudem auch die Effektivität der Blockade bei unterschiedlichen pH-Werten testen.

Außerdem sollten Interventionsstudien in unterschiedlichen Tiermodellen progredienter Nephropathien durchgeführt werden, um in vivo die Effektivität und Sicherheit einer Megalin-Blockade mit RAP zu überprüfen.

Die bisherige Therapie chronischer Nierenerkrankungen stellt die medikamentöse Senkung des Blutdruckes in den Mittelpunkt [120], [121]. In der Regel kommen dabei mehrere unterschiedliche Wirkstoffgruppen in Kombination zum Einsatz, die im RAAS, im vegetativen Nervensystem oder direkt an der glatten Gefäßmuskulatur angreifen. Die Blockade von Megalin durch RAP könnte additiv zum konventionellen blutdrucksenkenden Therapieregime eingesetzt werden.

Die Intervention am Megalinrezeptor könnte einem umfangreichen Patientenkollektiv zugute kommen. Aufgrund der steigenden Inzidenz chronisch progredienter Nephropathien, insbesondere auf der Basis von Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie bietet sich hier ein vielversprechender neuer Therapieansatz. Weitere Einsatzmöglichkeiten bestehen beim Alport-Syndrom, den immunvermittelten Nephropathien, der Leichtkettennephropathie, der Amyloidose sowie der Minimal Change-Nephropathie.

6. ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT

6.1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Rolle des Endozytoserezeptors Megalin bei der Pathogenese progredienter Nephropathien

Progrediente Nephropathien zeichnen sich durch einen langsam fortschreitenden Funktionsverlust aus, der vor allem mit Proteinurie, arteriellem Hypertonus und tubulointerstitieller Entzündung verbunden ist. Zu den häufigsten Ursachen terminaler Niereninsuffizienz zählt die Hypertonie. Unabhängig jedoch von der Art der glomerulären Primärschädigung entwickelt sich eine tubulointerstitielle Entzündung mit nachfolgender Fibrose dort, wo proximales Tubulusepithel mit Proteinen aus dem glomerulären Filtrat überladen wird. Unklar ist noch, welcher Mechanismus die Proteinrückresorption reguliert. Ziel der vorliegenden Studie war es, erstmalig die vom Endozytoserezeptor Megalin vermittelte Rückresorption als möglichen zentralen regulatorischen Mechanismus bei der Entstehung progredienter Nephropathien zu untersuchen, wofür ein nierenspezifischer Megalin-Knockout-Mausstamm zur Verfügung stand.

Megalin-defizienten (cre+) und nicht defizienten (cre-), uninephrektomierten Tieren wurde zweimal im Abstand von 3 Wochen ein 21-day-DOCA-release-pellet implantiert. Die Tiere erhielten parallel über den gesamten Zeitraum 1%ige Kochsalzlösung als Trinkwasser. Als Kontrollen wurden ebenfalls Megalin-defiziente und nicht defiziente Tiere mitgeführt. Über die gesamte Versuchsdauer wurde per Telemetrie der Blutdruck der Tiere ermittelt. Wöchentlich wurden Nierenfunktionsparameter aus dem Urin sowie am Versuchsende aus dem Serum bestimmt. Außerdem wurden eine patho- und immunhistologische Analyse des Nierengewebes sowie eine Genexpressionsanalyse hinsichtlich inflammatorischer und fibrotischer Marker durchgeführt. Schwerpunkt der Untersuchungen mittels des etablierten DOCA-Modells war der Vergleich Megalin-defizienter und nicht Megalin-defizienter Tiere.

1. Durch DOCA-Implantation konnte die erwartete, dauerhaft signifikante Erhöhung des Blutdrucks induziert werden. Diese erwies sich als Megalin-unabhängig.
2. DOCA-Behandlung induzierte, wie erwartet, bei allen Tieren eine Verschlechterung der Nierenfunktion, welche jedoch nur bei cre-negativen Tieren signifikant abnahm.

Außerdem führte DOCA zu den erwarteten Serumelektrolytverschiebungen. Der Albumin-Spiegel im Serum war bei allen Tieren der DOCA-Gruppe unabhängig vom Megalin-Phänotyp signifikant erniedrigt. Parallel dazu entwickelten DOCA-behandelte Tiere eine signifikante Zunahme der Natrium-, Kalium- und Albumin-Exkretion bei signifikant gesteigerter Diurese. Megalin-defiziente Phänotypen zeigten bezüglich aller untersuchten Urin-Parameter tendenziell höhere Exkretionswerte als nicht defiziente.

3. DOCA-Behandlung induzierte die für dieses Modell charakteristische inflammatorische Antwort, die immunhistologisch durch signifikant erhöhte Infiltration des Nierengewebes mit Makrophagen und T-Lymphozyten sowie durch eine ausgeprägtere Expression des proinflammatorischen Zytokins MCP-1 nachgewiesen wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte im DOCA-Modell erstmals gezeigt werden, dass Megalin-Defizienz in einer signifikant geringer ausgeprägten Entzündungsreaktion resultiert.
4. Analog zu den immunhistologischen Ergebnissen konnte per Genexpressionanalyse der DOCA-behandelten Tiere im Nierengewebe Megalin-defizienter Tiere eine geringere Aktivierung von MCP-1 und der profibrotischen Marker TGF- β und Kollagen III als bei nicht defizienten Tieren nachgewiesen werden.

Die aufgeführten, erstmalig ermittelten Ergebnisse zeigen, dass die Megalin-vermittelte Proteinendozytose ein wichtiger Mechanismus bei der Entstehung der tubulären Proteinüberladung, der inflammatorischen Antwort und nachfolgender Fibrose ist. Die bisherige Therapie chronischer Nierenerkrankungen stellt die medikamentöse Senkung des Blutdruckes in den Mittelpunkt. Die durch Einschränkung der Proteinrückresorption nachgewiesene protektive Wirkung einer verminderten Expression von Megalin auf die Progression chronischer Nephropathien könnte, eine Eliminierung der mit einer systemischen Blockade des Rezeptors einhergehenden unerwünschten Wirkungen vorausgesetzt, völlig neue therapeutische Optionen eröffnen.

6.2. ABSTRACT

Endocytosis-receptor Megalin's role in pathogenesis of progressive nephropathies

Background: In progressive nephropathies, overload of tubular cells with filtered proteins translates glomerular permeability dysfunction into cellular signals of interstitial inflammation. Megalin-mediated endocytosis of proteins and further processing by the endocytosis apparatus could be basic precondition for the following inflammation signals leading to fibrosis. Blockade of the protein-endocytosis so could preserve the physiological function and counteract the loss of renal function. However, it is not known whether Megalin-blockade is protective in progressive renal injury associated with severe proteinuria. This study therefore examines the role of the endocytosis-receptor Megalin in progressive nephropathies by confronting murine Megalin-deficient phenotypes with a model of DOCA-salt-induced hypertensive nephropathy with progressive interstitial inflammation and fibrosis.

Methods: DOCA-salt hypertensive nephropathy with persistent proteinuria was induced in Megalin-deficient mice by a two times subcutaneous implantation of a 50 mg 21-day DOCA-release-pellet in intervals of 3 weeks and 1 % saline given as drinking water. Bloodpressure was telemetrically controlled all along. Renal damage was evaluated following measurements of functional parameters and renal histology, which was studied by morphometry and immunohistochemistry. The expression of proinflammatory, inflammatory and proliferation markers was quantified by immunohistochemistry and Realtime Online PCR.

Results: DOCA-induced rise of bloodpressure, the extent of proteinuria and glomerular sclerosis was not different in Megalin-deficient animals and controls. In contrast, the associated tubulointerstitial injury consisting of tubular dilatation and atrophy, interstitial infiltration and fibrosis, was significantly lower in Megalin-deficient phenotypes. Compared to controls, Megalin-deficient mice showed a significantly reduced amount of F4/80-positive macrophages, T-lymphocytes and monocyte chemoattractant protein (MCP-1) in interstitial lesions. Proliferation-marker Ki-67 was also significantly reduced in Megalin-deficient mice. The mRNA expression of MCP-1, TGF- β and Collagen III was upregulated in diseased kidneys, but also in Megalin-deficient mice not as prominent as in diseased controls.

Conclusion: Megalin-deficiency substantially reduced the expression of proinflammatory, inflammatory and profibrotic markers and the subsequent renal fibrosis in DOCA murine model of hypertensive nephropathy. These findings support an important role for Megalin in

proteinuric overload of proximal tubular cells and suggest that Megalin-blockade might be a new therapeutic strategy in progressive nephropathies.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Remuzzi, G., *Abnormal protein traffic through the glomerular barrier induces proximal tubular cell dysfunction and causes renal injury*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1995. **4**(4): p. 339-42.
2. Bruzzi, I., A. Benigni, and G. Remuzzi, *Role of increased glomerular protein traffic in the progression of renal failure*. *Kidney Int Suppl*, 1997. **62**: p. S29-31.
3. Abbate, M., C. Zoja, and G. Remuzzi, *How does proteinuria cause progressive renal damage?* *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(11): p. 2974-84.
4. Birn, H. and E.I. Christensen, *Renal albumin absorption in physiology and pathology*. *Kidney Int*, 2006. **69**(3): p. 440-9.
5. Abbate, M., et al., *In progressive nephropathies, overload of tubular cells with filtered proteins translates glomerular permeability dysfunction into cellular signals of interstitial inflammation*. *J Am Soc Nephrol*, 1998. **9**(7): p. 1213-24.
6. Ruggenenti, P. and G. Remuzzi, *The role of protein traffic in the progression of renal diseases*. *Annu Rev Med*, 2000. **51**: p. 315-27.
7. Willnow, T.E., et al., *Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(16): p. 8460-4.
8. Wang, Y., et al., *Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein*. *J Am Soc Nephrol*, 1997. **8**(10): p. 1537-45.
9. Leheste, J.R., et al., *Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria*. *Am J Pathol*, 1999. **155**(4): p. 1361-70.
10. Klanke, B., et al., *Blood pressure versus direct mineralocorticoid effects on kidney inflammation and fibrosis in DOCA-salt hypertension*. *Nephrol Dial Transplant*, 2008. **23**(11): p. 3456-63.
11. Hartner, A., et al., *Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice*. *Nephrol Dial Transplant*, 2003. **18**(10): p. 1999-2004.
12. Gross, V., A. Lippoldt, and F.C. Luft, *Pressure diuresis and natriuresis in DOCA-salt mice*. *Kidney Int*, 1997. **52**(5): p. 1364-8.
13. Honeck, H., et al., *Cytochrome P450-dependent renal arachidonic acid metabolism in desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive mice*. *Hypertension*, 2000. **36**(4): p. 610-6.

14. Bello, A.K., E. Nwankwo, and A.M. El Nahas, *Prevention of chronic kidney disease: a global challenge*. *Kidney Int Suppl*, 2005(98): p. S11-7.
15. Pisoni, R., P. Ruggenti, and G. Remuzzi, *Renoprotective therapy in patients with nondiabetic nephropathies*. *Drugs*, 2001. **61**(6): p. 733-45.
16. Schieppati, A. and G. Remuzzi, *Chronic renal diseases as a public health problem: epidemiology, social, and economic implications*. *Kidney Int Suppl*, 2005(98): p. S7-S10.
17. Zollinger, H.U., *[Morphological nosology of glomerulonephritides]*. *Beitr Pathol*, 1971. **143**(4): p. 395-406.
18. Osborne, C.A., K.H. Johnson, and V. Perman, *Amyloid nephrotic syndrome in the dog*. *J Am Vet Med Assoc*, 1969. **154**(12): p. 1545-60.
19. Rowley, S.H., *Malignant hypertension produced by desoxycorticosterone acetate and sodium chloride*. *Can Assoc J*, 1943(49): p. 88-92.
20. Johns, C., et al., *Models of experimental hypertension in mice*. *Hypertension*, 1996. **28**(6): p. 1064-9.
21. Artunc, F., et al., *Blunted DOCA/high salt induced albuminuria and renal tubulointerstitial damage in gene-targeted mice lacking SGK1*. *J Mol Med*, 2006. **84**(9): p. 737-46.
22. Ortiz, P.A. and J.L. Garvin, *Intrarenal transport and vasoactive substances in hypertension*. *Hypertension*, 2001. **38**(3 Pt 2): p. 621-4.
23. Titze, J., et al., *Internal sodium balance in DOCA-salt rats: a body composition study*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005. **289**(4): p. F793-802.
24. Grond, J., J.J. Weening, and J.D. Elema, *Glomerular sclerosis in nephrotic rats. Comparison of the long-term effects of adriamycin and aminonucleoside*. *Lab Invest*, 1984. **51**(3): p. 277-85.
25. Eddy, A.A., *Interstitial nephritis induced by protein-overload proteinuria*. *Am J Pathol*, 1989. **135**(4): p. 719-33.
26. Lalich, J.J., P.M. Burkholder, and W.C. Paik, *Protein overload nephropathy in rats with unilateral nephrectomy. A correlative light immunofluorescence and electron microscopical analysis*. *Arch Pathol*, 1975. **99**(2): p. 72-9.
27. Grond, J., et al., *Mesangial function and glomerular sclerosis in rats after unilateral nephrectomy*. *Kidney Int*, 1982. **22**(4): p. 338-43.
28. Olson, J.L., et al., *Altered glomerular permselectivity and progressive sclerosis following extreme ablation of renal mass*. *Kidney Int*, 1982. **22**(2): p. 112-26.

-
29. Wang, Y., et al., *Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events*. *Kidney Int*, 2000. **58**(4): p. 1797-804.
 30. Selye H, H.C., Rowley EM, *Malignant hypertension produced by desoxycorticosterone acetate and sodium chloride*. *Can Assoc J*, 1943. **49**(88-92).
 31. Remuzzi, G., P. Ruggenenti, and A. Benigni, *Understanding the nature of renal disease progression*. *Kidney Int*, 1997. **51**(1): p. 2-15.
 32. Brenner, B.M., R.C. Goldszer, and T.H. Hostetter, *Glomerular response to renal injury*. *Contrib Nephrol*, 1982. **33**: p. 48-66.
 33. Hayslett, J.P., *Functional adaptation to reduction in renal mass*. *Physiol Rev*, 1979. **59**(1): p. 137-64.
 34. Johnson, H.A. and J.M. Vera Roman, *Compensatory renal enlargement. Hypertrophy versus hyperplasia*. *Am J Pathol*, 1966. **49**(1): p. 1-13.
 35. Anderson, S., T.W. Meyer, and B.M. Brenner, *The role of hemodynamic factors in the initiation and progression of renal disease*. *J Urol*, 1985. **133**(3): p. 363-8.
 36. Chanutin A, F.E.J., *Experimental renal insufficiency produced by partial nephrectomy: control diet*. *Arch Intern Med*, 1932. **49**(49): p. 767-87.
 37. Remuzzi, G. and T. Bertani, *Pathophysiology of progressive nephropathies*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(20): p. 1448-56.
 38. Mogensen CE, C.C., Beck-Nielsen H., *Early changes in kidney function, blood pressure, and the stages in diabetic nephropathy*. *Prevention and Treatment of Diabetic Nephropathy*, 1983(ed. H Keen, M Legrain): p. pp. 57-83.
 39. Ruggenenti, P., et al., *Chronic proteinuric nephropathies: outcomes and response to treatment in a prospective cohort of 352 patients with different patterns of renal injury*. *Am J Kidney Dis*, 2000. **35**(6): p. 1155-65.
 40. Parving, H.H., et al., *Early aggressive antihypertensive treatment reduces rate of decline in kidney function in diabetic nephropathy*. *Lancet*, 1983. **1**(8335): p. 1175-9.
 41. Mathiesen, E.R., et al., *Efficacy of captopril in postponing nephropathy in normotensive insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria*. *Bmj*, 1991. **303**(6794): p. 81-7.
 42. Lapinski, R., et al., *Angiotensin II modulates glomerular capillary permselectivity in rat isolated perfused kidney*. *J Am Soc Nephrol*, 1996. **7**(5): p. 653-60.

-
43. Parving, H.H., *Microalbuminuria in essential hypertension and diabetes mellitus*. J Hypertens Suppl, 1996. **14**(2): p. S89-93; discussion S93-4.
 44. Gaede, P., et al., *Intensified multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: the Steno type 2 randomised study*. Lancet, 1999. **353**(9153): p. 617-22.
 45. Gerstein, H.C., et al., *Prevalence and determinants of microalbuminuria in high-risk diabetic and nondiabetic patients in the Heart Outcomes Prevention Evaluation Study. The HOPE Study Investigators*. Diabetes Care, 2000. **23 Suppl 2**: p. B35-9.
 46. Mogensen, C.E., *Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes*. N Engl J Med, 1984. **310**(6): p. 356-60.
 47. Bertani, T., et al., *Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy*. Kidney Int, 1986. **30**(4): p. 488-96.
 48. Bertani, T., et al., *Age-related nephropathy and proteinuria in rats with intact kidneys exposed to diets with different protein content*. Lab Invest, 1989. **60**(2): p. 196-204.
 49. Remuzzi, G. and T. Bertani, *Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules?* Kidney Int, 1990. **38**(3): p. 384-94.
 50. Benigni, A., C. Zoja, and G. Remuzzi, *The renal toxicity of sustained glomerular protein traffic*. Lab Invest, 1995. **73**(4): p. 461-8.
 51. Tikkanen, I., et al., *Increased renal expression of cytokines and growth factors induced by DOCA-NaCl treatment in Heymann nephritis*. Nephrol Dial Transplant, 1995. **10**(12): p. 2192-8.
 52. Floege, J., *Cytokines in the progression of renal disease*. Nephrol Dial Transplant, 1993. **8**(12): p. 1319-20.
 53. el Nahas, A.M., *Growth factors and progressive renal failure*. Nephrol Dial Transplant, 1993. **8**(12): p. 1401-6.
 54. Ong, A.C. and L.G. Fine, *Tubular-derived growth factors and cytokines in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis: implications for human renal disease progression*. Am J Kidney Dis, 1994. **23**(2): p. 205-9.
 55. Zoja, C., et al., *Proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-1 on challenge with albumin and other proteins*. Am J Kidney Dis, 1995. **26**(6): p. 934-41.

-
56. Zoja, C., et al., *Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kappa B activation*. *Kidney Int*, 1998. **53**(6): p. 1608-15.
 57. Wenzel, U.O. and H.E. Abboud, *Chemokines and renal disease*. *Am J Kidney Dis*, 1995. **26**(6): p. 982-94.
 58. Zoja, C., et al., *Angiotensin II blockade limits tubular protein overreabsorption and the consequent upregulation of endothelin 1 gene in experimental membranous nephropathy*. *Exp Nephrol*, 1998. **6**(2): p. 121-31.
 59. Eddy, A.A. and C.M. Giachelli, *Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria*. *Kidney Int*, 1995. **47**(6): p. 1546-57.
 60. Proudfoot, A.E., et al., *Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(5): p. 2599-603.
 61. Lloyd, C.M., et al., *RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis*. *J Exp Med*, 1997. **185**(7): p. 1371-80.
 62. Kriz, W. and M. LeHir, *Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models*. *Kidney Int*, 2005. **67**(2): p. 404-19.
 63. Guder, W.G. and W. Hofmann, *Differentiation of proteinuria and haematuria by single protein analysis in urine*. *Clin Biochem*, 1993. **26**(4): p. 277-82.
 64. Kriz, W., *Johnson and Feehally: Comprehensive Clinical Nephrology*. 199x.
 65. Goldstein, J.L., R.G. Anderson, and M.S. Brown, *Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis*. *Nature*, 1979. **279**(5715): p. 679-85.
 66. Christensen, E.I., et al., *Membrane receptors for endocytosis in the renal proximal tubule*. *Int Rev Cytol*, 1998. **180**: p. 237-84.
 67. Marshansky, V., et al., *Receptor-mediated endocytosis in kidney proximal tubules: recent advances and hypothesis*. *Electrophoresis*, 1997. **18**(14): p. 2661-76.
 68. Christensen, E.I., H.G. Rennke, and F.A. Carone, *Renal tubular uptake of protein: effect of molecular charge*. *Am J Physiol*, 1983. **244**(4): p. F436-41.
 69. Saito, A., et al., *Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(21): p. 9725-9.

-
70. Chen, W.J., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor*. J Biol Chem, 1990. **265**(6): p. 3116-23.
 71. Bansal, A. and L.M. Gierasch, *The NPXY internalization signal of the LDL receptor adopts a reverse-turn conformation*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1195-201.
 72. Willnow, T.E., A. Nykjaer, and J. Herz, *Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(6): p. E157-62.
 73. Kerjaschki, D. and M.G. Farquhar, *The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(18): p. 5557-61.
 74. Kerjaschki, D. and M.G. Farquhar, *Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (GP330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats*. J Exp Med, 1983. **157**(2): p. 667-86.
 75. Moestrup, S.K. and P.J. Verroust, *Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia*. Annu Rev Nutr, 2001. **21**: p. 407-28.
 76. Buc-Caron, M.H., H. Condamine, and D. Kerjaschki, *Rat Heymann nephritis antigen is closely related to brushin, a glycoprotein present in early mouse embryo epithelia*. Ann Inst Pasteur Immunol, 1987. **138**(5): p. 707-22.
 77. Gueth-Hallonet, C., et al., *Gp330 is specifically expressed in outer cells during epithelial differentiation in the preimplantation mouse embryo*. Development, 1994. **120**(11): p. 3289-99.
 78. Zheng, G., et al., *Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP)*. J Histochem Cytochem, 1994. **42**(4): p. 531-42.
 79. Kounnas, M.Z., et al., *Immunological localization of glycoprotein 330, low density lipoprotein receptor related protein and 39 kDa receptor associated protein in embryonic mouse tissues*. In Vivo, 1994. **8**(3): p. 343-51.
 80. Hermo, L., et al., *Expression and regulation of LRP-2/megalin in epithelial cells lining the efferent ducts and epididymis during postnatal development*. Mol Reprod Dev, 1999. **53**(3): p. 282-93.
 81. Kounnas, M.Z., et al., *LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation*. Cell, 1995. **82**(2): p. 331-40.

-
82. Stefansson, S., et al., *Glycoprotein 330/low density lipoprotein receptor-related protein-2 mediates endocytosis of low density lipoproteins via interaction with apolipoprotein B100*. J Biol Chem, 1995. **270**(33): p. 19417-21.
 83. Roux, C., C. Horvath, and R. Dupuis, *Teratogenic action and embryo lethality of AY 9944R. Prevention by a hypercholesterolemia-provoking diet*. Teratology, 1979. **19**(1): p. 35-8.
 84. Tint, G.S., et al., *Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome*. N Engl J Med, 1994. **330**(2): p. 107-13.
 85. Farese, R.V., Jr., et al., *Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1774-8.
 86. Homanics, G.E., et al., *Targeted modification of the apolipoprotein B gene results in hypobetalipoproteinemia and developmental abnormalities in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): p. 2389-93.
 87. Moestrup, S.K., et al., *beta2-glycoprotein-I (apolipoprotein H) and beta2-glycoprotein-I-phospholipid complex harbor a recognition site for the endocytic receptor megalin*. J Clin Invest, 1998. **102**(5): p. 902-9.
 88. Nykjaer, A., et al., *An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3*. Cell, 1999. **96**(4): p. 507-15.
 89. Chien, K.R., *To Cre or not to Cre: the next generation of mouse models of human cardiac diseases*. Circ Res, 2001. **88**(6): p. 546-9.
 90. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
 91. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
 92. Young, M.J. and J.W. Funder, *Mineralocorticoids, salt, hypertension: effects on the heart*. Steroids, 1996. **61**(4): p. 233-5.
 93. Brunskill, N.J., *Albumin and proximal tubular cells--beyond endocytosis*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(11): p. 1732-4.
 94. Zhai, X.Y., et al., *Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney*. Kidney Int, 2000. **58**(4): p. 1523-33.

-
95. Leheste, J.R., *Charakterisierung von Megalin-defizienten Mäusen und Erstellung eines Mausmodells zur gezielten induzierbaren Inaktivierung des Megalins*, in *Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät*. 2001, Humboldt-Universität zu Berlin: Berlin. p. 199.
 96. Leheste, J.R., et al., *Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect*. *Faseb J*, 2003. **17**(2): p. 247-9.
 97. Mizuno, S., J. Wen, and Y. Mizuno-Horikawa, *Repeated streptozotocin injections cause early onset of glomerulosclerosis in mice*. *Exp Anim*, 2004. **53**(2): p. 175-80.
 98. Schreiner, G.F., *Renal toxicity of albumin and other lipoproteins*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1995. **4**(4): p. 369-73.
 99. Thomas, M.E., et al., *Proteinuria induces tubular cell turnover: A potential mechanism for tubular atrophy*. *Kidney Int*, 1999. **55**(3): p. 890-8.
 100. Jerums, G., et al., *Why is proteinuria such an important risk factor for progression in clinical trials?* *Kidney Int Suppl*, 1997. **63**: p. S87-92.
 101. Schlondorff, D., et al., *Chemokines and renal disease*. *Kidney Int*, 1997. **51**(3): p. 610-21.
 102. Bowers, M.C., et al., *Role of calcitonin gene-related peptide in hypertension-induced renal damage*. *Hypertension*, 2005. **46**(1): p. 51-7.
 103. Kretzler, M., I. Koeppen-Hagemann, and W. Kriz, *Podocyte damage is a critical step in the development of glomerulosclerosis in the uninephrectomised-desoxycorticosterone hypertensive rat*. *Virchows Arch*, 1994. **425**(2): p. 181-93.
 104. Dworkin, L.D., et al., *Hemodynamic basis for glomerular injury in rats with desoxycorticosterone-salt hypertension*. *J Clin Invest*, 1984. **73**(5): p. 1448-61.
 105. Raij, L., et al., *Renal injury in DOCA-salt hypertensive C5-sufficient and C5-deficient mice*. *Kidney Int*, 1989. **36**(4): p. 582-92.
 106. de Zeeuw, D., et al., *Proteinuria, a target for renoprotection in patients with type 2 diabetic nephropathy: lessons from RENAAL*. *Kidney Int*, 2004. **65**(6): p. 2309-20.
 107. Remuzzi, G., P. Ruggenti, and N. Perico, *Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition*. *Ann Intern Med*, 2002. **136**(8): p. 604-15.
 108. Zoja, C., et al., *How to fully protect the kidney in a severe model of progressive nephropathy: a multidrug approach*. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**(12): p. 2898-908.

-
109. Yard, B.A., et al., *Regulation of endothelin-1 and transforming growth factor-beta1 production in cultured proximal tubular cells by albumin and heparan sulphate glycosaminoglycans*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(9): p. 1769-75.
110. Eddy, A.A., *Expression of genes that promote renal interstitial fibrosis in rats with proteinuria*. Kidney Int Suppl, 1996. **54**: p. S49-54.
111. Shimizu, H., et al., *Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates renal injury induced by protein-overload proteinuria*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(6): p. 1496-505.
112. Abbate, M., et al., *Proximal tubular cells promote fibrogenesis by TGF-beta1-mediated induction of peritubular myofibroblasts*. Kidney Int, 2002. **61**(6): p. 2066-77.
113. Eardley, K.S., et al., *The relationship between albuminuria, MCP-1/CCL2, and interstitial macrophages in chronic kidney disease*. Kidney Int, 2006. **69**(7): p. 1189-97.
114. Kriz, W., et al., *From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**(11): p. 2781-98.
115. Le Hir, M. and V. Besse-Eschmann, *A novel mechanism of nephron loss in a murine model of crescentic glomerulonephritis*. Kidney Int, 2003. **63**(2): p. 591-9.
116. Willnow, T.E., et al., *Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(10): p. 4537-41.
117. Herz, J., et al., *39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor*. J Biol Chem, 1991. **266**(31): p. 21232-8.
118. Williams, S.E., et al., *A novel mechanism for controlling the activity of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Multiple regulatory sites for 39-kDa receptor-associated protein*. J Biol Chem, 1992. **267**(13): p. 9035-40.
119. Willnow, T.E., et al., *Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist*. Science, 1994. **264**(5164): p. 1471-4.
120. Luft, F.C., *Angiotensin-converting enzyme inhibitors in antihypertensive therapy*. Curr Hypertens Rep, 2000. **2**(2): p. 165-6.
121. Luft, F.C., *Treatment and prevention of hypertension: where have we been and where are we going?* Kidney Int Suppl, 1995. **50**: p. S14-8.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APES	Aminopropyltriethoxysilane
ApoER2	Apolipoprotein ER2
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary Desoxyribonucleinacid
DNA	Desoxyribonucleinacid
DOCA	Desoxycorticosteronacetat
FCS	fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GBD	Global burden disease
GF	Gesichtsfeld
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GP	glycoprotein
kDa	KiloDalton
LDL	low-density lipoprotein
LRP	LDL-Receptor-Related-Protein
MCP	Monocyte chemoattractant protein
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
ODN	Oligodesoxynucleotides
PCR	Polymerase chain-reaction
PTC	proximate tubulus cell
RAAS	Renin-Angiotensin-System
RAP	Rezeptor-assoziierte Protein
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standard Error of Means
TGF	transforming growth factor
TM	temperature of melting / Schmelzpunkt
Vit.-DBP	Vitamin-D-bindendes Protein
VLDL	Very low-density lipoprotein

ANHANG

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand im Nephrologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie der Charité Campus Berlin-Mitte unter der hervorragenden Leitung von Frau Prof. Dr. med. Duska Dragun. Bei ihr möchte ich mich vor allem für die Bereitstellung des Arbeitsthemas und den umfangreichen wissenschaftlichen Rat bedanken. Ebenso sehr danke ich Herrn Prof. Dr. med. vet. Roland Rudolph aus dem Institut für Veterinärpathologie der Freien Universität Berlin als internem Betreuer der Arbeit. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Willnow vom Max-Dellbrück-Centrum für Molekulare Medizin gilt mein Dank für das Zurverfügungstellen der gewebsspezifischen Knockout-Mäuse sowie Herrn Dr. Volkmar Groß aus der Franz-Vollhard-Klinik in Berlin-Buch für das Durchführen der telemetrischen Blutdruckmessungen.

Frau Melina Nieminen-Kelhä danke ich für die intensive Einarbeitung in den Umgang mit den Versuchstieren und die zahlreichen chirurgischen Techniken sowie für die ständige Unterstützung und Rat bei der Durchführung aller Tierexperimente, ebenso wie Jenny Gorsch und Yvonne Linde für die Vermittlung wichtiger Grundlagen bei der Immunhistologie. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. Uwe Hoff für zahlreiche konstruktive Hinweise beim Verfassen der Arbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für Unterstützung, Geduld und immer wieder neue Motivation vor allem in schwierigen Phasen der Dissertation.

ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Hiermit bestätige ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt zu haben. Ich versichere, dass ich ausschließlich angegebene Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Meike Eimers

Berlin, den 16. Dezember 2007