
Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss einer transgenen Überexpression von
humanem Endothelin-2 (h-endoET-2) auf die diabetische
Nephropathie der Ratte

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johannes Manhart

aus Jena

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Peters
2. Prof. Dr. med. H. Scholz
3. Priv. Doz. Dr. med. O. Gross

Datum der Promotion: 02.11.2009

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Diabetes mellitus und Diabetische Nephropathie | 1 |
| 1.1.1 | Epidemiologie und Verlauf | 1 |
| 1.1.2 | Pathogenese der DN | 2 |
| 1.1.3 | Therapeutische Konzepte und Ansätze | 6 |
| 1.2 | Tiermodelle zur Untersuchung diabetischer Nephropathie | 8 |
| 1.3 | Endothelin-System | 9 |
| 1.3.1 | Endothelin - Biosynthese | 9 |
| 1.3.2 | Endothelin-Rezeptoren | 11 |
| 1.3.3 | Renales Endothelin-System | 13 |
| 1.3.4 | Interaktionen zwischen Endothelin und Diabetes | 13 |
| 2 | Fragestellung | 15 |
| 3 | Material und Methoden | 16 |
| 3.1 | Validierung des Studiendesigns | 16 |
| 3.1.1 | Transgenexpression | 16 |
| 3.1.1.1 | DNA-Isolation | 16 |
| 3.1.1.2 | RNA-Isolation | 16 |
| 3.1.1.3 | c-DNA Synthese | 16 |
| 3.1.1.4 | PCR (Polymerase Kettenreaktion) | 17 |
| 3.1.1.5 | LightCycler PCR | 17 |
| 3.1.1.6 | Transgentestung und Gruppenallokation | 18 |
| 3.1.1.7 | Endothelin 1/2-ELISA | 19 |
| 3.1.2 | Induktion des Diabetes mellitus | 19 |
| 3.1.2.1 | Streptozotocinadministration | 19 |
| 3.1.2.2 | Blutzuckermessung | 20 |
| 3.1.2.3 | Insulintherapie | 21 |
| 3.2 | Basisdaten | 21 |
| 3.2.1 | Tiere | 21 |
| 3.2.2 | Stoffwechsellkäfiguntersuchungen | 21 |
| 3.2.3 | Blutentnahme | 22 |
| 3.2.4 | Systolische Blutdruckmessung / Herzfrequenz | 22 |
| 3.2.5 | Tiertötung/Organgewinnung | 22 |
| 3.2.6 | Isolation von Glomeruli | 23 |
| 3.3 | Diabetische Nephropathie | 23 |
| 3.3.1 | Eiweißausscheidung | 23 |
| 3.3.1.1 | Gesamtproteinurie | 23 |
| 3.3.1.2 | Albuminurie | 24 |
| 3.3.2 | Nierenhypertrophie – glomeruläre Volumetrie | 25 |
| 3.3.3 | Glomeruläre Fibrose | 25 |
| 3.3.3.1 | PAS Färbung und Glomerulosclerose-Score | 25 |
| 3.3.3.2 | Fibronectin-ELISA | 26 |
| 3.3.3.3 | TGF- β -ELISA | 27 |
| 3.3.3.4 | Plasminogen-Aktivator Inhibitor 1-ELISA | 28 |
| 3.3.4 | Nierenfunktion – Biochemische Analyse | 28 |
| 3.4 | Glomeruläres Endothelinsystem | 29 |

Inhalt

| | | |
|---------|---|----|
| 3.5 | Glomeruläre Kulturen | 29 |
| 3.6 | Statistische Auswertung | 30 |
| 3.7 | Lösungen und Puffer | 31 |
| 3.8 | Reagenzien/ Geräte | 32 |
| 4 | Ergebnisse | 33 |
| 4.1 | Validierung des Studiendesigns | 33 |
| 4.1.1 | Transgenexpression | 33 |
| 4.1.1.1 | Transgentestung zu Versuchsbeginn und Gruppenallokation | 33 |
| 4.1.1.2 | Endothelin-Plasmaspiegel am Versuchsende (ELISA)..... | 33 |
| 4.1.1.3 | Glomeruläre humane Endothelin-2 mRNA-Expression | 34 |
| 4.1.1.4 | Glomeruläre Endothelinproduktion (ELISA)..... | 35 |
| 4.1.2 | Induktion des Diabetes mellitus | 35 |
| 4.2 | Basisdaten | 37 |
| 4.2.1 | Körpergewicht | 37 |
| 4.2.2 | Systolischer Blutdruck | 39 |
| 4.2.3 | Herzfrequenz | 39 |
| 4.2.4 | Überlebensanalyse | 40 |
| 4.3 | Diabetische Nephropathie | 41 |
| 4.3.1 | Eiweißausscheidung | 41 |
| 4.3.1.1 | Gesamtproteinurie | 41 |
| 4.3.1.2 | Albuminurie | 42 |
| 4.3.2 | Nierenhypertrophie | 43 |
| 4.3.2.1 | Nierengewicht | 43 |
| 4.3.2.2 | Glomeruläres Volumen | 44 |
| 4.3.3 | Glomeruläre Fibrose | 45 |
| 4.3.3.1 | Histologische Glomerulosklerose | 45 |
| 4.3.3.2 | Fibronektinexpression | 46 |
| 4.3.3.3 | TGF- β -Expression | 47 |
| 4.3.3.4 | Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1-Expression | 49 |
| 4.3.4 | Nierenfunktion | 50 |
| 4.3.4.1 | Plasma-Kreatinin | 50 |
| 4.3.4.2 | Kreatinin-Clearance | 50 |
| 4.3.4.3 | Harnstoff | 52 |
| 4.3.4.4 | Harnstoff-Clearance | 52 |
| 4.4 | Glomeruläres Endothelinsystem | 53 |
| 4.4.1 | Glomeruläre Endothelin-1 mRNA-Expression | 53 |
| 4.4.2 | Glomeruläre ET _A -R mRNA-Expression | 54 |
| 4.4.3 | Glomeruläre ET _B -R mRNA-Expression | 55 |
| 4.5 | Zusammenfassung | 56 |
| 5 | Diskussion | 57 |
| 5.1 | Methodenkritik | 58 |
| 5.1.1 | Modell des Streptozotozin-induzierten Diabetes mellitus | 58 |
| 5.1.2 | Rattenmodell der Endothelin-Überexpression (h-endoET-2)..... | 59 |
| 5.1.3 | Studienaufbau und Gruppenzusammensetzung | 60 |

| | | |
|---------|--|----|
| 5.2 | Nierenveränderungen unter Diabetes mellitus, transgener ET-2-Überexpression und der Kombination beider | 61 |
| 5.2.1 | Nierenveränderungen unter DM | 61 |
| 5.2.1.1 | Eiweißausscheidung..... | 61 |
| 5.2.1.2 | Nierenhypertrophie | 62 |
| 5.2.1.3 | Glomeruläre Matrixexpression..... | 62 |
| 5.2.1.4 | Nierenfunktion (Kreatinin/ Kreatininclearance; Harnstoff/ Harnstoffclearance) | 63 |
| 5.2.2 | Nierenveränderung unter transgener ET-2-Überexpression..... | 65 |
| 5.2.2.1 | Eiweißausscheidung..... | 65 |
| 5.2.2.2 | Nierenhypertrophie | 65 |
| 5.2.2.3 | Glomeruläre Matrixexpression..... | 66 |
| 5.2.2.4 | Nierenfunktion (Kreatinin/ Kreatininclearance; Harnstoff/ Harnstoffclearance) | 66 |
| 5.2.3 | Nierenveränderungen unter Kombination von Diabetes mellitus und transgener ET-2-Überexpression | 67 |
| 5.2.3.1 | Eiweißausscheidung..... | 67 |
| 5.2.3.2 | Nierenhypertrophie | 67 |
| 5.2.3.3 | Glomeruläre Matrixexpression..... | 67 |
| 5.2.3.4 | Nierenfunktion (Kreatinin/ Kreatininclearance; Harnstoff/ Harnstoffclearance) | 68 |
| 5.3 | Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz | 69 |
| 5.4 | Regulation des Endothelinsystems unter Diabetes mellitus und transgener ET-2- Überexpression | 70 |
| 5.5 | RAS..... | 72 |
| 5.6 | Therapeutische Ausblicke | 75 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 78 |
| 7 | Literaturnachweis | 80 |
| 8 | Danksagung | 89 |
| 9 | Lebenslauf | 90 |
| 10 | Selbstständigkeitserklärung | 91 |

1 Einleitung

Der **Diabetes mellitus** (DM) ist eine Stoffwechselkrankheit mit weltweit zunehmender Prävalenz¹. Langfristige Hyperglykämie bewirkt morphologische Veränderungen an Gefäßen (Mikro-/ Makroangiopathie). Insbesondere durch die Mikroangiopathie kommt es zu diabetischer Retinopathie, Neuropathie und **diabetischer Nephropathie** (DN) als Spätfolgen. Der Anteil der Diabetiker unter neu dialysepflichtig gewordenen Patienten beträgt in Deutschland ca. 42 %², davon sind etwa 90 % Typ 2 Diabetiker³. Somit stellt die DN eine der wichtigsten Ursachen für die chronische Niereninsuffizienz dar⁴.

Endotheline gelten als potente Vasokonstriktoren und Mitogene^{5,4}. Ihre Rolle in der Pathogenese der DN wird zum Teil kontrovers diskutiert. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Endothelin-Plasma-Spiegel bei DM noch vor Auftreten von Sekundärkomplikationen erhöht sind⁵. Eine Korrelation zwischen Endothelin-1 Plasmaspiegeln und klinischen Verlaufsparemtern des Diabetes (Blutzuckerspiegel, Serumkreatinin, Albuminurie, glykosiliertes Hämoglobin (HbA_{1c})) konnte jedoch nicht gefunden werden^{5, 6}. Studien mit pharmakologischer Endothelinblockade haben bei diabetischen Tieren verringerte Proteinurie und Nierenfibrose beschrieben^{7, 8}. Anderen Autoren haben hingegen berichtet, dass nur die Hyperfiltration, nicht aber die Albuminurie vermindert wird⁹. **Ziel dieser Promotionsarbeit ist**, die Rolle von Endothelin bei diabetischer Nephropathie weiter zu charakterisieren. In einem 6-monatigen Langzeitversuch wurden hierzu bei Ratten die Auswirkungen von transgener Endothelin-Überexpression allein und in Kombination mit pharmakologisch-induziertem DM auf funktionelle, morphologische und molekulare Schlüsselparameter der DN untersucht.

1.1 Diabetes mellitus und Diabetische Nephropathie

1.1.1 Epidemiologie und Verlauf

Der DM betrifft in Deutschland nunmehr 7–8 % der Erwachsenenbevölkerung¹⁰. Man unterscheidet mehrere Hauptformen: den juvenilen (Typ 1), den adulten (Typ 2) DM, den pankreatopriven (Typ 3) und den Gestationsdiabetes (Typ 4), sowie weitere Unterformen. Etwa 30–40 % aller Diabetiker entwickeln eine klinisch bedeutsame DN. Es zeigt sich, dass das Risiko für eine DN bei Typ 1 und Typ 2 ähnlich ist¹¹. Der Anteil

der Typ 2 Diabetiker ist aufgrund der höheren Prävalenz und Erfolge in der Therapie früher, fataler kardiovaskulärer Begleiterkrankungen ausgeprägt erhöht¹². Beim Typ 1 ist durch frühzeitige bessere Intervention die Prävalenz der DN rückläufig. Der gestörte Glucosemetabolismus ist beim Typ 1 Diabetiker die Hauptursache für die DN. Beim Typ 2 Diabetiker gelten als zusätzliche Risikofaktoren der arterielle Hypertonus und die Hyperlipidämie^{13, 14}. Eine genetische Komponente ist vorhanden, allerdings sind die Geneorte, respektive Chromosomen noch nicht identifiziert¹⁵.

Typ 1 - und Typ 2 Diabetes weisen im Falle einer Nierenbeteiligung ca. 15 – 20 Jahre nach Diagnose eine Proteinurie mit einer Prävalenz von ca. 20% auf, die nach weiteren 2 – 4 Jahren in eine manifeste Nierenschädigung mit erhöhtem Serumkreatinin und stark verminderter glomerulärer Filtrationsrate (GFR) übergeht¹¹. Die morphologische und klinische Einteilung der DN in 5 Stadien nach Mogensen (**Tab.1**) wurde in die Praxisleitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft aufgenommen. Diagnostische und prognostische Marker sind u. a. Mikro-/ Makroalbuminurie sowie das HbA_{1c}¹⁶.

Tab.1: Nephropathie-Stadien nach Mogensen, 1983; glomeruläre Filtrationsrate (GFR); renaler Plasmafluss (RPF)

| Nephropathie-Stadium | Albuminurie | Serum-Kreatinin | GFR/RPF |
|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| I Stadium der Hyperfunktion | Erhöht | Normal | Erhöht |
| II Stadium der klinischen Latenz | Normal | Normal | Normal bis erhöht |
| III Beginnende Nephropathie | Persistierende Mikroalbuminurie | Normal | Normal bis erhöht |
| IV Klinisch-manifeste Nephropathie | Makroalbuminurie | Im Normbereich bis ansteigend | Abnehmend |
| V Niereninsuffizienz | Makroalbuminurie | Erhöht | Erniedrigt |

1.1.2 Pathogenese der DN

Wesentlich ist ein absoluter (Typ 1, Typ 3) oder relativer (Typ 2, Typ 4) **Insulinmangel**. Dieser ist beim Typ 1 durch eine autoimmune Destruktion der β -Zellen des Pankreas bedingt. Beim Typ 2 hingegen handelt es sich um ein Sekretionsdefizit und/ oder eine Insulinresistenz¹⁷.

Die **Hyperglykämie** ist der zentrale Faktor in der Pathogenese und wirkt unter anderem über **intrazelluläre Signalkaskaden**. Isoformen der Proteinkinase C (PKC) werden

infolge gesteigerter Glykolyse durch vermehrte Bildung von Diacylglycerol aktiviert und erhöhen die Kollagenbildung, induzieren Wachstumsfaktoren (TGF- β , VEGF, IGF) und stimulieren das Angiotensin-Konvertierungs-Enzym (ACE)¹⁸. Der redox-sensitive Transkriptionsfaktor NF- κ B wird von Zellen als Antwort auf primäre (oxidativer Streß, Viren, Bakterien) und sekundäre (Zytokine, „advanced glycation end products“, LDL) Stimuli induziert. Er reguliert Zielgene wie z. B. RAGE, ET-1 und Interleukine. Insbesondere der oxidative Stress als Primärstimulus aktiviert NF- κ B bei Diabetikern¹⁹. Eine **nichtenzymatische Glykierung** von Proteinen/ Peptiden bringt reaktive Produkte (AGE= „advanced glycation end products“; PKC β) hervor. Durch die reduzierenden Eigenschaften der Glukose werden primäre Aminogruppen von Eiweißkörpern zur Schiff'schen Base reduziert. Diese lagert sich spontan zu einer entsprechenden stabilen Fruktoseverbindung um (so genannte Amadori-Produkte oder Ketoamine, klinisches Bsp.: HbA_{1c}). Der Prozess nimmt mit steigender Blutglukosekonzentration zu. Sauerstoff lässt per Glukoxidation intermediäre Reaktanden entstehen¹⁹. Diese erhöhen den oxidativen Stress. An Tubuluszellen wirken sie direkt über Quervernetzung von Proteinen, so genannte „cross-link“ Bildung. Indirekt wirken AGE über die Bindung an diverse Rezeptoren: Rezeptoren der AGE (RAGE). Diese induzieren Zytokine (u. a. TGF- β , IL-1, VEGF, PDGF), welche über die Modulation der Fibrose, Entzündung und Thrombozytenfunktion zu tubulointerstitieller Schädigung und sinkender GFR²⁰ führen. An Mesangiumzellen und Gefäßmuskelzellen ist der Effekt einer TGF- β Produktion bei AGE-Exposition nachgewiesen. Neutralisation von AGE vermindert diese. Des Weiteren stimulieren AGE die Sekretion von „Monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1).

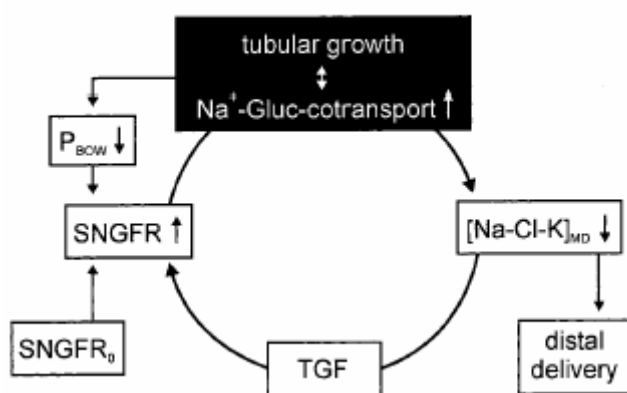


Abbildung 1:

Regelkreis von glomerulärer Filtrationsrate (GFR) des Einzelneurons (Single Nephron GFR) und Salzkonzentration via tubuloglomerulärem Feedback (TGF). Die GFR ist umgekehrt proportional zur luminalen Natrium (Na⁺) Konzentration an der Macula densa (MD). Der Adenosin vermittelte TGF bewirkt eine Reninsekretion, die umgekehrt proportional der luminalen Na⁺ Konzentration an der MD ist^{modifiziert nach 22}.

Hierdurch wird in Mesangiumzellen per p53- (Tumor Suppressor Gen) Akkumulation Apoptose eingeleitet. Es resultiert ein Funktionsverlust des Mesangiums, der mitverantwortlich für die Hyperfiltration ist²¹.

Die glomeruläre Hyperfiltration entwickelt sich initial und in der Folge dann eine glomeruläre Hypertrophie. Beide können gemeinsam auftreten und im Verlauf divergente Entwicklungen zeigen.

Die „vaskuläre Hypothese“ beschreibt Hyperfiltration als das Primärereignis. Hyperglykämie bewirkt eine osmotisch bedingte Zunahme des Blutvolumens. Hierdurch wird vermehrt Antinatriuretisches Peptid (ANP) freigesetzt, welches am vas afferens einen Autoregulationsverlust mit Zunahme des Perfusionsdruckes der Glomerula bewirkt²³. Vasodilatierende Prostaglandine und Stickstoffmonoxid (NO) werden durch Hyperglykämie induziert und verstärken den glomerulären Perfusionsdruck²⁴. Dies führt in der Summe zur Erhöhung der GFR. Eine verminderte Bildung von Adrenomedullin (hypotensiv) in Glomerula von Diabetikern wurde kürzlich nachgewiesen²⁵. Hypertrophie der Tubuli wird hier als Folgemechanismus zur Begrenzung des Wasserverlustes beschrieben.

Die „tubuläre Hypothese“ beschreibt wiederum die Hypertrophie als Primärereignis infolge der Induktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (s.u.)²¹.

Der Hypertrophie des proximalen Tubulus folgt eine verstärkte Reabsorption. Das verminderte Salzaufkommen im Primärharn wird vom Mesangium (macula densa) registriert und per tubuloglomerulärem Feedback (TGF) korrigiert (Relaxation des vas afferens). Die GFR des Einzelneurons (SN-GFR) steigt (**Abb. 1**). Ein ursprünglich zur Vermeidung der Hyperfiltration des Einzelneurons gedachter physiologischer Mechanismus wird hier ins Gegenteil verkehrt²². Aufgrund der Rückkopplung von Salzkonzentration und SN-GFR per TGF in einem Regelkreis scheinen die Daten verstärkt auf ein primär tubuläres Geschehen zu weisen.

Die Verdickung der **glomerulären Basalmembran** wird durch vermehrte Bildung von **extrazellulärer Matrix** (EZM) verursacht, insbesondere Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin und Osteopontin. Wesentlich an der Regulation beteiligt ist TGF- β ²⁶. Neben der Neubildung verhindert es die EZM Degradation durch vermehrte Expression von Protease-Inhibitoren und verminderte Expression von Proteasen (Kollagenasen)²⁷. Die verdickte glomeruläre Basalmembran enthält zwar mehr EZM, jedoch weniger negativ geladenes Heparansulfat (Proteoglykan). Dadurch wird die Permeabilität für (hochmolekulare) Proteine, insbesondere für Albumin erhöht. Ferner werden die

kollagenen Bestandteile durch hochreaktive AGE-Produkte quervernetzt und führen zu einem unphysiologisch langlebigen Kollagen¹⁸. Neuere Studien legen nahe, dass die Schädigung des Glomerulums nicht nur auf Strukturveränderungen des Anionenfilters aufgrund EZM Akkumulation beruht. Die Schlitzmembran der Podozyten ist hauptsächlich aus dem Protein Nephrin aufgebaut, dessen Genexpression aufgrund bisher noch unverstandener Mechanismen sowohl im Tiermodell (Ratten)²⁸ als auch bei humanem DM²⁹ vermindert ist. Es scheint sich hierbei um einen Langzeiteffekt zu handeln, der nicht in den frühen Phasen der DN präsent ist. Inwieweit verminderte Nephrinexpression Ursache oder Folge für einen Podozytenverlust ist (s.u.) ist noch zu diskutieren.

Das **Tubulointerstitium** ist stark an der Pathogenese der DN beteiligt. Insbesondere die proximalen Tubuli als erste Resorptionsstation des Primärharns sind von Glukosurie, Proteinurie und AGE-Produkten betroffen. Histomorphologische Veränderungen wie Verdickung der tubulären Basalmembran²⁰, Tubulusatrophie und interstitielle Fibrose sind schon in der frühen Phase der DN zu finden und bestimmen deren Progression. Eine aktive Beteiligung erfahren Tubulusepithelzellen durch Bildung von TGF β ³⁰, Angiotensin II und EZM-Proteinen. Die glomerulär ausgelöste Signalkaskade wird hier verstärkt³¹. Die Nierenfunktion korreliert eng mit tubulointerstitieller Schädigung.

Das **Renin-Angiotensin-System** (RAS) ist in der frühen Phase an der Entwicklung von glomerulärer Hyperfiltration und renaler Hypertrophie beteiligt, in späteren Phasen fördert es sklerotische Prozesse. Wirksame Komponente ist das Angiotensin II (ANG II), welches mitogen und stark vasokonstriktiv wirkt. ANG II wird sowohl systemisch über die Niere als auch gewebständig in Organen synthetisiert. Dabei scheint das proximale Tubulussystem stark involviert zu sein. So fördert ANG II in proximalen Tubuluszellen die Endozytose von Albumin und anderen ultrafiltrierten Proteinen. Diese wiederum bewirken eine Stimulation des lokalen RAS in Tubuluszellen, sodaß hier ein selbstverstärkender Effekt eintritt. Studien belegen eine vermehrte Renin-mRNA-Expression im proximalen Tubulus in der frühen Phase des Diabetes mellitus³². Die tubuläre Hypothese der Hyperfiltration lässt sich damit gut erklären. Das lokale RAS in der Niere scheint verantwortlich für erhöhte Prorenin-Spiegel zu sein. Diese treten bei der DN des Menschen noch vor der Mikroalbuminurie auf³³. Zusätzlich wird die gesteigerte lokal-renale Angiotensin-II Produktion durch Standarddosierungen von ACE-Hemmern oder AT1-Rezeptor-Antagonisten nur unzureichend gehemmt³⁴.

Bei vorhandener **Proteinurie** kann diese glomerulären bzw. tubulären Ursprungs sein. Das Molekulargewicht der Proteine ist umso größer, je näher die Schädigung am Glomerulum liegt. Eine tubuläre Proteinurie umfasst z.B. Mikroglobuline, eine glomeruläre Albumin und IgG. Jedoch wird zunächst der Anionenfilter des Glomerulums (Basalmembranstrukturschädigung) und im weiteren Verlauf das Molekularsieb geschädigt. Die Proteinurie führt in proximalen Tubuluszellen zu Inflammation und Fibrose³⁰. Proteine werden aktiv (Sättigungskinetik) von proximalen Tubuluszellen per rezeptorassoziierter Endozytose aufgenommen. Die Proteinüberladung der Phagolysosomen bringt diese zum Bersten. Daraus resultiert entweder der Zelltod oder intrazelluläre Inflammation mit Freisetzung von Mediatoren (z.B. MCP-1, IL-8, Komplement) und Makrophagenattraktion. Die Mediatoren bewirken ET- und TGF- β -Genexpressionssteigerung. Schlussfolgernd ist die Proteinurie dosisabhängig tubuluszytotoxisch und ihre Verminderung ist essentiell^{35, 36}.

Eine **Hyalinose** der afferenten und efferenten Arteriole, wird durch angelagerte Plasmaproteine bewirkt. Sie hat eine widerstandsbedingte Drucksteigerung im Glomerulum zur Folge. Schliesslich nimmt die EZM innerhalb des Mesangiums zu und lässt sich mit PAS („peridoc acid Schiff“) anfärben. Dies bezeichnet man als diffuse Form der diabetischen Glomerulosklerose, die in die für die DN typische noduläre Form (Kimmelstiel-Wilson) übergehen kann¹⁹.

Hyperlipidämie, insbesondere Lipide geringerer Dichte (LDL) führen zur Freisetzung von MCP-1 und Podozytenverlust. Durch Statine wird die LDL Bildung vermindert. Es konnte in vitro gezeigt werden, dass Statine Zellschäden im Mesangium vermindern und die glomeruläre NO Produktion erhöhen³⁷. Schon 1936 erkannten Kimmelstiel und Wilson, dass der **arterielle Hypertonus** die DN beschleunigt. Inwieweit der arterielle Hypertonus vasoaktive Faktoren und Cytokine stimuliert, die Gefäßschäden verstärken, wird gegewärtig intensiv diskutiert.

1.1.3 **Therapeutische Konzepte und Ansätze**

Eine **normoglykämische** Stoffwechseleinstellung als essentielle Primärprävention bewirkt eine Risikoreduktion um etwa 1/3 für das Auftreten einer Mikroalbuminurie (DCCT-Studie, Typ 1: bis 34%; UKPDS-Studie, Typ 2: bis 24%³⁸). Das Hypoglykämierisiko steigt jedoch. Für den HbA_{1c}-Plasmaspiegel, als Kontrollinstrument und Indikator, und dem Auftreten einer Mikroalbuminurie besteht eine exponentielle

Beziehung. Hieraus lässt sich demzufolge kein Schwellenwert ableiten. Bezogen auf das Progressionsrisiko bei bereits bestehender DN sollte das HbA_{1c} unter 7% liegen³⁹. Die Mortalität von Patienten mit länger bestehendem Typ 2 Diabetes wird durch normnahe Blutzuckereinstellung jedoch nicht verringert⁴⁰.

Bei bereits bestehender DN gilt die **Inhibition des RAS** als Gold-Standard in der Behandlung der DN. Sie senkt den systemischen und insbesondere den renalen Blutdruck und vermindert Proteinurie sowie Podozytenschaden/ -verlust im Glomerulum. Schon in der klinisch stummen Phase der Hyperfiltration wirken Angiotensin-Konvertierungs-Enzym-Hemmer (ACE-H) protektiv⁴¹. Weiterhin vermindern sie die glomeruläre Hypertrophie, die Akkumulation der EZM und die Expression von Fibrosemediatoren (TGF-β)⁹. Der Hauptangriffspunkt ist hierbei die Hemmung des ANG II und seiner Wirkungen. ANG II wirkt stärker konstriktiv an der efferenten Arteriole. Durch die ACE-H wird die efferente Arteriole dilatiert, verstärkt wird der Effekt durch die Hemmung des Bradikininabbaus, welches unter anderem ebenfalls dilatierend wirkt¹⁷. Die Nephroprotektion wird durch verminderten glomerulären Perfusionsdruck schon bei normalen systemischen Blutdrücken erreicht. Das Fortschreiten der DN wird immer nur verlangsamt, nicht verhindert!

Als weiterer Therapieansatz gilt eiweißreduzierte Kost (0,8 g/kg/d), welche bei Typ 1 Diabetikern zu geringerem Abfall der GFR in Verbindung mit Abnahme der Proteinurie führt. Bei Hypoproteinämie und in fortgeschrittenen DN-Stadien mit kataboler Stoffwechsellage ist die Eiweißzufuhr zu erhöhen (1,2 g/kg/d)¹².

Eine **antihypertensive Therapie** mit Zielwerten unter 130/80 mmHG³⁹ gilt als leitlinienkonform. Dass eine ACE-Hemmer-Therapie bei normotensiven, normalbuminurischen Patienten zur Primärprävention einer Proteinurie von Nutzen sein könnte, zeigen neuere Studien (PREMIER⁴³). Aufgrund der natriumretinierenden Wirkung von Insulin (Steigerung der Rückresorption) ist der Hypertonus salzsensitiv. Eine milde **Kochsalzrestriktion** sollte erfolgen¹⁹. Neuere Therapieansätze sind u. a. die zytoplasmatische **Hemmung des zentralen Signaltransduktors PKC β** (Phosphorylierung von Proteinen)^{18, 19}.

Die **Inhibition von AGE-Produkten** durch Aminoguanidinhydrochlorid (Pimagedin) verminderte in Tierversuchen glomeruläre und tubuläre EZM Akkumulation^{44, 45} (Basalmembranverdickungen) durch eine verringerte Bildung von Transkriptionsfaktoren (NF-κB, PKC-β)⁴⁶. Ein weiterer Ansatz sind sogenannte „cross-link-breaker“ (z.B. ALT-711), welche bereits vorhandene AGE Produkte spalten.

Die **Hemmung von TGF- β** mittels Antikörpern (alphaT) zeigte im Tierexperiment eine deutliche Verringerung von glomerulärer und tubulointerstitieller Fibrose. An Menschen liegen bisher noch keine Erfahrungen vor¹⁹.

1.2 Tiermodelle zur Untersuchung diabetischer Nephropathie

In Versuchstieren kann ein DM Typ 1 bzw. eine Hyperglykämie de novo nach spontan oder exogen generiert werden. Als Modell für den DM Typ 2 dienen überwiegend durch Zucht gewonnene, vererbte Diabetesformen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein tierexperimentelles Verfahren zur exogenen Diabetesinduktion verwendet – das Streptozotocin-Modell (STZ). Die zeitnahe Entwicklung der Hyperglykämie und die hohe Sensitivität sowie Spezifität waren die Gründe für die Auswahl dieses Modells. Im Gegensatz zum Alloxandibetes, besitzt STZ keine schädigenden Kurzzeitwirkungen auf die Niere, da es dosisabhängig zytotoxisch (ab 100mg/kg) ist⁴⁷. Ferner ist Alloxan nicht β -Zell-selektiv. Die Langzeitwirkungen des kanzerogenen STZ spielen im Tierversuch bei Laufzeiten bis maximal 18 Monaten eine zu vernachlässigende Rolle. STZ wird in Maus und Ratte in zwei unterschiedlichen Dosierungsmodellen, dem Hoch-Dosis (HD)- und dem Mehrfach-Niedrigdosis (MLD)-STZ-Modell verwendet⁴⁸.

Das hier verwendete Tiermodell der transgenen Expression von humanem Endothelin-2 in der Ratte wurde von Paul et al. etabliert. Nach Mikroinjektion eines h-endoET-2-DNA-Konstruktes in fertilisierte Oozyten kam es zur stabilen Insertion der DNA in das Rattengenom^{49, 50}. Der renale Phänotyp dieses transgenen Modells wurde von Liefeldt et al. charakterisiert^{34, 51}. Die pharmakologischen Eigenschaften von ET-1 und ET-2 sind ähnlich. Die Transgenexpression erfolgt vorwiegend in den Glomeruli der Niere, wesentlich geringer auch im Gastrointestinaltrakt, in der Lunge und Nebenniere. Nichttransgene Tiere weisen keine ET-2 Expression in der Niere auf. Ein arterieller Hypertonus ist bei den Tieren nicht festzustellen (was die verminderte Transgenexpression in extrarenalen Geweben belegt), wohl aber eine signifikante, geschlechts- und altersabhängige Albuminurie. Der genetische Hintergrund ist zu vernachlässigen, da transgen-negative Tiere aus dem gleichen Wurf als Kontrollen verwendet wurden^{49, 50, 51, 52}.

1.3 Endothelin-System

Die Auswirkungen des parakrinen/ autokrinen ET-Systems erstrecken sich auf verschiedene **Organsysteme**. Untersuchungen zeigten, daß ET-Plasma-Spiegel unter anderem bei Herzerkrankungen (Herzinsuffizienz, Infarkt), arterieller sowie pulmonaler Hypertonie und Nierenerkrankungen (chron. Niereninsuffizienz, DM) erhöht sind. Zum Teil korrelieren sie mit dem End-Organ-Schaden und greifen in die Pathophysiologie der Erkrankung ein^{6, 53}.

1.3.1 Endothelin - Biosynthese

Das 1988 von Yanagisawa et. al. aus Endothelzellen der Schweinekoronararterien isolierte 21-Aminosäuren (AS) Peptid **Endothelin-1** (ET-1) gilt als äußerst potenter Vasokonstriktor⁵⁴. Im Folgenden wurden zwei weitere Isoformen der vasoaktiven Peptidhormonfamilie entdeckt: Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3). Sie unterscheiden sich in der AS-Sequenz (**Abb.1**) und Wirkung vom ET-1.

Alle humanen Endothelinprecursoren (PreproET's) werden von unterschiedlichen Genen auf unterschiedlichen Chromosomen codiert. Korrespondierende Genloci für Endotheline finden sich unter anderem im Schweine- und Rattengenom⁵⁵. Die Regulation der Genexpression erfolgt über chemische und mechanische Stimuli. Dazu gehören unter anderem Vasokonstriktoren und Thrombogene (Angiotensin II; Adrenalin; Thrombin; Prostaglandin $F_{2\alpha}$; ET-1), inflammatorische Zytokine (IL-1; IL-6; TGF- β), mechanische Faktoren (leichte Scherkräfte, Druck), Lipide (LDL; HDL) sowie Hypoxie^{56, 57}. Zusätzlich wird die ET-1 Synthese durch Hyperglykämie stimuliert (s.o.). Inhibiert wird die Synthese z.B. durch Vasodilatoren (Prostaglandin E_2 =Prostazyklin; NO; ANP), cGMP, Bradikinin⁵⁷, starke mechanische Beanspruchung (Scherkräfte)⁵³ und Adrenomedullin⁵⁸. Für die kurze intrazelluläre Halbwertszeit der preproET-mRNA von ca. 15 min sind zwei spezifische Sequenzen („AUUUA“) am 3'-Ende verantwortlich⁵⁶.

Das Endothelin-Vorläufer-Protein Preproendothelin (**Abb. 2**) umfasst 212 AS und wird unter Abspaltung einer Signalsequenz (17 AS) im endoplasmatischen Retikulum durch molekular noch nicht identifizierte "Prohormon-Konvertierungs-Enzyme" (Furine?) in das Peptid "Big-Endothelin" (BigET; 38 AS) umgewandelt. BigET hat nur eine geringe vasokonstriktive Wirkung⁵⁷. Endothelin-Konvertierungs-Enzyme (ECE) spalten BigET proteolytisch zwischen Tryptophan 21 und Valin 22 (**Abb. 3**) in das stark vasoaktive ET⁵⁶.

Die bisher bekannten **ECE**-Isoformen (ECE-1; ECE-2; ECE-3) weisen eine hohe Homologie auf und gehören zum Typ II der integralen Membranproteine. Für die **ECE-1** wurden bisher 4 Isoformen (a-d) identifiziert⁶⁰. Ebenso finden sich Isoformen z.B. im

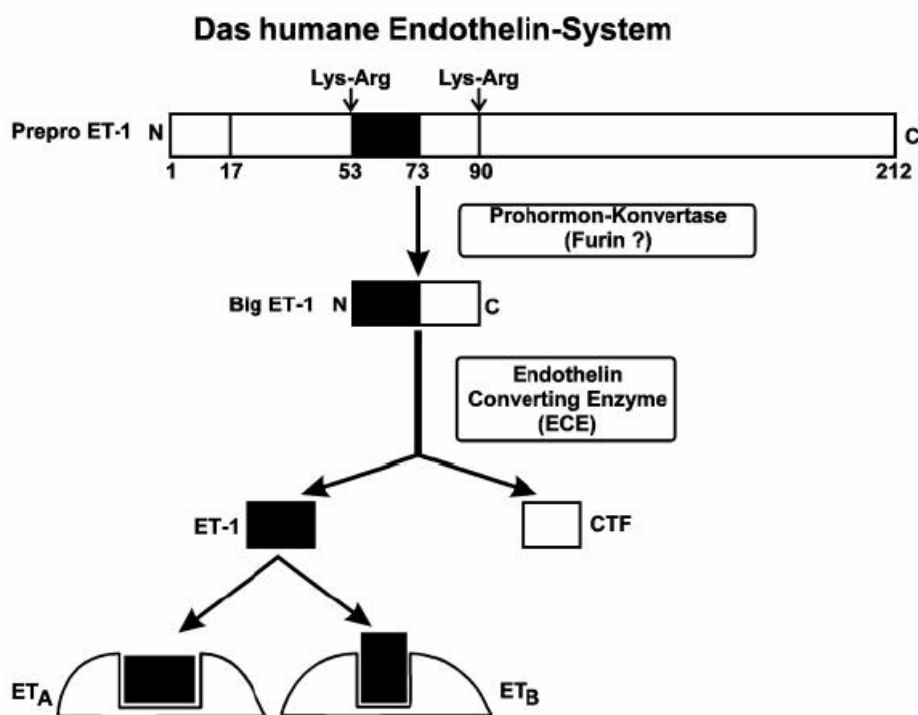


Abbildung 2 : Schematische Darstellung der Endothelin-1-Biosynthese

Das Pre-Pro-Endothelin-1 ist ein ca. 200 AS-großes Protein. Durch Spaltung entsteht das Propeptid Big-Endothelin-1 (Big-ET-1). Die weitere Spaltung des Big-ET-1 zu ET-1 und dem C-terminalen Fragment (CTF) erfolgt durch das ECE-1⁵⁹.

Rattengenom, wo das ECE-1 α und ECE-1 β , homolog zu den humanen ECE-1a bzw. ECE-1c, isoliert wurden⁶¹. Insbesondere ECE-1 scheint in die Pathophysiologie der frühen Gefäßschädigung beim Typ 1 Diabetes einzugreifen. Dieser Effekt scheint durch PKC β und NF- κ B vermittelt zu sein. Experimentelle ET_A-R Blockade vermindert die

Genexpression der ECE-1⁶². Eine Blockade des Enzyms führt zu verringerter EZM Akkumulation und Proteinurie/ Albuminurie im Tierexperiment⁶³.

Das Endothelin-Konvertierungs-Enzym-2 (**ECE-2**) besitzt optimale Enzymaktivität im sauren pH (5,5), lokalisiert im intrazellulären Kompartiment. Bei pH 7 (Optimum ECE-1) ist ECE-2 komplett inaktiv. Jüngst wurde im Mausmodell gezeigt, dass die ECE-2 Genexpression in der frühen Phase des Typ 1 Diabetes stark vermindert ist. Dieser Effekt konnte durch einen selektiven ET_A-R Antagonisten aufgehoben werden⁶².

ECE-3 ist spezifisch für big-ET 3.

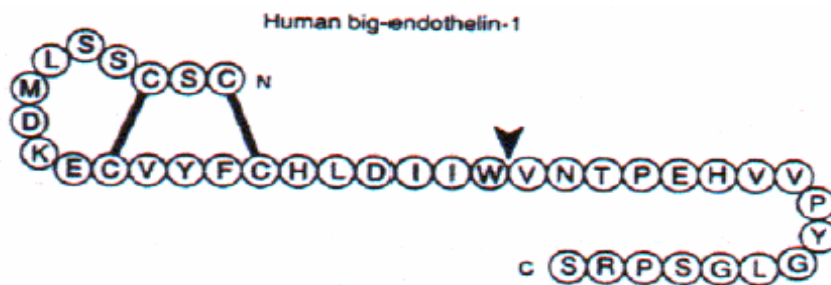


Abbildung 3 :

Aminosäurestruktur von Big-Endothelin-1. Aus Big-Endothelin-1 wird durch proteolytische Spaltung der Bindung zwischen Trp21 und Val22 mit Hilfe des Endothelin-Converting-Enzyme-1 (ECE-1) das vasoaktive Peptid ET-1 gebildet⁵⁶.

Im Gewebe und in Körperflüssigkeiten (Speichel; Liquor; Milch; Urin) sind die ET-Spiegel gegenüber dem Blutplasmaspiegel bis zu 100fach erhöht⁶. Grund dafür sind die starke Rezeptorbindung und der para- bzw. autokrine Wirkungsmechanismus⁵³.

Dieses wird durch die Feststellung belegt, daß ET-produzierende Zellen ET-Rezeptoren exprimieren⁶⁴. Ferner findet in Lunge und Niere eine rasche Endothelin-„clearance“ via ET_B-R statt (s.u.). Gebildet wird ET-1 vorwiegend in Endothelzellen, Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen, geringfügig auch in Astrozyten. In der Niere kommt es in Tubulus- und Mesangialzellen vor^{57, 65}. ET-2 ist hauptsächlich in der Niere und im Intestinum vertreten. ET-3 wird größtenteils im ZNS und im Auge gebildet⁵³.

1.3.2 Endothelin-Rezeptoren

Die biologischen Wirkungen werden durch die **Endothelin-Rezeptoren** (ET-R) ET_A-R und ET_B-R vermittelt. Ein ET_C-R ist in Hautdrüsen des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) entdeckt worden, wurde allerdings für Säuger noch nicht beschrieben⁶⁶. Alle gehören zu

den Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren und sind G-Protein (G_i/G_q) gekoppelt, mit resultierender intrazellulärer Calcium Erhöhung⁶⁷.

Die Affinität zu den einzelnen ET's ist rezeptorspezifisch (**ET_A-R**: ET-1 \geq ET-2 \gg ET-3; **ET_B-R**: ET-1=ET-2=ET-3; **ET_C-R**: ET-3 \gg ET-2=ET-1^{66, 68, 69}).

Die biologischen Effekte (Nettoeffekt) sind abhängig von der Verteilung und Anzahl der Rezeptoren in den Geweben. Zumeist sind sie ET-1 vermittelt, da es hohe Affinität sowohl zum ET_A- als auch zum ET_B-Rezeptor besitzt und ubiquitär exprimiert wird.

In glatten Gefäßmuskelzellen dominiert der **ET_A-R**. Im Endothel ist er nicht vertreten^{66, 68}. Er vermittelt lokal Vasokonstriktion sowie Zell- und Matrixproliferation (Induktion von Wachstumsfaktoren z.B. PDGF, TGF- β , IGF, ANG II)^{53, 64}.

Der **ET_B-R** findet sich spezieübergreifend hauptsächlich im Gefäßendothel (u. a. Niere, Lunge, ZNS, Herz). Geringfügig (<15%) ist auch er in glatten Gefäßmuskelzellen vertreten. Der ET_B-R vermittelt sowohl konstriktive (Gefäße/ Bronchien) als auch dilatative (Gefäßendothel) sowie proliferative (Nierentubuli, Mesangium) Effekte. Die physiologische Relevanz des vasokonstriktiven Effektes ist umstritten. Lokale Vasodilatation wird über Prostazyklin (PGI₂)- und Stickoxyd (NO)- Freisetzung in Endothelzellen erreicht. Die NO Bildung erfolgt durch funktionelle Kopplung des ET_B-R zur NO-Synthase (NOS)^{66, 70}. NO bewirkt die Lösung des ET-1 vom ET_A-R und modifiziert die Signalkaskade⁷¹. Der ET_B-R bindet überschüssiges ET-1 und wirkt somit als „clearing-receptor“. Dadurch antagonisiert er die vasokonstriktive und mitogene Wirkung des ET-1 via ET_A-R^{55, 68}. Über Autoinduktion der ET-1 Genexpression und Peptidproduktion verstärkt der ET_B-R die endogene Endothelinproduktion als Reaktion auf diverse Stimuli (Ischämie, Toxine). Analog zu Zytokinen (TGF- β , IL-1) wird so eine Signalamplifikation erreicht⁶⁴. Entwicklungsbiologisch werden der ET_B-R und ET-3 mit der Ausbildung des aganglionären Megacolons (Morbus Hirschsprung) in Zusammenhang gebracht^{72, 73}. Für den ET_A-R sind noch keine entwicklungsbiologischen Einflüsse benannt. Interaktionen der Rezeptoren mit Arzneimitteln sind bekannt. So wird z.B. der ET_B-R in der Niere (nur im Marklager) durch Cyclosporin und Kontrastmittel induziert, der ET_A-R hingegen nicht beeinflusst⁷⁴. Sowohl für den ET_A- als auch den ET_B-R sind selektive **Antagonisten** bekannt.

1.3.3 **Renales Endothelin-System**

ET-1 steigert die NaCl-Retention analog der Wirkung von ANG II von proximalen Tubuluszellen und verringert die Wasserausscheidung^{57, 75}. Es reguliert Hämodynamik, Filtrationsleistung und glomeruläres Remodeling^{76, 77}. Der Salzhaushalt wird neueren Studien zufolge teilweise durch den ET_B-R im Sammelrohr reguliert. Der ET_A-R scheint an der Regulation nicht beteiligt zu sein⁷⁸. Exogenes ET-1 reduziert die renale Perfusion sowie GFR, induziert sowohl Proliferation als auch Kontraktion von Mesangialzellen, verringert die Salzretention und erhöht die Wasserausscheidung^{27, 75, 76}. Der vasodilatierende und antinatriuretische Effekt des parakrinen renalen ET-Systems ist dann zu vernachlässigen⁷⁶.

Speziesabhängig werden unterschiedliche ET-Isoformen synthetisiert: in humanen proximalen Tubuluszellen vorwiegend ET-1 und ET-2^{76, 79}, in Rattennieren ET-1 und ET-3⁸⁰. Proteinexposition steigert in proximalen Tubuluszellen die ET-Expression (siehe Biosynthese)⁸¹. Noxen wie z.B. Hypoxie steigern die Genexpression von ET-1, die von ET-2 hingegen nicht.

Die Verteilung der **ET-R** ist spezies- und gewebeabhängig. Der humane ET_A-R findet sich vor allem in afferenten und efferenten Arteriolen und im Glomerulum, der ET_B-R hingegen ist vorwiegend in Tubuluszellen vertreten, weniger im Glomerulum. Beide Rezeptorsubtypen finden sich in Sammelrohren. Dabei überwiegt beim Menschen insgesamt der ET_B-R. Bei der Ratte herrscht ein Rezeptorgleichgewicht in afferenter und efferenter Arteriole⁸². Im Tubulussystem ist der ET_A-R distal und im kortikalen Abschnitt des Sammelrohrs sowie in Mesangialzellen zu finden. Der ET_B-R hingegen ist stark in peritubulären und glomerulären Endothelzellen nachweisbar. Im Tubulussystem verteilt er sich eher proximal und im marknahen Sammelrohr⁸³.

In Rattennieren inhibieren alle 3 ET-Isoformen die Reninsekretion, wenn sie exogen zugeführt werden. Dies scheint ein ANG II vermittelter Feedbackmechanismus zu sein, da sich ET und ANG II in der Wirkung verstärken⁸⁴. Es zeigt sich, dass endogenes ET keinen Einfluss auf die Reninsekretion hat⁸⁵.

1.3.4 **Interaktionen zwischen Endothelin und Diabetes**

Im STZ-Tiermodell (Ratte) wurde festgestellt, dass Hyperglykämie die endogene glomeruläre ET-1-mRNA-Expression um das 5-fache erhöht. Insulingaben wirken diesem Effekt entgegen. Einen Einfluss der Hyperglykämie auf die Rezeptorexpression

(ET_{A/B}-R) gibt es nicht⁶⁵. Eine Rezeptordesensibilisierung besonders des ET_A-R im Diabestesmodell (STZ-Ratte) wurde berichtet⁸². Andererseits wurde für Insulin ein ET-1 stimulierender Effekt in vitro (Endothelzellkultur) und in vivo (hyperinsulinaemic euglycaemic clamp) mit messbarer Erhöhung der ET-1 Plasmaspiegel nachgewiesen⁸⁶. Dabei steigert Insulin auch die ET-R Expression⁸². Ob dies in vivo pathophysiologisch relevant ist, bleibt abzuwarten. Beim DM wird die ET-1 Genexpression in humanen Mesangialzellen (Zellkultur) durch TGF- β 1 und aktivierte PKC verstärkt⁷⁶. Im Hasenmodell (Alloxandiabetes) erfolgt im Glomerulum eine ET_A-R vermittelte TGF- β Überexpression mit konsekutiver Glomerulosklerose. Der ET_A-R wird hier vermehrt exprimiert, eine Blockade zeigt antimitogene und antiproteinurische Effekte⁸⁷. Beim Menschen reduziert ET-1 via den ET_A-R die Insulinsensitivität und bewirkt eine renale Vasokonstriktion (afferente und efferente Arteriole). Dadurch und durch Plättchenaggregation kommt es zur Mikrothrombenbildung in Kapillaren. Es resultiert eine Zirkulationsstörung. Ferner scheint eine ET_A-R Stimulation (BQ788) die Konversion von bigET-1 in ET-1 zu hemmen^{87, 88}. ET-1 vermittelt via den ET_A-R in Mesangialzellen (Ratte/Mensch) Kontraktion, Proliferation und Vermehrung der EZM. Die proliferativen Wirkungen (TGF- β -, PDGF-Expression \uparrow) werden durch vermehrte Fibronektin- und Kollagenbildung (Typ I/III/IV) bewirkt, so dass ein Zusammenhang des ET-Systems mit Nierenfibrose und Glomerulosklerose besteht^{64, 80, 87}.

Schädigungsmechanismen der Niere durch ET sind die kortikale und medulläre Hypoperfusion und eine verstärkte interstitielle und mesangiale Proliferation der EZM mit Verdickung der tubulären und glomerulären Basalmembranen⁷. In Mesangialzellen scheint dafür eine ET-vermittelte Thromboxan A₂ –und Kollagensynthesesteigerung ursächlich zu sein⁸⁹. In Tubuluszellen tritt der oben beschriebene Protein-gekoppelte Mechanismus in Kraft. Podozyten exprimieren bei diabetischer Stoffwechsellage ET-1 und ET-R (bes. ET_A-R). Es wird eine ET_A-R vermittelte zytoskelettale Schädigung und Apoptoseinduktion von Podozyten vermutet⁹⁰. Gross et al 2003 hingegen konnten keinen Vorteil eines selektiven ET_A-R Blockers gegenüber ACE-Hemmern bezüglich Podozytenverlustes und histopathologischen Podozytenschadens finden⁹.

2 Fragestellung

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, die Rolle des Endothelin-Systems in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie weiter zu charakterisieren.

Unsere Ausgangshypothese war, dass eine verstärkte renale Endothelin-Expression den Ausprägungsgrad von diabetischer Nephropathie verstärkt. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde in einem Rattenmodell mit transgener Überexpression von humanem Endothelin 2 (h-endoET-2+) eine diabetische Stoffwechsellage mittels Streptozotozin-Injektion induziert und der Verlauf über insgesamt 6 Monate beobachtet.

Zusammen mit den Kontrollen wurde insgesamt vier Versuchsgruppen gebildet:

- 1) nichttransgene, nichtdiabetische Tiere;
- 2) nichttransgene, diabetische Tiere;
- 3) h-endoET-2-transgene, nichtdiabetische Tiere; und
- 4) h-endoET-2- transgene, diabetische Tiere.

Nach 6-monatiger Versuchsdauer wurden die Auswirkungen von diabetischer Stoffwechsellage, Endothelin-2-Überexpression und ihrer Kombination auf den Schweregrad von diabetischer Nephropathie (Proteinurie, Hypertrophie, glomeruläre Fibrose und Nierenfunktion) untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss auf das Überleben der Tiere und die Veränderungen in der renalen Expression des endogenen Endothelinsystems erfasst.

3 Material und Methoden

3.1 Validierung des Studiendesigns

3.1.1 **Transgenexpression**

3.1.1.1 DNA-Isolation

Die DNA Isolation erfolgte nach der Standardmethode⁹¹, entnommen dem Quiagen Plasmid Purification Handbook, Hilden 2002. Sie beinhaltet die Lyse des Startmaterials (Blut, Gewebe usw.), gefolgt von der Isolation durch organische Extraktion und schließlich der Fällung der DNA im Extrakt. Die Gewebe wurden über Nacht mit einem Proteinase-K-haltigen Lysis-Puffer inkubiert. Die nun freigesetzte DNA wurde mittels Chloroform aus der Lösung extrahiert und mit Isopropanol gefällt. Die isolierte (genomische) DNA wurde dann in der PCR verwendet (siehe 1.1.4.).

3.1.1.2 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte nach dem Phenol-Chloroform Verfahren von Chomczynski und Sacchi⁹² unter Verwendung von TRIzol™ (Life Technologies Inc., Gathersburg, USA). Entsprechend den Herstellerangaben wurden 100 mg cortikales Gewebe verwandt bzw. isolierte Glomeruli. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm. Zur Überprüfung der Integrität der RNA wurde ein 1%iges Agarose / Ethidiumbromid-Gel benutzt.

Alle Materialien, die mit der zu isolierenden bzw isolierten RNA in Kontakt kamen, wurden vorher mit RNase-ZAP (Invitrogen, Carlsbad, USA) behandelt, nachfolgend mit DEPC-H₂O gespült oder waren steriles Einwegmaterial. Die isolierte RNA wurde bei – 80°C gelagert.

3.1.1.3 c-DNA Synthese

Zur Herstellung von DNA aus RNA, wie sie aus transkribierten Genen in der Zelle vorliegt, dient die reverse Transkription. Die dabei entstehende DNA ist basenkomplementär zur RNA und wird daher als cDNA (c ="complementary") bezeichnet. Im Vergleich zu genomischer DNA enthält cDNA ausschließlich transkribierte Exons (erbinformationscodierende Sequenzabschnitte). Die Introns werden während der posttranskriptionalen Reifung („splicing“) aus der prae-mRNA entfernt, so dass reife mRNA (m="messenger“) und somit auch die cDNA nur Exon-Information enthält. Aus isolierter corticaler Gesamt-RNA wurde cDNA nach dem

GeneAmp® Protokoll (Roche Molecular Systems Inc., Branchburg, USA) hergestellt. Dabei wurden 1µg jeweiliger Gesamt-RNA / glomerulärer cDNA sowie Reagenzien lt. Herstellerangaben eingesetzt. Für die weitere Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.1.1.4 PCR (Polymerase Kettenreaktion)

Nach dem GeneAmp®-Protokoll vorgehend, wurden cDNA aus 1/50 von je 1 µg Gesamt-RNA oder genomische DNA mit 2 µl 25 mM Magnesiumchlorid, 2 µl 10xPCR-Puffer, 0,1 µl dNTP-Mix, 1 µl Sense-Primer (ET-2 RNA sense [5'-AGCGTCCTCATCTCATGCC-3']; TIB MOLBIOL, Berlin, D), 1 µl Antisense-Primer (ET-2 RNA antisense [5'-TCTCTTCCTCCACCTGGAATG-3']; TIB MOLBIOL, Berlin, D) und 0,25 µl Ampli Taq Gold (4 U/µl) sowie DEPC-H₂O ad 20 µl versetzt. Nach initialer Denaturierung bei 95°C für 10 min begann der Zyklus mit der Denaturierung 95°C/ 30 sec., dann das primerspezifische Annealing 60-62°C/ 30-45 sec., gefolgt von der Extension 72°C/ 60 sec, wobei, abhängig von der PCR, eine Schleifenanzahl von 26-39 gewählt wurde. Anschließend erfolgte eine finale Extension bei 72°C über 6 min und das PCR-Produkt wurde bei 4°C gelagert.

| Reagenzien | Volumen (µl) |
|--------------------------|---------------------|
| PCR-Puffer (10x) | 2 |
| MgCl ₂ (25mM) | 2 |
| dNTP mix | 0.1 |
| Ampli Taq Gold (4U/ml) | 0.25 |
| RT Product | 1 |
| Primer sense | 1 |
| Primer antisense | 1 |
| DEPC Wasser | 12.65 |

3.1.1.5 LightCycler PCR

Eine quantifizierende PCR wurde mit dem LightCycler® nebst zugehörigen Datenverarbeitungseinrichtungen durchgeführt. Dabei wird mit einem fluoreszierenden Marker (SYBR® Green I) Doppelstrang-DNA detektiert und als Graphik über der Zeit

dargestellt. Die Fluoreszenz des SYBR[®] Green I wird durch Bindung an dsDNA verstärkt. Das Hintergrundsignal ungebundener Marker wird durch die Software herausgefiltert. So ist die Menge der in der PCR synthetisierten DNA pro Zyklus „real time“ anhand des Fluoreszenzsignales visualisierbar. Der Beginn der exponentiellen Produkt-Zunahme, der linearen Logphase der PCR, wird aufgrund der Fluoreszenzzunahme bestimmt und entspricht dem so genannten „crossing point“. Dieser korreliert mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden cDNA-Sequenz und kann deshalb zur Quantifizierung der Transkripte herangezogen werden. Der Marker ist sehr stabil, verliert nur 6 % seiner Aktivität während 30 Zyklen. Nach Ablauf der definierten Zyklenzahl bzw. letzter Elongationsphase der PCR erfolgt die Schmelzkurvenanalyse, bei der nach initialer Denaturierung mittels kontinuierlichem Temperaturanstieg (von Annealing Temp. bis max. 95°C) die Fluoreszenz permanent gemessen wird. Mit steigenden Temperaturen werden unspezifische dsDNA-Produkte (Primerdimere) gespalten, so daß die Fluoreszenz zunimmt. Abhängig vom jeweiligen PCR-Produkt fällt bei Erreichen der Schmelztemperatur (Denaturierung der DNA) die Fluoreszenz abrupt ab. Die Schmelztemperatur (Fluoreszenz-Spitze) ist abhängig von der Länge des Fragmentes und dessen Guanin/Cytosin Gehalt. Um spezifische von unspezifischen Fluoreszenzsignalen zu unterscheiden, vergleicht man die Schmelzpunkte der Produkte miteinander. Typischerweise weist das gesuchte spezifische PCR-Produkt den höheren Schmelzpunkt und stärkeren Fluoreszenzsignalanstieg auf.

Es wurde konzentrationseingestellte cDNA (1 µg/ml) eingesetzt sowie glomeruläre Überstände. Vorbereitung und Verarbeitung der Reagenzien und Proben erfolgten lt. Herstellerangaben. Rattenspezifische Primer wurden für TGF-β, Adrenomedullin, FN, PAI-1, ET-1, und ET-Rezeptoren verwandt. Humanspezifische Primer wurden nur für ET-2 verwendet. Alle Messungen wurden in Relation zu einem Standard (beta-actin= „house keeping gene“) gesetzt.

3.1.1.6 Transgentestung und Gruppenallokation

Zur Überprüfung des Transgen-Status (hET-2 +) der Versuchstiere wurde aus Schwanzspitzen neugeborener Ratten genomische DNA gewonnen. Die Isolation erfolgte nach einer Standardmethode (siehe 1.1.1.). Die genomische DNA wurde dann mittels PCR (siehe 1.1.4.) analysiert. Anhand der Testergebnisse wurden die Tiere in folgende Gruppen eingeteilt.

WT -nichttransgene nichtdiabetische Ratten n=17 (Kontrolle)

WT+DM -nichttransgene diabetische Ratten n=17

TG -transgene (hET-2+) nichtdiabetische Ratten n=14

TG+DM -transgene (hET-2+) diabetische Ratten n=15

Alle Tiere wurden zu Beginn und nachfolgend alle 4 Wochen einzeln für 24 h in Stoffwechsellkäfigen gehalten. Dies diente der Bestimmung von Kreatinin-Clearance, Proteinurie, Albuminurie sowie Blutzuckerspiegeln. Weiterhin wurden Wasser- und Futterverbrauch monitorisiert. Der Versuch wurde nach 6 Monaten beendet.

3.1.1.7 Endothelin 1/2-ELISA

Zur Messung von Endothelinen wurde ein indirekter, nicht kompetitiver Sandwich-ELISA (Biomedica, Wien, A) verwendet, bei dem ein für Endothelin (1-21AS) hochspezifischer monoklonaler Detektionsantikörper an das in der Probe befindliche Endothelin bindet. Zusammen mit dem in der Mikrotiterplatte beschichteten polyklonalen Erstantikörper bildet er ein Sandwich. Nach einem Waschschrift, der alle nicht spezifisch gebundenen Substanzen entfernt, wird die Menge an gebundenem monoklonalem Antikörper bestimmt. Sie entspricht der Menge vorhandenen Endothelins. Mittels Peroxidase-konjugierter anti-Maus IgG-Antikörper und Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat, werden im Photometer messbare Farbentwicklungen erzeugt, die direkt proportional der Endothelin-Probenkonzentration sind. Nach Herstellerangaben vorgehend, wurden jeweils 200 µl Rattenplasma (Ansatzprotokoll B), sowie glomeruläre Überstände (Ansatzprotokoll C) als Proben eingesetzt. Die Messung der einzelnen Extinktionen wurde mit Hilfe eines ELISA-MRX-Plate-Readers bei 450 nm gegen 620 nm vorgenommen. Die Erstellung der Standardkurve und die Berechnung der Konzentrationen (fmol/ml) erfolgte mit dem Computerprogramm *Biolinx*.

3.1.2 Induktion des Diabetes mellitus

3.1.2.1 Streptozotocinadministration

Zur Induktion eines Insulinmangeldiabetes wurde das von *Streptomyces achromogenes* spp. gebildete Alkylans Streptozotozin (STZ) verwendet. Die besondere Affinität zu den β -Zellen des Pankreas resultiert aus dem Glucosemolekül, an das der Nitrosamid-methyl-Nitrosoharnstoff (wirksame Komponente) gebunden ist. Die Aufnahme in die Pankreasinselzelle erfolgt aktiv durch den Glucosetransporter-(GLUT)-2. Dadurch ist

mit diesem ähnlich einem „Trojanischen Pferd“ agierenden Molekül eine dosisabhängige relativ selektive Schädigung der Inselzellen möglich⁹³. Zu beachten ist, dass glukoseunabhängige Inselzellen demzufolge unempfindlich sind. Der Mechanismus der Zellschädigung ist im hypothetischen Modell nach Okamoto⁹⁴ dargestellt: durch die Einwirkung von STZ kommt es nach Methylierung der DNA zu DNA-Strangbrüchen, die u.a. mit Hilfe der nukleären Poly-(ADP-Ribose)-Synthetase (PARP) repariert werden. Dieses Enzym verbraucht zelluläres Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD), welches für viele Zellaktivitäten benötigt wird. Sinkt der intrazelluläre NAD-Spiegel unter einen Schwellenwert, tritt der Zelltod ein. Folglich kann nicht mehr genügend Insulin produziert werden und der Glukosespiegel im Blut steigt an. Es bildet sich ein Diabetes mellitus aus. Eine Verabreichung von Nikotinamid hemmt die PARP und somit den NAD-Verbrauch der Zelle. Der Zelltod kann verhindert werden⁹⁵. Neuere Studien zeigen, dass STZ bei seiner Metabolisierung in Hepatozyten und Pankreasinseln Stickoxyd (NO) freisetzt⁹⁶. Dieses verstärkt die STZ-induzierte Zytotoxizität (DNA-Methylierung) und setzt Zytokine (Interleukin 1 β) frei. Sie spalten DNA in Fragmente von 180-200 Basenpaaren, bewirken eine Kondensation der Chromosomen und Apoptose der Zelle⁹⁷. Es bildet sich ein Insulinmangeldiabetes aus. Bei 32 Tieren (17 WT/ 15 TG) wurde Streptozotozin, nach Herstellerangaben frisch in 0,15 M Zitratpuffer pH 4,5 gelöst, intraperitoneal in Ethernarkose in einer Dosis von 60 mg/kg gespritzt. Ratten mit einem Blutzucker (BZ) von >250 mg/dl nach 2 Tagen wurden in die Studie eingeschlossen. Die zu applizierende STZ-Dosis war zuvor in einer Pilotstudie ermittelt worden.

3.1.2.2 Blutzuckermessung

Die Messung erfolgte zu Beginn des Versuches und nachfolgend alle 4 Wochen bzw. nach klinischer Notwendigkeit. Mittels eines MediSense Precision PCX™ und den entsprechenden Teststreifen wurden Blutzuckerwerte enzymatisch nach der Glucose-Oxidase Methode zwischen (zw.) 9°° und 12°°Uhr aus Schwanzvenenblut gemessen. Dabei wird Glukose zu Glukonsäurelaktone katalysiert. Die bei der Oxidation entstehenden Elektronen werden direkt an die Messelektrode abgegeben. Die Tiere wurden hierfür mit Ether narkotisiert und die laterale Schwanzvene im unteren Drittel per 0,6 mm Kanüle punktiert.

3.1.2.3 Insulintherapie

Nach 3 Wochen wurde bei den diabetischen Tieren zunächst 2 tägig mit der Insulintherapie begonnen. Nach 12 Wochen wurde täglich Insulin verabreicht. Verwendet wurde langwirksames Insulin Glargin (Lantus 100U/ml; Aventis, Basel, CH). Die tägliche Dosis orientierte sich am BZ- und Gewichtsverhalten der Tiere und variierte zwischen 2 bis 8 IE. Für die diabetischen Tiere wurde ein Ziel-BZ zw. 250-450 mg/dl angestrebt. Die obere Grenze des BZ-Messgerätes liegt bei 600 mg/l. Bei Anzeige dieses Wertes wurde den Tieren immer die maximale Insulindosis von 8 IE verabreicht. Das Insulinanalogon wurde mittels eines Insulin-PEN subcutan gespritzt.

3.2 Basisdaten

3.2.1 Tiere

Verwendet wurden 63 männliche Sprague-Dawley (SD) Ratten im Alter von 8 Wochen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 235-279 g. Die Zucht erfolgte durch Verpaarung männlicher heterozygoter L37-Tiere (hET-2+) mit nichttransgenen weiblichen SD-Ratten. Mittels Transgentestung (siehe unten-s.u.) wurden die Tiere in die Hauptgruppen eingeteilt. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen (RT 21°C RLF 75%) gehalten bei 12stundigem Hell/Dunkel-Wechsel. Futter und Wasser wurde *ad libitum* angeboten. Die Tiere befanden sich in Makrolonkäfigen Typ IV im Forschungszentrum für Experimentelle Medizin der Freien Universität Berlin unter ständiger Betreuung durch einen Tierpfleger/ Tierarzt. Der Tierversuch wurde am 27.05.2002 durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit genehmigt (G0009/02). Alle Arbeiten erfolgten nach den prinzipiellen Laborrichtlinien und Anleitungen zum Umgang mit Labortieren.

3.2.2 Stoffwechsellafiguntersuchungen

Zu Beginn und dann alle 4 Wochen wurden die Tiere jeweils für 24 h einzeln in einem Stoffwechsellafig gehalten. Dabei wurden Urin und Kot getrennt aufgefangen. Die Urinvolumina wurden anhand der skalierten Sammelröhrchen bestimmt. In diese wurde zu Beginn der Sammlung 100 µl Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml, 10 mg/ml, Biochrom KG, Berlin) gegeben, um eine bakterielle Zersetzung des Urins (insbes. Proteine) zu verhindern. Der Sammelurin wurde bei 4000 U/min 10min und 4°C

zentrifugiert (Megafuge 2.0R) und 2 Aliquots á 2 ml pipettiert. Der Urin wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.3 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte stets am 2. Tag der Stoffwechselläufiguntersuchung in leichter Ethernarkose aus der lateralen Schwanzvene (0,8 ml Blut). Die Monovetten wurden anschließend 15 min bei 3000 U/min und 4°C zentrifugiert (Megafuge 2.0R; Heraeus, Hanau) das Plasma abpipettiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.4 Systolische Blutdruckmessung / Herzfrequenz

Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz wurden nicht-invasiv an wachen Tieren „unblutig“ (Tailcuff-Methode) gemessen. Der Drucksensor wurde 1 cm von der Schwanzwurzel entfernt positioniert. Es wurde ein halbautomatisches Infratongerät verwendet. Während der Messung wurden die Ratten zur Ruhigstellung in ein Acrylglasrohr („Restrainer“) gesetzt. Die Anwärmung erfolgte mit einer Infrarot-Lampe. Zur Adaptation wurden die Tiere eine Woche zuvor mindestens 4 mal unter Berücksichtigung circadianer Rhythmik antrainiert. Pro Tier wurden mindestens 3 Messungen gemittelt in die Auswertung übernommen.

3.2.5 Tiertötung/Organgewinnung

Zur Narkose wurde Ketamin (90-120 mg/kg Ketamin 10 %; WDT, Garbsen) und Xylazin (6-8 mg/kg Rompun 2 %; BayerVital, Leverkusen), intramuskulär injiziert. Nach Eröffnung des Abdomens wurde die Aortenbifurkation freigelegt und punktiert. Die Abnahme von Vollblut (Serum) und EDTA-Blut (Plasma) erfolgte bis zum Stillstand des Herzens. Anschließend wurde das Tier bis zum Einsetzen des Herzschlages mit PBS reperfundiert. Nach Abklemmen der Aorta oberhalb des Abganges der Nierenarterien und Eröffnung eines venösen Gefäßes (V. cava inf.), wurden 50 – 60 ml 4°C kaltes PBS zur Perfusion der Nieren eingesetzt. Ausreichend perfundierte Nieren, erkennbar an der Blässe der Oberfläche, wurden stumpf aus der Fettkapsel geschält und in 4° C kaltem PBS zwischengelagert. Beide Nieren wurden gewogen. Gewebestücke für Histologie (Transversalschnitt in Höhe des Hilus) und RNA-Isolation

(Cortex - Polkappe) wurden in Formalin bzw. Flüssigstickstoff asserviert. Das Restgewebe beider Nieren wurde zur Isolation von Glomeruli benutzt (siehe 2.6.). Herz und Augenpräparation erfolgten durch andere Untersucher.

3.2.6 **Isolation von Glomeruli**

Diese Methode erlaubte das gezielte Isolieren von Glomeruli aus Rattennieren. Alle Arbeitsschritte erfolgten in einem eisgefüllten Kunststoffbehältnis, so dass weder Nierenhomogenat, noch Glomeruli über 4°C erwärmt wurden. Alle Arbeitsmittel waren steril und soweit möglich, auf 4°C gekühlt. Entnommene Rattennieren wurden aus ihrer Kapsel geschält. Mit einer Rasierklinge wurden die Nieren in Längsachse median geteilt und das pelvine bzw. hiläre Bindegewebe mit gebogener Schere entfernt. Die gesäuberten Nierenhälften wurden auf einer Glasplatte (auf Eis) mit einer Laborklinge homogenisiert (15 min). Dann wurden 3 übereinander gestapelte Prüfsiebe für Luftreinigungsanlagen (nach ISO 3310-1) verwendet, um die Glomeruli zu isolieren. Die Maschengrößen der Siebe betragen 160 µm – 125 µm – 71 µm, so dass auf dem 71'er Sieb schließlich die Glomeruli verblieben. Das Durchtreiben des Nierenhomogenates erfolgte mechanisch mit Glaspistill und eiskaltem PBS aus einer Spritzflasche. Dabei wurde mit dem Pistill in kleinen kreisenden Bewegungen die Masse auf der Sieboberfläche ohne Druck verteilt und anschließend mit PBS gespült. Dies erfolgte auf dem ersten Sieb ca. 5-7 mal, je nach Ausbeute. Dann wurde das erste Sieb entfernt und darunter, auf dem 2. Sieb nur mit einer Spritzflasche direkt gespült. Im 3. Sieb wurde ebenfalls nur noch gespült, allerdings indirekt, so dass kleinere Bestandteile von den Glomeruli getrennt, diese jedoch nicht durch die Maschen gedrückt wurden. Die Glomeruli wurden aus dem Sieb in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und weiter verarbeitet.

3.3 Diabetische Nephropathie

3.3.1 **Eiweißausscheidung**

3.3.1.1 Gesamtproteinurie

Mittels der halbautomatischen Pyrogallol-Rot Methode, bei der Proteine in Gegenwart bestimmter Salze mit dem Pyrogallol-Reagenz einen Farbstoff (Extinktionsmaximum bei 560 nm) bilden, wurde Ratten-Urin auf Proteine untersucht. Es wurde nach dem Protokoll Fluitest® USP (Biocon®Diagnostik, Vöhl) vorgegangen. Da eine Linearität der

Standardreihe nur bis 400mg/dl (4g/l) gegeben ist, müssen Urinproben, deren Proteingehalt höher liegt, mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt werden.

Zur Verdünnung der Urinproben wurden 96-well Mikrotiterplatten verwendet. Dabei wurden 20 µl Urin eingesetzt und mit 60 µl isotonischer Kochsalzlösung gemischt (1:4). Von dieser Verdünnung wurden 40µl ins nächste well überführt und wieder mit 40µl isotonischer Kochsalzlösung verdünnt (1:8) usw.. 10 µl dieser Verdünnungen wurden dann auf eine neue Mikrotiterplatte, auf der auch der Standard S1 (100 mg/dl); S2 (80 mg/dl) bis S6 (0 mg/dl) aufgetragen wurde, übertragen und jeweils mit dem Reagenz gemischt. Nach 10 min wurde die Absorption mittels des MRX-Plate-Readers bei 570 nm gemessen. Für Standard und Proben wurden je Doppelbestimmungen auf einer Platte durchgeführt. Die Berechnung der Proteinurie erfolgte nach der Formel:

$$E(\text{Probe}) / E(\text{Standard S1}) * \text{Harnvolumen(ml)} * \text{Verdünnungsfaktor} = \text{mg/ 24h}$$

3.3.1.2 Albuminurie

Die Albuminkonzentration in Urin-Proben wurde in einem direkten kompetitiven Albumin-ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) bestimmt. Eine 96-Loch (well) Mikrotiterplatte wurde mit Rattenserum-Albumin (SIGMA A-6414) beschickt. Dazu wurde eine definierte Menge/ Konzentration enzymmarkierter (Peroxidase) Albumin-Antikörper (polyklonaler Antikörper [Schaf, ICN 55776]) und die gleiche Menge des Probenurins (albuminhaltig/ unbekannte Konzentration) gegeben. Es kompetetieren somit wandständiges und freies, in der Probe befindliches Antigen um den Antikörper. Nach Abtrennung des Gemisches, wurden das Substrat (Tetramethylbenzidin (TMB)) und H₂O₂ hinzugegeben. Die eingetretene Farbreaktion wurde mit Schwefelsäure abgestoppt und die Extinktion der Lösung gemessen. Je niedriger die gemessene Extinktion, desto weniger wandständig gebundener Antikörper, umso größer die Albuminkonzentration der Probe.

Zur Erstellung einer Standardkurve für die Albuminbestimmungen wurden aus einer Rattenserum-Albumin-Stock-Lösung (1,0 mg/ml) folgende Standardkonzentrationen angesetzt: 0,00 mg/l, 0,03 mg/l, 0,05 mg/l, 0,07 mg/l, 0,10 mg/l, 0,20 mg/l, 0,30 mg/l, 0,40 mg/l, 0,60 mg/l, 0,80 mg/l und 1,00 mg/l. Für die Messungen wurden 10 µl der bei -21° C gelagerten Urinproben je nach der zu erwartenden Albuminkonzentration 1:200, 1:5.000, 1:10.000 und 1:20.000 verdünnt. Medium für alle Verdünnungs-, Wasch- und Lösungsschritte war Puffer A (siehe 7.). Die Messung der einzelnen Extinktionen wurde luftblasenfrei mit Hilfe eines ELISA-MRX-Plate-Readers bei 630 nm vorgenommen. Die

Probenkonzentrationen wurden über die lineare Regression des Logarithmus der Extinktion vs. dem Logarithmus der Standard-Albuminkonzentrationen bestimmt. Die Erstellung der Standardkurve, die Messung der jeweiligen Extinktionen und die Berechnung der Konzentrationen (mg/dl) erfolgte mit dem Computerprogramm *Biolinx*. Unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnungen und Urinvolumina wurden die Albuminurie (mg/d) der einzelnen Urinproben berechnet.

3.3.2 **Nierenhypertrophie – glomeruläre Volumetrie**

Die PAS gefärbten Nierenschnitte wurden lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung untersucht. Dabei wurde das Präparat mäanderförmig beurteilt. Es wurden pro Tier 20 Glomeruli berücksichtigt, die am glomerulären Pol angeschnitten waren oder einen Mindestdurchmesser von 100µm aufwiesen. Die glomeruläre Fläche (A_T) wurde gemessen und mit der Formel $V_T = \beta/k \times (\tau)^{3/2}$ wurde dann das glomeruläre Volumen (V_T) errechnet, wobei $\beta = 1,38$ (Formkoeffizient für sphärische Partikel) und $k = 1,1$ (Partikelgrößenverteilungskoeffizient) gesetzt wurden^{mod. nach 98}.

3.3.3 **Glomeruläre Fibrose**

3.3.3.1 PAS Färbung und Glomerulosclerose-Score

Die PAS-Färbung (Periodsäure Schiff="period acid schiff") wurde in der vorliegenden Arbeit zur Beurteilung der Glomerulosclerose herangezogen. Mucopolysaccharide bilden nach Aufspaltung in Aldehyde mittels Perjodsäure (Oxidation von Glykolgruppen) mit fuchsinschwefliger Säure einen roten basischen Farbstoff. Nach Gegenfärben mit Hämatoxylin/ Eosin stellen sich Bindegewebe blau, Zytoplasma rosa, Zellkerne blau-schwarz und die Mucopolysaccharide magentafarben dar.

Die PAS gefärbten Nierenschnitte wurden lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung untersucht. Dabei wurde das Präparat mäanderförmig beurteilt. Es wurden pro Tier 20 Glomeruli berücksichtigt, die am glomerulären Pol angeschnitten waren oder einen Mindestdurchmesser von 100µm aufwiesen. Der Matrixscore zur Bestimmung der PAS-Positivität jedes Glomerulums wurde mit einem computergestützten halbautomatischen Programm berechnet (AxioVision 4.4, Zeiss, D). Dem unabhängigen Untersucher war die Gruppenzuordnung zum Zeitpunkt der

Untersuchung nicht bekannt. Rückschlüsse auf die Gruppenzugehörigkeit der Tiere anhand der Objektträgerbeschriftung konnten nicht gezogen werden.

3.3.3.2 Fibronektin-ELISA

Hierbei handelt es sich um einen indirekten, nicht kompetitiven ELISA, bei dem das zu untersuchende Antigen (Probe) mit einem im Überschuss vorhandenen ersten Antikörper (AK I; Rabbit/ Anti-Human, Code no A:0245, DAKO A/S Dänemark) zusammengebracht wird. Die entstehenden Antigen-Antikörper Komplexe werden in eine zweite, vorbereitete Mikrotiterplatte überführt, die wandständiges Antigen (vergleichbar der Probe) enthält. Dabei wird bovines Serumalbumin zur Blockade unspezifischer Bindungen des wandständigen Antigenes verwendet. Freie AK I binden nun an das wandständige Antigen. Es wird ein zweiter Antikörper (AK II; Peroxidase-conjugated Affini Goat Anti Rabbit IgG, Dianova, BMA Biochemicals AG, Augst, Konzentration 0,3 µg/ml), der an den ersten Antikörper bindet und ein Reaktionszentrum für das Substrat OPD (o-Phenylenediamine Dihydrochloride Tablet Set, Code No: P-9187) enthält, im Überschuss dazugegeben. Nach Entfernung aller ungebundenen Antikörper/ Antigen-Antikörper Komplexe (Waschen), bleiben nur noch die wandständig gebundenen AK I – AK II Komplexe übrig, die mit dem dazugegebenen Substrat reagieren. Daher fällt die Farbreaktion umso stärker aus, je mehr freier AK I vorhanden ist, d.h. je weniger Antigen die Probe enthält.

Zum Beschichten einer 96-well Mikrotiterplatte (Platte 1) wurden 100 µl Beschichtungslösung/well pipettiert. Die Beschichtungslösung wurde kurz vor Gebrauch aus 10 µl Fibronektin (FN)-Antigen (fibronectin from rat plasma, , F-0653, c=200 ng/µl), verdünnt in 10,5 ml PBS hergestellt. Die Platte 1 wurde für 15 Stunden bei 4° C inkubiert. Nach Entfernung der Lösung wurde die Mikrotiterplatte dann mit 150 µl Puffer (20 ml PBST; 0,2 g BSA) pro well geblockt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Erstellung einer Standardkurve für die FN Bestimmungen wurden 6 µl FN-Ag in 334 µl DMEM verdünnt und folgende Standardkonzentrationen S₁-S₁₀ angesetzt: 3529,4 pg/µl; 2076,1 pg/µl; 1221,2 pg/µl; 718,4 pg/µl; 422,6 pg/µl; 248,6 pg/µl; 146,2 pg/µl; 86,0 pg/µl; 50,6 pg/µl und 0,0 pg/µl. Die Proben (glomeruläre Überstände) wurden auf Eis aufgetaut und mit DMEM verdünnt:

WT 1:2 WT+DM 1:10 TG 1:10 TG+DM 1:10

Von Probe (Doppelmessung) und Standards wurden jeweils 50 µl in eine neue Mikrotiterplatte (Platte 2) gefüllt und zusammen mit 50 µl des FN-Antikörper I (1:16000

verdünnt mit PBST) versehen. Diese Platte wurde ebenfalls für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurde die Platte 1 fünfmal mit 200 µl PBST gewaschen. 95 µl/well der Platte 2 wurden in die Platte 1 überführt. Es folgte eine Inkubationszeit von 1 h bei 37°C. Platte 1 wurde fünfmal mit 200 µl PBST gewaschen. Vom Antikörper II (2,5 µl AK II in 10 ml PBST) wurden 100 µl/well auf die Platte 1 aufgetragen und für 1h bei 37°C inkubiert. Platte 1 wurde fünfmal mit 200 µl PBST gewaschen. Dann wurde das Substrat, 200 µl OPD-Lösung/well, zugesetzt und bei Raumtemperatur für 30 min dunkel inkubiert. Die Messung der einzelnen Extinktionen wurde mit Hilfe eines ELISA-MRX-Plate-Readers bei 450 nm luftblasenfrei vorgenommen. Die Erstellung der sigmoiden Standardkurve und Berechnung der Konzentrationen (pg/µl) erfolgte mit dem Computerprogramm *Biolinx*.

3.3.3.3 TGF-β-ELISA

Die TGF-β Konzentration im glomerulären Überstand wurde mittels eines direkten, nicht-kompetitiven ELISA nach dem Sandwich-Prinzip bestimmt. Farbreaktion und TGF-β-Konzentration der Probe sind hierbei direkt proportional. Es wurde ein Set der Firma R&D Systems (DuoSet® human TGF-β1, Abingdon, UK) verwendet, den Captureantikörper, den Detectionantikörper, einen Standard, Streptavidinlösung und Tetramethylbenzidin (TMB) – Peroxidasesubstrat enthaltend.

Zum Beschichten einer 96-well Mikrotiterplatte mit einem TGF-β spezifischen Antikörper wurden 100 µl Capture-AK / well (c=360 µg/ml) pipettiert. Die Beschichtungslösung wurde kurz vor Gebrauch aus 55,5 µl Capture Antikörper, verdünnt in 10 ml PBS hergestellt. Die Mikrotiterplatte wurde für 15 Stunden bei 4° C (über Nacht) inkubiert. Anschließend wurde der Capture AK entfernt und die Mikrotiterplatte 3 x mit 200 µl PBST / well gewaschen. Dann wurden pro well 250 µl Blocking Buffer (23,75 ml PBS; 1250 µl Tween 20; 1,25 g Sucrose) eingesetzt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden aus einem in 488,9 µl Reagent Diluent (RD) verdünnten 11,5 µl-Aliquot eines TGF-β-Standards (c=90 ng/ml) folgende Standardkonzentrationen angesetzt: 0,00 pg/ml; 31,25 pg/ml; 62,5 pg/ml; 125 pg/ml; 250 pg/ml; 500 pg/ml; 1000 pg/ml und 2000 pg/ml. Die Aktivierung der Proben erfolgte mit 15 µl Salzsäure für 10 min bei Raumtemperatur, welche mit äquimolarer Menge NaOH-Hepes (4,8 g NaOH; 100ml Aq.dest.; 11,9 g Hepes) neutralisiert wurde. Nun wurde die geblockte Platte mit 3 x 200 µl PBST gewaschen. Dann wurden 100 µl / well aktivierte Proben bzw. Standard aufgetragen. Es folgte eine Inkubationszeit von 2

Stunden bei Raumtemperatur. Wiederum erfolgte ein Waschschriff mit 3 x 200 µl PBST. Vom Detection Antikörper (55,5 µl DAK in 10 ml RD) wurden 100 µl / well auf die Platte aufgetragen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Erneutes Waschen mit 3 x 200 µl PBST. Es folgten 100 µl Streptavidinlösung / well, mit RD 1:200 verdünnt, und eine Inkubation für 20 min im Dunkeln. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl/well Substrat TMB aufgetragen und es folgten 20 min Dunkelinkubation. Das Abstoppen der Farbreaktion (gelber Farbkomplex) erfolgte mit 50 µl 0,18 M H₂SO₄ / well. Die Messung der einzelnen Extinktionen wurde mit Hilfe eines ELISA-MRX-Plate-Readers bei 450 nm luftblasenfrei vorgenommen. Die Erstellung der Standardkurve, die Messung der jeweiligen Extinktionen und die Berechnung der Konzentrationen (mg/dl) erfolgte mit dem Computerprogramm *Biolinx*.

3.3.3.4 Plasminogen-Aktivator Inhibitor 1-ELISA

Der Plasmin-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) ist ein Glykoprotein zur Hemmung der Fibrinolyse. Dieser ELISA folgt vom Prinzip und der Durchführung dem Fibronectin-ELISA (siehe 3.3.3.2.).

Alle Reagenzien und Mengen sind identisch. Abweichend werden PAI-1 Antigen (Rat-PAI-1, American Diagnostica Inc., Pflugstadt, Cat. #102) und PAI-1 Antikörper (Rabbit/Anti-Rat PAI-1 IgG, American Diagnostica Inc, Pflugstadt, Cat. #1062, Konzentration 1 µg/ml) eingesetzt. Der Sekundärantikörper ist identisch. Zur Erstellung einer Standardkurve für die PAI-1 Bestimmungen wurden 80 µl PAI-1-Ag in 620 µl DMEM verdünnt und folgende Standardkonzentrationen S₁-S₁₂ angesetzt: 1143 pg/µl; 846 pg/µl; 625 pg/µl; 463 pg/µl; 342 pg/µl; 254 pg/µl; 188 pg/µl; 139 pg/µl; 103 pg/µl; 76 pg/µl; 56 pg/µl und 0,0 pg/µl. Die Proben (glomeruläre Überstände) wurden auf Eis aufgetaut und mit DMEM 1:2 verdünnt. Der Antikörper I (PAI-1 AK) wurde 1:100 verdünnt. Die Messung der einzelnen Extinktionen erfolgte alle 10 min bis die optische Dichte ein Maximum erreichte. Sie wurde mit Hilfe eines ELISA-MRX-Plate-Readers bei 450 nm luftblasenfrei vorgenommen. Die Erstellung der sigmoiden Standardkurve und die Berechnung der Konzentrationen (pg/µl) erfolgte mit dem Computerprogramm *Biolinx*.

3.3.4 Nierenfunktion – Biochemische Analyse

Als Maß der Filterfunktion der Niere bezeichnet die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) jene Menge an Flüssigkeit, die pro Zeiteinheit von beiden Nieren glomerulär filtriert wird

(Primärfiltrat). Sie entspricht der Clearance einer Substanz (Idealsubstanz=Inulin), die frei filtriert, nicht aber tubulär sezerniert oder reabsorbiert wird. Die Kreatininclearance ist ein wichtiger Parameter zur Einschätzung der GFR. Sie beschreibt wieviel Plasmavolumen pro Zeiteinheit vollständig von Kreatinin befreit wird. Kreatinin wird primär filtriert und nur zu einem geringen Teil tubulär sezerniert. Es erfüllt somit nicht ganz die Anforderungen an die Idealsubstanz, ist aber methodisch einfacher zu handhaben. Der Serum-Kreatininspiegel steigt erst bei einer 50%igen Abnahme der GFR an (sog. Kreatinin-blinder Bereich). Ferner ist der Serum-Kreatininspiegel individualspezifisch abhängig z.B. von Muskelmasse, Alter und Tageszeit. In Urin und Plasma wurden Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen der Versuchstiere im Labor 28 (Mecklenburgische Straße 28, 14197 Berlin) bestimmt. Daraus wurden Urin-Kreatinin-Clearance bzw. Harnstoff-Clearance nach den Formeln

$$\mathbf{a)} (U_{\text{Crea}}/P_{\text{Crea}}) * V_U/1440 \quad \text{und} \quad \mathbf{b)} (U_{\text{Hs}}/P_{\text{Hs}}) * V_U/1440$$

U_{Crea} = Urinkreatininkonzentration (mg/dl), P_{Crea} = Plasmakreatininkonzentration (mg/dl), V_U = Urinvolumen (ml), U_{Hs} = Urinharnstoffkonzentration (mg/dl), P_{Hs} = Plasmaharnstoffkonzentration (mg/dl)

berechnet und diese auf das Körpergewicht der Tiere bezogen.

3.4 Glomeruläres Endothelinsystem

Die Untersuchungen des glomerulären ET.- Systems erfolgten mittels LightCycler zur Analyse von mRNA-Expressionen (siehe 1.1.5.) und mittels kommerziellem ET-1/2 ELISA (siehe 1.1.7.) zur Analyse der glomerulären ET-Synthese.

3.5 Glomeruläre Kulturen

Zur Analyse der biochemischen Leistung von hyperglykämischen und normoglykämischen Glomeruli (Untersuchung des Kulturüberstandes) wurden Kulturen der frisch isolierten Glomeruli mit/ohne Lipopolysaccharid (LPS_{IGM}) für 48 h angesetzt. Die aus gesiebten Nieren isolierten Glomeruli wurden in 50 ml PBS (50 ml Falcon-R.) überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 1900 U/min in vorgekühlter (4°C) Zentrifuge. Nach Dekantieren bzw. Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet (=Glomeruli) in 5-10 ml DMEM resuspendiert. Durch das Ausstreichen von 3 x 10 µl Suspension in einer Petrischale und Zählung der Glomeruli wurde die Qualität und Dichte der Glomeruli beurteilt. Dann erfolgte eine Einstellung der Glomeruli-Dichte auf 2000/ml DMEM nach Dreisatz – 20/10µl entspr. 2000/ml - und das Aussäen der

Glomeruli auf Kulturplatten als Triplikate (3 x 1 ml) in 24-Well-Plates. Zusätzlich wurden 2 x 0,5 ml für die LPS-Stimulation ausgesät. Diese erfolgte mittels 10µg/ml konzentrierter LPS-Lösung. Die Rest-Suspension wurde bei 4000 U/min für 3 min zentrifugiert und das entstehende Pellet für RNA-Isolation konserviert. Die Ernte der Überstände erfolgte nach 48 h Inkubation bei 38 °C / 100% RLF im Brutschrank. Dazu wurde 5 min bei 14.000 U/min zentrifugiert und die Überstände bei -20 °C eingefroren. Alle Arbeiten mit glomerulären Suspensionen erfolgten unter dem Laminar Flow – im separaten Zellkulturlabor.

3.6 Statistische Auswertung

Als Maß zur Beurteilung statistischer Signifikanz diente die Irrtumswahrscheinlichkeit p, welche das Zutreffen der Nullhypothese angibt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte < 0,05 (*), als hochsignifikant p-Werte < 0,01 (**) angesehen. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test geprüft. Die graphische Darstellung erfolgte im Säulendiagramm als Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). Für normalverteilte Daten wurden Gruppenunterschiede mit der einfaktoriellen „Analysis of Variances“ (ANOVA) untersucht. Bei signifikanten Unterschieden wurde per Levené-Test die Homogenität der Varianzen betrachtet. Bei Varianzgleichheit wurde der Fisher LSD Post-hoc-Test, bei Varianzungleichheit der Test nach Tamhane durchgeführt. Bei nicht-normal verteilten Daten wurde zur Überprüfung der Gruppen der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Relevante Irrtumswahrscheinlichkeiten zwischen den Gruppen im Kruskal-Wallis-Test wurden mit dem Man-Whitney-U-Test gruppenweise überprüft.

Die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Informatik und Biometrie (IMIB), Frau Dr. H. Krentz, erarbeitet. Alle Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS 14.0 (SPSS Inc., USA) durchgeführt. Graphiken wurden mit SPSS und EXEL (Microsoft Corp., USA) erstellt.

3.7 Lösungen und Puffer

DEPC-H₂O:

Durch Zugabe von 500µl Diethylpyrocarbonate zu 500ml Aqua dest.(12h schütteln) erhält man nach Autoklavierung DEPC-H₂O.

Formalin:

27 ml 37%iger Formaldehydlösung auf 100ml DEPC-H₂O ergibt die von uns für die Histologie benötigte 10 %ige Formaldehydlösung.

Gelpuffer (TBE): Zur Herstellung des 10fach konzentrierten Gel-puffers verwandten wir auf 500ml DEPC-H₂O 27,5g Borsäure, 54g TrisBase und 20 ml EDTA. Gebrauchsfertig wird dieser durch Zugabe von 9:1 Teilen DEPC-Wasser.

Lysispuffer:

Ein Gemisch aus 400mM Tris-HCL, 60mM EDTA, 150mM NaCl und 1% SDS(w/v) wurde mit 1M NaOH auf pH 8,0 gebracht und mit Proteinase K (3µl/ 300µl Lysispuffer) versetzt.

PBS

Es wurde PBS-Salzlösung nach Dulbecco in 500ml Flaschen abgefüllt und anschließend autoklaviert.

PBST

Durch Zugabe von 250µl Tween 20 zu 500ml PBS entsteht PBST für den TGF-β ELISA.

Puffer A

Diese für den Albumin-ELISA verwendete Lösung besteht aus 20mmol Dieethylmalonsäure (), 150mmol NaCl, 0,1mmol EDTA, 1ml Tween 20 und Aqua dest. ad 900ml. Der pH-Wert wurde mit 1M KOH auf pH 7,4 eingestellt, dann 5g Gelatine () dazugegeben.

Reagent Diluent (R.D.)

Diese für den TGF-β ELISA verwendete Lösung besteht aus 50ml PBS, 25µl Tween 20 und 0,7g Bovinem Serum Antigen (BSA-). Die Mengenangaben sind für jeweils eine 96-well Mikrotiterplatte (Nunc) berechnet.

3.8 Reagenzien/ Geräte

Alle verwendeten Reagenzien stammen, sofern nicht anders angegeben, von SIGMA-Aldrich.

Agarose; Aqua distillata; **Borsäure**; BSA; **Chloroform**; **DEPC**; Diethylether; Diethylmalonsäure; **DMEM** (Dulbeccos Minimum Essential Medium; Zusätze: 3ml P/S; 10,3ml Glutamin; 2,3ml Alt-Insulin; kein FCS); **EDTA**; Ethanol 75% / 96%; Ethidiumbromid; **Formaldehyd** 37%ig; **Glutaraldehydlösung** 4%ig; **Humaninsulin** (Protaphan/Lantus) (NovoNordisk/Aventis) ; Isopropanol; **Ketamin**; **LPS** (E. coli O127 :B8); **Natriumchlorid**; **Natriumhydroxid**; **Proteinase K** (Serinprotease, aus Tritirachium spp. Überständen); **Rheomacrodex**; **RNAse ZAP**; **PBS** (Dulbeccos Phosphat buffered saline); **Salzsäure** 1 N; Schwefelsäure 16 N; Streptozotozin(No.S0130); **Tris-Base**; **Tris-HCL**; **Trizol**; **Tween 20**; **Xylazin**

| Art | Hersteller | Land |
|---------------------------------|----------------------------|-------|
| Abzug | SAP Umwelttechnologie | D |
| Bench (Laminar Flow-Zellkultur) | Heraeus Instruments | D |
| Blutdruckmessgerät | Boucke | D |
| Blutzuckermessgerät | Abbott Laboratories | USA |
| Brutschrank | Heraeus Instruments | D |
| Eismaschine | Scotsman | USA |
| Gelkammer | Bio-Rad® | D |
| Homogenisator | Micra | D |
| Infrarotlampe | Zeiss | D |
| Insulin-PEN | NovoNordisk/ Aventis | DK/CH |
| Lichtmikroskop | Leitz | D |
| LightCycler | Roche Industries | USA |
| Mikrotiterplatte | Nunc | D |
| Mikrotiterplattenschüttler | Janke & Kunkel | D |
| Minizentrifuge | Qualitronic, Inc. | USA |
| Monovette | Saarstedt | D |
| MRX-Reader, Biolinx Programm | Dynex | GB |
| PCR-Maschine | Biometra TRIO Thermoblock™ | D |
| pH-Meter (WTW PH 526) | Multical® | D |
| Phosphoimager | Tycoon | LV |
| Photometer | Shimadzu | J |
| Prüfsiebe ISO 3310-1 | Merck | D |
| Saug-Pipettierhilfe | Accu Jet® | D |
| Schüttelwasserbad | Köttermann | D |
| Thermomixer compact | Eppendorf | D |
| Tischzentrifuge 5417R | Eppendorf | D |
| Vortex Genie2 | Scientific Industries, Inc | GB |
| Waage (BP6100/ BP2219) | Sartorius | D |
| Zellkulturbrutschrank | Sartorius | D |
| Zentrifuge Megafuge 2.0R | Heraeus Instruments | D |

4 Ergebnisse

4.1 Validierung des Studiendesigns

4.1.1 Transgenexpression

4.1.1.1 Transgentestung zu Versuchsbeginn und Gruppenallokation

Der Transgenstatus wurde sowohl aus genomischer DNA als auch aus cDNA getestet. Zu Beginn der Studie wurde genomische DNA (Schwanzgewebe) aller Tiere untersucht (**Abb. 4**). Es erfolgte eine Nachtestung am Studienende aus cDNA von glomerulärem und cortikalem Nierengewebe. 29 transgene (h-endoET-2+) Tiere wurden identifiziert, den Gruppen TG (n=14) und TG+DM (n=15) zugeordnet und in die Auswertung einbezogen. Die 34 nicht-transgenen Tiere wurden den Gruppen WT (n=17) und WT+DM (n=17) zugeordnet und in die Auswertung einbezogen.

Die Ratten wurden in 4 Gruppen geteilt:

WT -nichttransgene, nichtdiabetische Ratten; n=17 (Kontrolle)

WT+DM -nichttransgene, diabetische Ratten; n=17

TG -transgene (h-endoET-2+), nichtdiabetische Ratten; n=14

TG+DM -transgene (h-endoET-2+), diabetische Ratten; n=15



Abbildung4: Exemplarische PCR mit genomischer DNA.

PCR Produkte 22, 23, 26, 27, 28, 29 entsprechen transgen-negativen Tieren

PCR Produkte 24, 25 entsprechen transgen-positiven Tieren.

K+ Positivkontrolle, K- Negativkontrolle

Längenstandard in nicht bezeichneter Geltasche

4.1.1.2 Endothelin-Plasmaspiegel am Versuchsende (ELISA)

Bei den ET-Plasmaspiegeln zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen nichttransgenen und transgenen Gruppen sowohl für nichtdiabetische als auch für

diabetische Tiere (**Abb. 5**). Bei den diabetischen Tieren (WT+DM) waren die ET-Plasmaspiegel im Vergleich zu nichtdiabetischen Tieren (WT) nur numerisch erhöht.

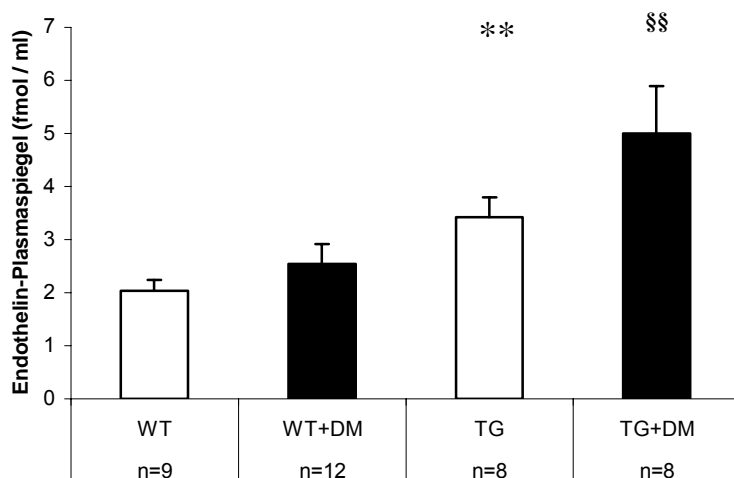


Abbildung 5: Endothelin-Plasmaspiegel nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$ vs. WT; §§ $p < 0,01$ vs. WT+DM

4.1.1.3 Glomeruläre humane Endothelin-2 mRNA-Expression

Das humane Endothelin-2 wurde in den transgenen Gruppen exprimiert. In den nichttransgenen Gruppen konnte es dagegen nicht nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied der glomerulären Transgen-mRNA-Expression zwischen nichtdiabetischen und diabetischen Tieren fand sich nicht (Kruskal-Wallis-Test; **Abb. 6**).

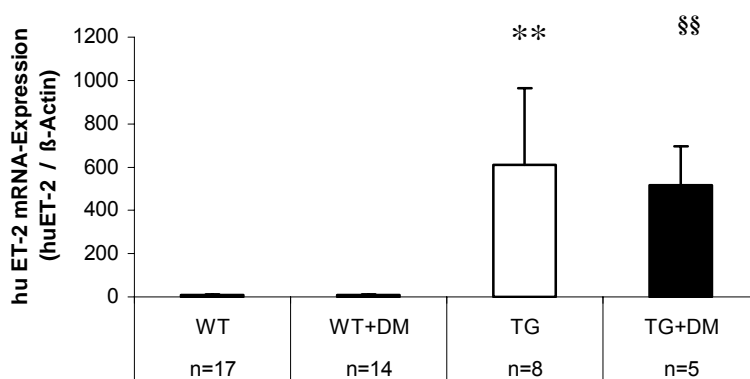


Abbildung 6: Glomeruläre Expression der mRNA von humanem Endothelin-2 (h-endoET-2) nach 6 Monaten Studiendauer bei transgenen (TG) Ratten mit und ohne Diabetes mellitus (DM); Negativnachweis des Transgens (huET-2) in der quantitativen huET-2-PCR aus glomerulärer cDNA für nichtdiabetische nichttransgene Tiere (WT; n=17) und diabetische nichttransgene Tiere (WT+DM; n=17); Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$ vs. WT; §§ $p < 0,01$ vs. WT+DM.

4.1.1.4 Glomeruläre Endothelinproduktion (ELISA)

Im Vergleich zu den Plasmaspiegeln wiesen die Überstände glomerulärer Kulturen ähnliche Messwerte auf. Es zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen nichttransgenen und transgenen Gruppen (**Abb. 7**). Diabetesbedingte Unterschiede fanden sich nicht (Fisher LSD – least significant difference).

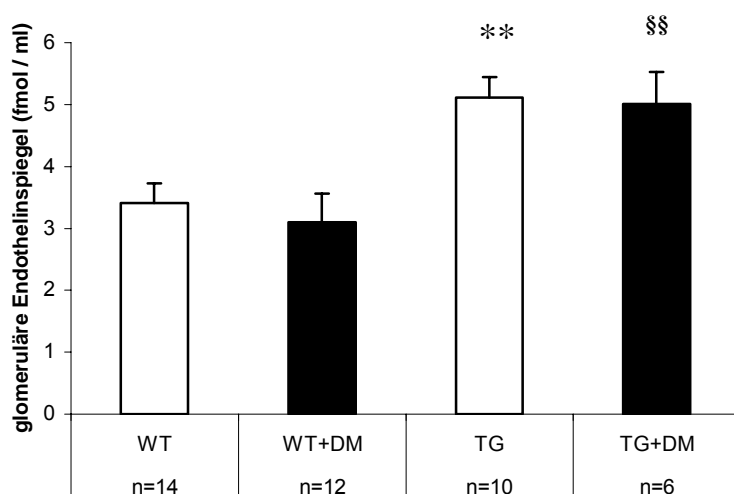


Abbildung 7: Endothelin Spiegel in Überständen glomerulärer Kulturen nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$ vs. WT; §§ $p < 0,01$ vs. WT+DM.

4.1.2 **Induktion des Diabetes mellitus**

Die Blutzuckerspiegel (BZ) wurden 48 h nach Diabetesinduktion morgens gemessen. Der BZ der diabetischen Tiere betrug im Mittel 385 mg/dl (265-600 mg/dl). Dabei unterschieden sich die BZ-Mittelwerte der Gruppen WT+DM und TG+DM nicht (393 vs. 377 mg/dl). Die nichtdiabetischen Tiere (WT, TG) wiesen einen mittleren Blutzucker von 116 mg/dl auf. Auch hier gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen WT und TG (117 vs. 115 mg/dl). Erwartungsgemäß unterschieden sich die BZ der jeweils nichtdiabetischen von den diabetischen Tieren für die Gruppen WT und TG signifikant (Tamhane; **Abb. 8a**).

Ergebnisse

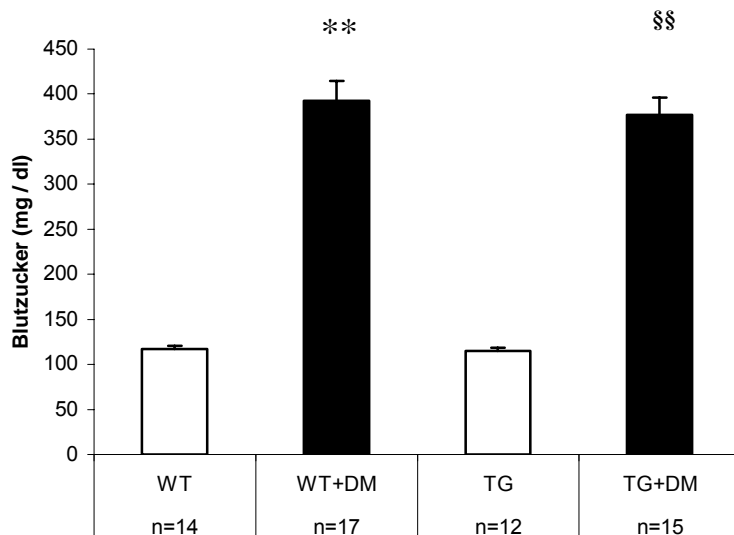


Abbildung 8a: Blutzuckerspiegel zu Studienbeginn 48h nach i.p. STZ Gabe bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$ vs. WT; §§ $p < 0,01$ vs. TG.

Einmal monatlich wurde der Blutzuckerspiegel der Tiere anlässlich von Stoffwechselläufiguntersuchungen gemessen (**Abb. 8b**).

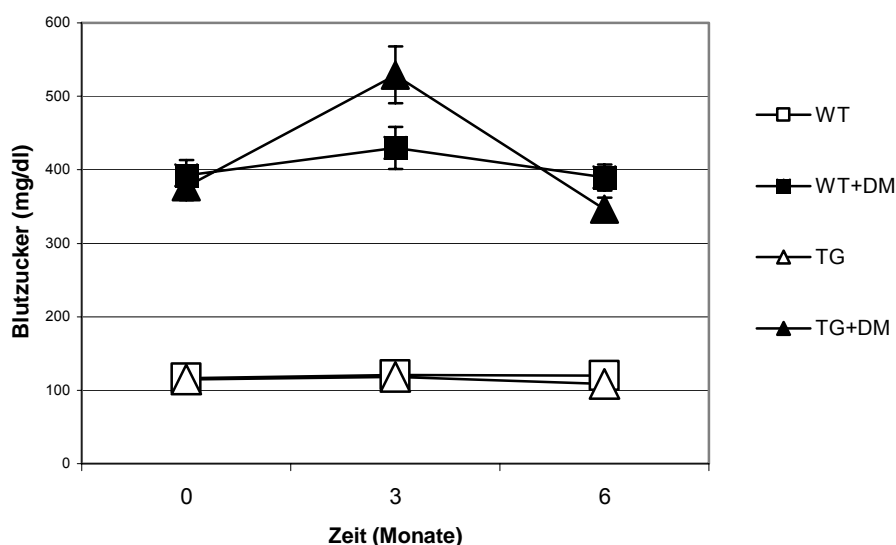


Abbildung 8b: Blutzuckerspiegel im Verlauf über 0-3-6 Monate bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM.

Die Mittelwerte der kumulativen Insulindosen ergaben für die diabetischen Gruppen keine signifikanten Unterschiede (**Tab.2**). Erfasst wurden alle Tiere, die nach 6 Monaten noch am Leben waren und in die Auswertung eingingen.

Tabelle 2: Kumulative Insulindosen bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Diabetes mellitus (DM). Berücksichtigt wurden nur Tiere, die 6 Monate DM überlebten.

| | <u>WT+DM</u> | <u>TG+DM</u> |
|-------------------------|--------------------|--------------------|
| Mittelwert (\pm SEM) | 455 (\pm 28) IE | 438 (\pm 37) IE |
| N | 15 | 9 |

4.2 Basisdaten

4.2.1 Körpergewicht

Bereits zu Beginn der Studie (**Abb. 9a**) waren zwischen nichttransgenen und transgenen Tieren signifikante Gewichtsunterschiede zu verzeichnen (Man-Whitney-U-Test). Es wurden hier nichttransgene und transgene Gruppen zusammengefasst, da die Körpergewichte vor Diabetes-Induktion gemessen wurden.

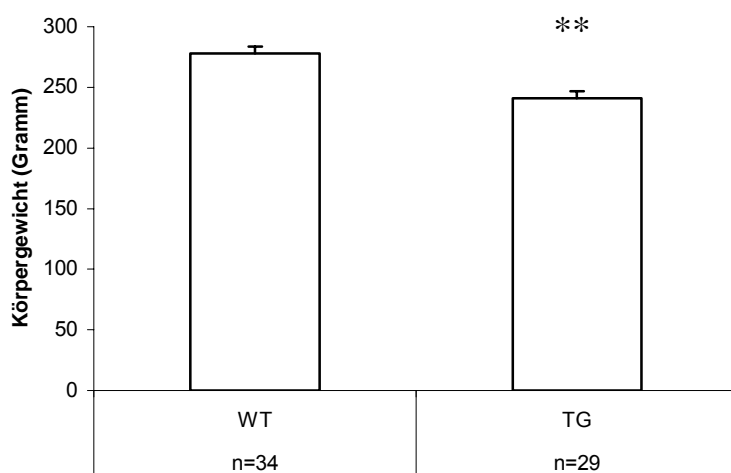


Abbildung 9a: Körpergewichte zu Studienbeginn bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten; Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$.

Abb. 9b zeigt den Gewichtsverlauf der 4 Versuchsgruppen. Wie in Voruntersuchungen, zeigte sich in dieser Studie ein geringeres Körpergewicht transgener Tiere verglichen mit nichttransgenen Tieren. Diabetes mellitus führte zu einem zusätzlichen Gewichtsrückstand im Vergleich zur jeweiligen nichtdiabetischen Gruppe. Die Therapie mit Insulin, beginnend 4 Wochen nach Studienbeginn, hat offenbar eine weitere Gewichtsabnahme der Tiere verhindert.

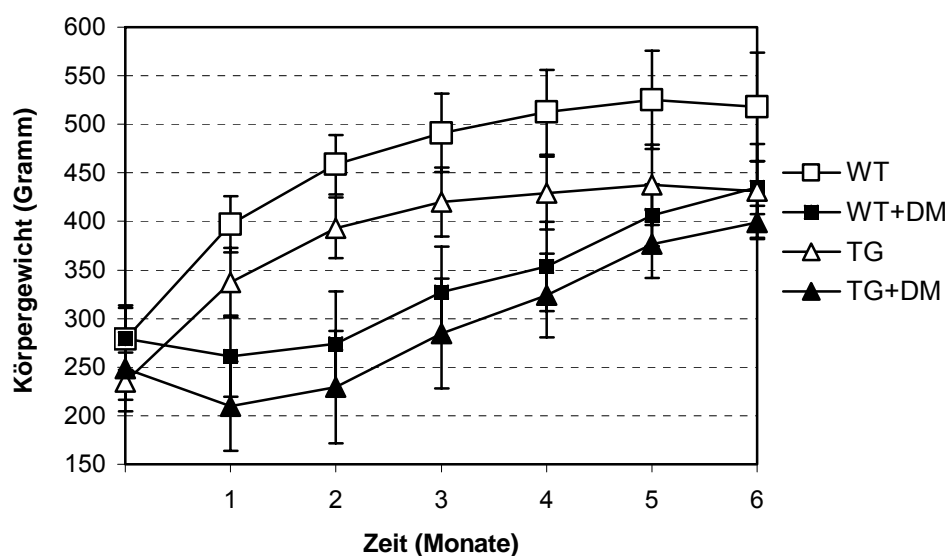


Abbildung 9b: Gewichtsverlauf bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM.

Nach 6 Monaten (**Abb. 9c**) konnte eine deutliche Differenz zwischen Kontrolltieren und den übrigen Gruppen festgestellt werden. Transgenbedingte Gewichtsunterschiede waren hier nur für die nichtdiabetischen Gruppen signifikant (Fisher LSD). Diabetesbedingte signifikante Gewichtsunterschiede konnten nur für nichttransgene Tiere festgestellt werden.

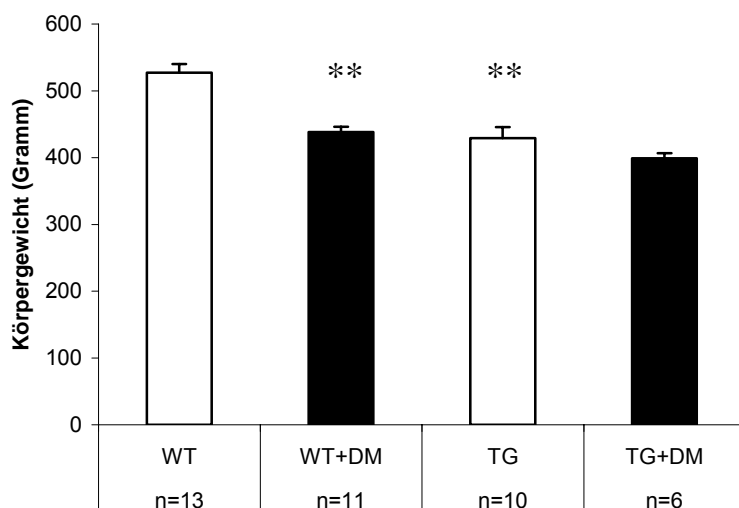


Abbildung 9c: Körpergewichte nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$ jeweils vs. WT; Trend: TG+DM vs. WT+DM ($p = 0,07$).

4.2.2 Systolischer Blutdruck

Nach 6 Monaten wurde der systolische Blutdruck nichtinvasiv am wachen Tier gemessen (**Abb. 10**). Die Tiere wiesen einen normalen Blutdruck auf, es zeigten sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Fisher LSD). Die nicht-diabetische transgene Gruppe wies starke interindividuelle Schwankungen auf.

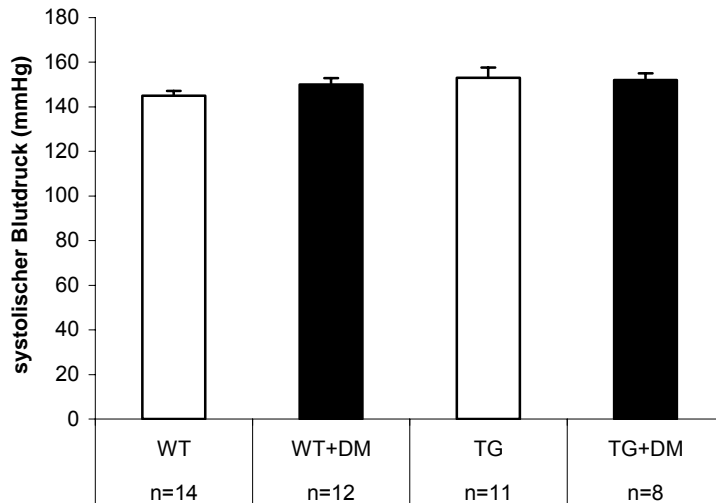


Abbildung 10: Systolischer Blutdruck nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM; Trend: TG vs. WT ($p=0,07$).

4.2.3 Herzfrequenz

Nach 6 Monaten wurde die Herzfrequenz aller Tiere gemessen (**Abb. 11**). Dabei zeigte sich eine signifikante Verminderung der Herzfrequenz der nichttransgenen diabetischen Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Fisher LSD). Eine transgenbedingte Herzfrequenzveränderung konnte nicht nachgewiesen werden.

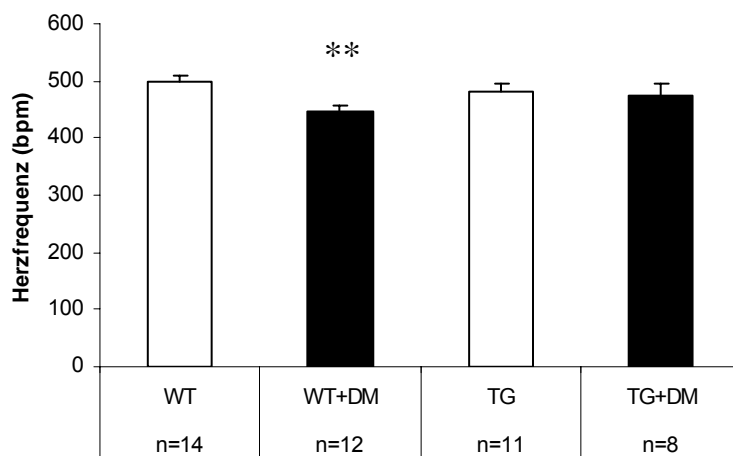


Abbildung 11: Herzfrequenz nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$ vs. WT.

4.2.4 Überlebensanalyse

Das Überleben der Tiere ist in **Abb. 12** gruppenweise dargestellt. Jeder Todesfall vor Studienende wurde als Ereignis definiert. Auffällig ist eine deutlich höhere Mortalität allein in der TG+DM Gruppe. Dieser Unterschied war jeweils zu den übrigen 3 Gruppen signifikant (Log-Rank-Test). Die nichtdiabetischen Gruppen wiesen keine Ereignisse auf. In der WT+DM Gruppe fanden sich nur 2 Ereignisse.

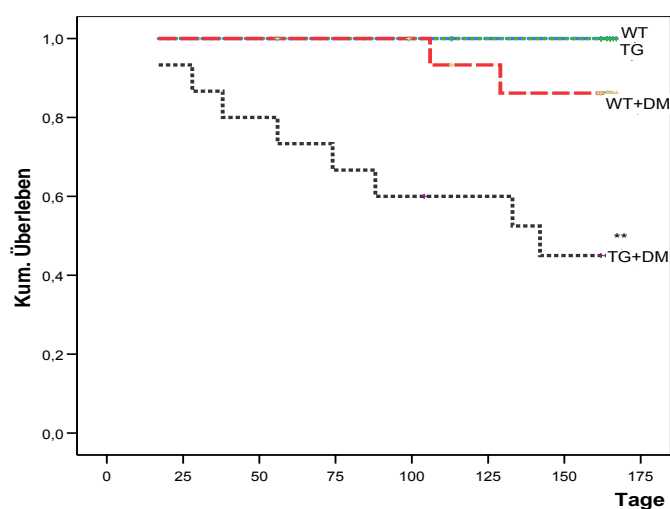


Abbildung 12: Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier für 6 Monate Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); ** $p < 0,01$ vs. WT, TG und WT+DM.

4.3 Diabetische Nephropathie

4.3.1 Eiweißausscheidung

4.3.1.1 Gesamtproteinurie

Zu Versuchsbeginn waren keine signifikanten Unterschiede zwischen nichttransgenen und transgenen Tieren feststellbar (Kruskal-Wallis-Test; **Abb. 13a**).

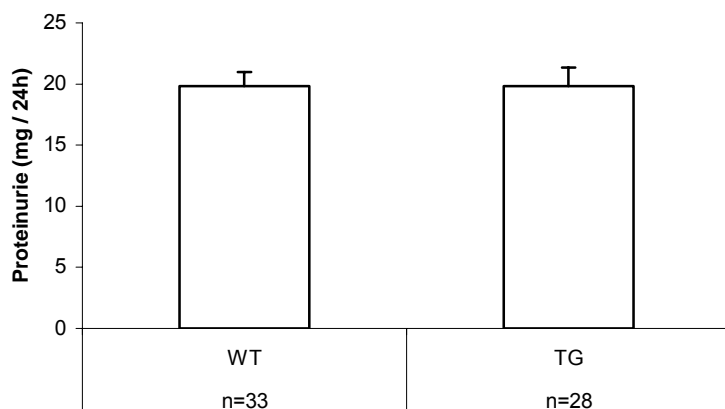


Abbildung 13a: Proteinurie bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten zu Studienbeginn; Mittelwerte \pm SEM.

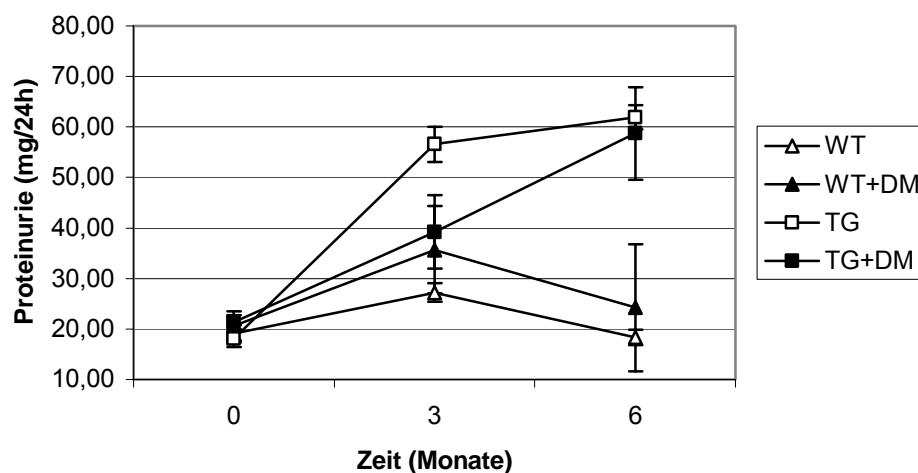


Abbildung 13b: Proteinurie im Verlauf bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM).

Im Verlauf (**Abb. 13b**) nahm die Proteinurie für beide transgenen Gruppen zu. Dabei zeigten die diabetischen Tiere eine kontinuierliche Zunahme, die nichtdiabetischen wiesen bis zum 3. Monat eine starke Zunahme der Proteinurie auf. Vom 3. Monat an war der Proteinurieanstieg bei diesen Tieren (TG) deutlich vermindert. Die nichttransgenen Gruppen zeigten im Vergleich zu den transgenen Gruppen eine geringere

Proteinurie und im Vergleich untereinander ähnliche Verläufe. Ein deutlicherer Anstieg der Proteinurie (im Gegensatz zur Kontrollgruppe) war bei den nichttransgenen diabetischen Tieren erst ab dem 3. Monat zu verzeichnen.

Nach 6 Monaten konnte bei der transgenen nichtdiabetischen Gruppe eine signifikant höhere Proteinurie gegenüber der nichttransgenen nichtdiabetischen Gruppe gezeigt werden (**Abb.13c**). Weitere signifikante Unterschiede fanden sich nicht.

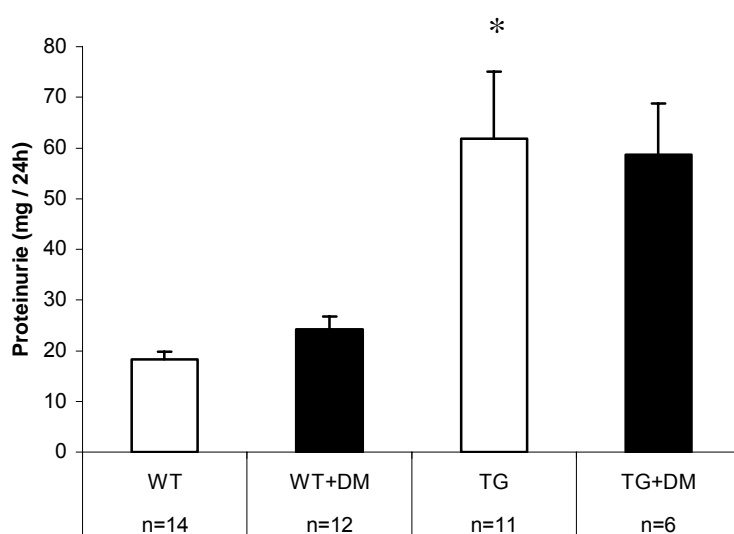


Abbildung 13c: Proteinurie nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. WT; Trends: WT+DM vs. WT ($p = 0,10$); TG+DM vs. WT+DM ($p = 0,10$).

4.3.1.2 Albuminurie

Zu Studienbeginn fand sich kein signifikanter Unterschied der absoluten Albuminurie (**Abb. 14a**) zwischen nichttransgenen und transgenen Tieren (Kruskal-Wallis-Test). Nach 6 Monaten DM fanden sich Albuminurie-Unterschiede zwischen den nichttransgenen Gruppen. Die diabetischen Tiere zeigten eine signifikant höhere Albuminurie, welche jedoch nicht an das Niveau der transgenen Gruppen heranreichte (**Abb.14b**). Bei den transgenen Gruppen war kein signifikanter Unterschied der Albuminurie zwischen diabetischen und nichtdiabetischen Tieren feststellbar. Beide transgenen Gruppen wiesen im Vergleich zu nichttransgenen Ratten jedoch signifikante Erhöhungen der Albuminurie auf ($p < 0,01$).

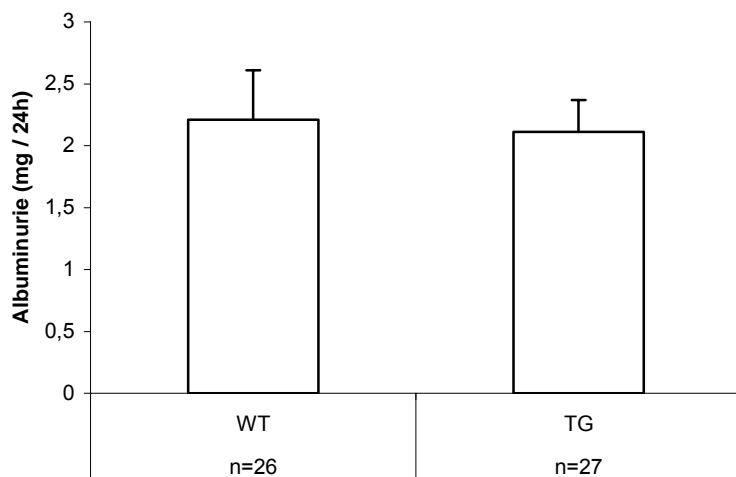


Abbildung 14a: Albuminurie bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten zu Studienbeginn; Mittelwerte \pm SEM.

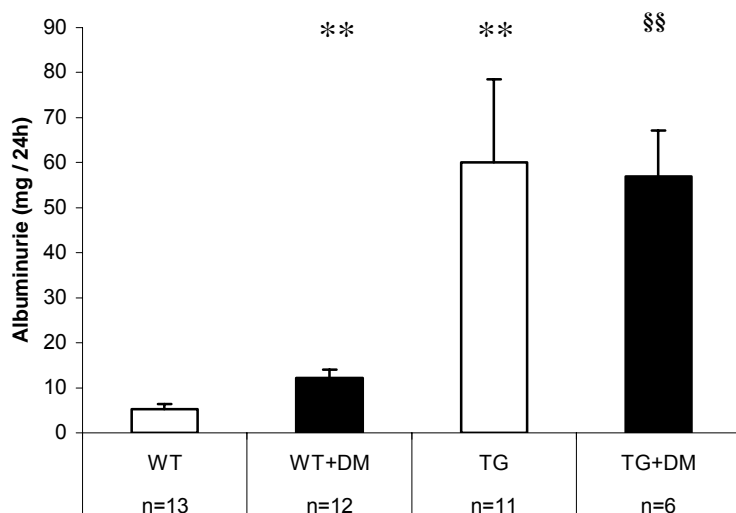


Abbildung 14b: Albuminurie nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM; **p<0,01 jeweils vs. WT; §§p<0,01 vs. WT+Diabetes mellitus.

4.3.2 Nierenhypertrophie

4.3.2.1 Nierengewicht

Signifikante Unterschiede der relativen Nierengewichte (g/kg) wurden zwischen den nichttransgenen Gruppen nach 6 Monaten diabetischer Stoffwechsellage gefunden (Kruskal-Wallis-Test). Bei den transgenen Tieren zeigte sich hier nur ein Trend (p=0,07). Ein transgenbedingter Unterschied konnte nicht nachgewiesen werden (**Abb. 15**).

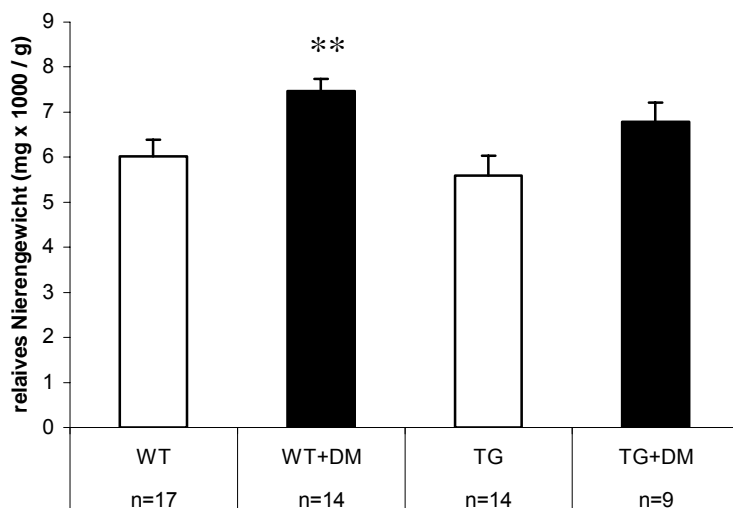


Abbildung 15: Relative Nierengewichte nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM; **p<0,01 vs. WT.

4.3.2.2 Glomeruläres Volumen

Es zeigten sich signifikant größere glomeruläre Volumina bei den transgenen Ratten (**Abb. 16**) im Vergleich zu nichttransgenen Tieren, unabhängig von einer Hyperglykämie. Die hyperglykämische Stoffwechsellage bedingte keine Volumenveränderungen der Glomeruli.

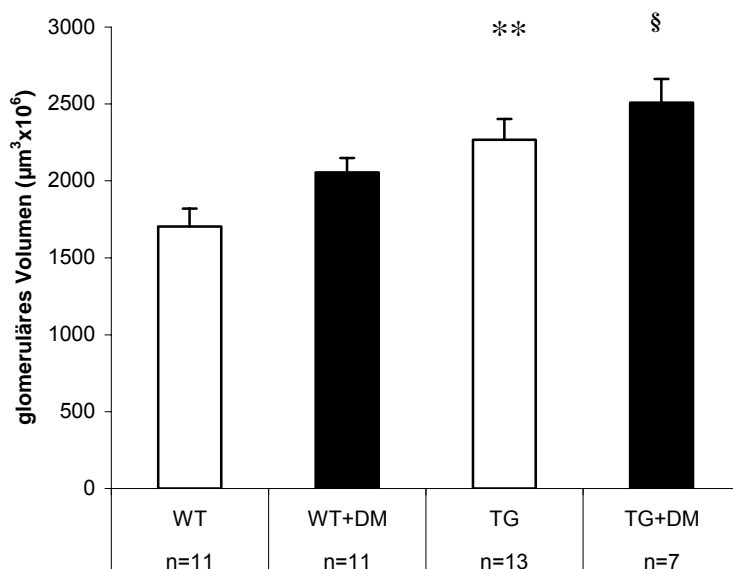


Abbildung 16: Glomeruläre Volumina nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM; **p<0,01 vs. WT; §p<0,05 vs. WT+DM.

4.3.3 Glomeruläre Fibrose

4.3.3.1 Histologische Glomerulosklerose

Die Auswertung der Nierengewebschnitte nach PAS-Färbung ergab signifikante Unterschiede bei der Glomerulosklerose (**Abb. 17a/b**). Diabetesbedingte Unterschiede zeigten sich sowohl bei den nichttransgenen als auch bei den transgenen Gruppen ($p < 0,05$). Transgenbedingte Unterschiede fanden sich nur tendenziell und nur zwischen den diabetischen Gruppen ($p = 0,07$). Eine transgenbedingte signifikante Glomerulosklerose der nichtdiabetischen Tiere konnte in diesem Versuch über 6 Monate nicht gezeigt werden.

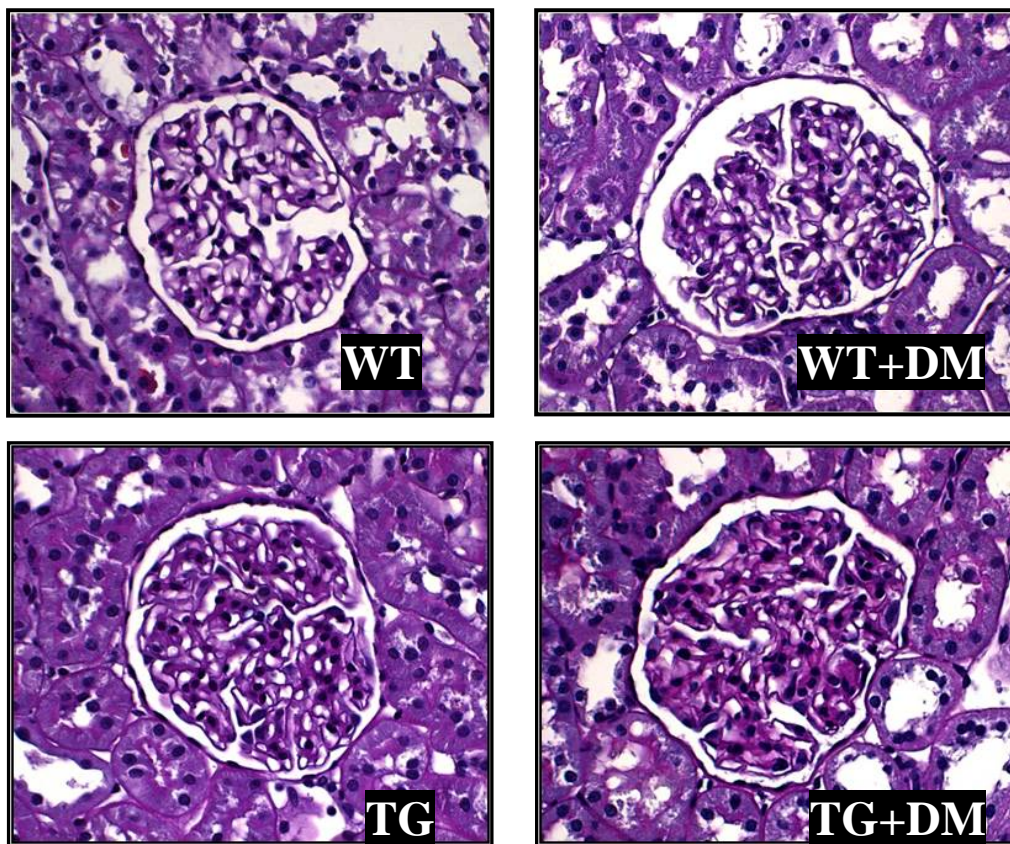


Abbildung 17a: Glomerulosklerose bei diabetischen Tieren (WT+DM) und diabetischen transgenen (TG+DM) Tieren im Vergleich zu nichtdiabetischen (WT) und nichtdiabetischen transgenen Tieren (TG)

Ergebnisse

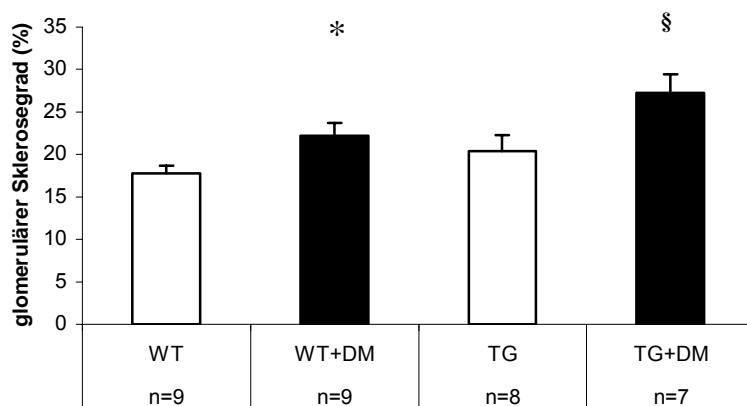


Abbildung 17b: Glomerulärer Sklerosegrad in % PAS-Positivität nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. WT; § $p < 0,05$ vs. TG.

4.3.3.2 Fibronektinexpression

Die Messung des Fibronektin-Peptids (FN) in glomerulären Kulturüberständen mittels ELISA (**Abb. 18**) zeigte einen hochsignifikanten Unterschied (Fisher LSD) bei nichttransgenen Tieren zwischen der nichtdiabetischen und der diabetischen Gruppe ($p < 0,01$).

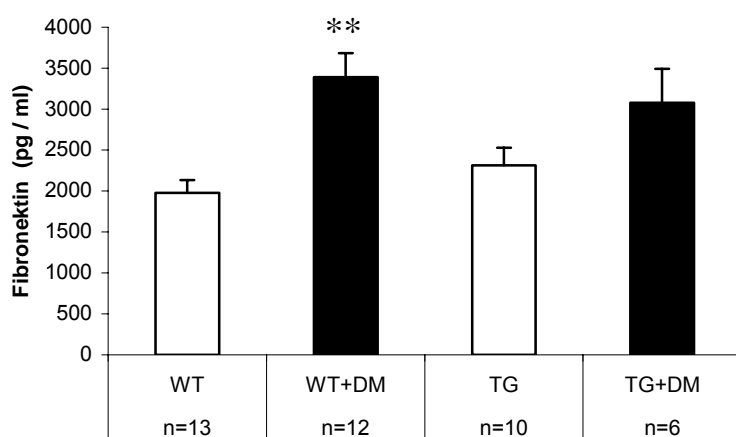


Abbildung 18: Fibronektin-ELISA aus glomerulären Überständen nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$ vs. WT; Trend: TG+DM vs. T ($p = 0,07$).

Dieser diabetesbedingte Unterschied zeigte sich für die transgenen Tiere als Trend. Einen signifikanten Unterschied zwischen beiden diabetischen Gruppen gab es nicht. Eine signifikant höhere FN-mRNA-Expression konnte bei nichttransgenen Tieren ebenso für die diabetischen gegenüber den nichtdiabetischen Tieren gezeigt werden. Dieser diabetesbedingte Unterschied fand sich für die transgenen Gruppen nicht. Ein transgenbedingter signifikanter Unterschied fand sich allerdings für die nicht-diabetischen Gruppen (**Abb. 19**).

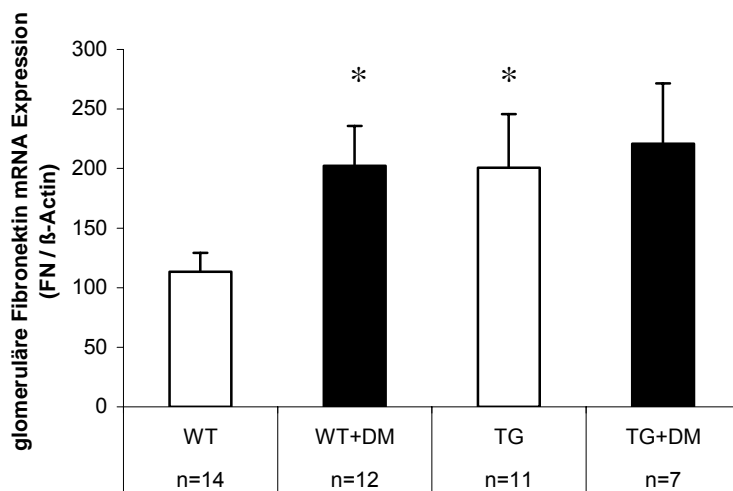


Abbildung 19: Glomeruläre Fibronectin mRNA-Expression nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ jeweils vs. WT.

4.3.3.3 TGF- β -Expression

Weder in der Peptid-Messung mittels ELISA aus glomerulären Kulturüberständen (**Abb. 20**) noch in der glomerulären mRNA-Analyse (Real-Time-PCR) konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test; **Abb. 21**).

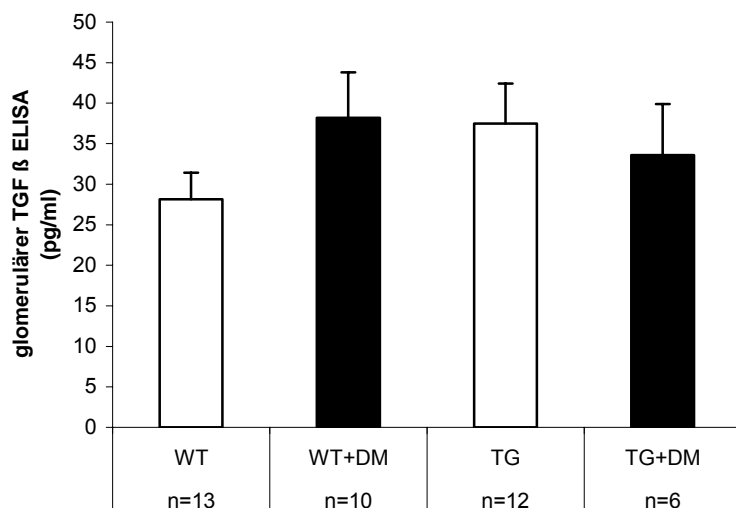


Abbildung 20: TGF- β ELISA aus glomerulären Überständen nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM.

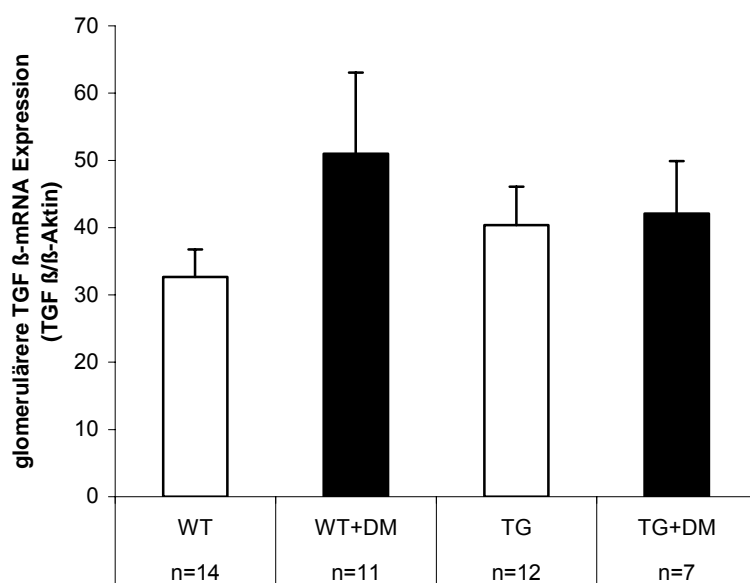


Abbildung 21: Glomeruläre TGF- β mRNA-Expression nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM.

4.3.3.4 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1-Expression

Weder in der Peptid-Messung mittels ELISA (**Abb. 22**) noch in der mRNA-Analyse (Real-Time-PCR; **Abb. 23**) konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden (Kruskal-Wallis-Test).

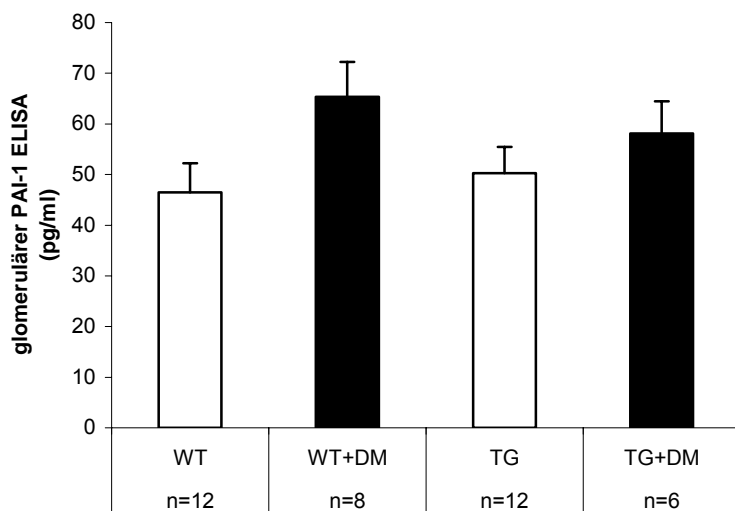


Abbildung 22: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) ELISA aus glomerulären Überständen nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM.

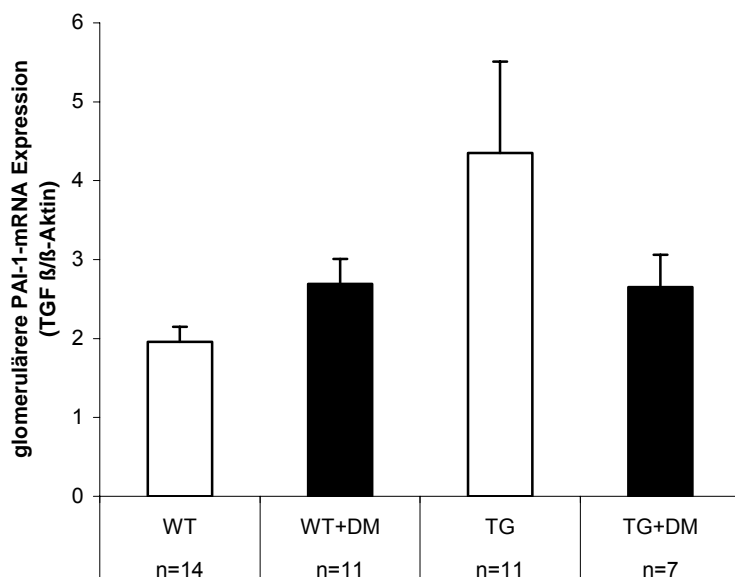


Abbildung 23: Glomeruläre PAI-1 mRNA-Expression nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM.

4.3.4 Nierenfunktion

4.3.4.1 Plasma-Kreatinin

Die Ergebnisse wurden trotz der Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen nicht in Relation zum Körpergewicht gesetzt. Zu Beginn der Studie konnten bei Vergleich der 4 Gruppen lediglich zwischen den nichttransgenen und transgenen nichtdiabetischen Tieren signifikante Unterschiede des Plasmakreatinin gefunden werden (MWU; **Tab. 3**). Die Zusammenfassung aller nichttransgenen und transgenen Tiere ergab ein signifikant höheres Plasma-Kreatinin bei transgenen (0,29 mg/dl) im Vergleich zu nichttransgenen Tieren (0,25 mg/dl; $p < 0,05$).

Tabelle 3: Mittelwerte (\pm SEM) des Plasma-Kreatinins nach 0 und 6 Monaten in mg/dl

| | nichttransgen | | transgen | |
|--------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| | WT | WT+DM | TG | TG+DM |
| 0 Monate | 0,24 \pm 0,01 | 0,26 \pm 0,01 | 0,28* \pm 0,02 | 0,29° \pm 0,02 |
| 6 Monate | 0,40 \pm 0,02 | 0,41 \pm 0,02 | 0,46 \pm 0,04 | 0,39 \pm 0,02 |
| Studiendauer | | | | |

° Trend ($p=0,08$; vs. WT+DM)

* $p < 0,05$ vs. WT

Nach 6 Monaten Studiendauer waren jedoch keine signifikanten Unterschiede für das Plasma-Kreatinin zwischen den Gruppen nachweisbar (Kruskal-Wallis-Test; **Tab. 3**).

4.3.4.2 Kreatinin-Clearance

Die Ergebnisse wurden wegen der Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen in Relation zum Körpergewicht gesetzt ($\text{ml}/\text{min} \cdot 100\text{g}$). Zu Beginn der Studie konnten bei Vergleich der 4 Gruppen keine signifikanten Clearanceunterschiede gefunden werden (Fisher LSD; **Tab. 4**). Die Zusammenfassung aller nichttransgenen und transgenen Tiere ergab jedoch eine signifikant niedrigere Kreatinin-Clearance bei transgenen ($0,58 \text{ ml}/\text{min} \cdot 100\text{g}$) im Vergleich zu nichttransgenen Tieren ($0,77 \text{ ml}/\text{min} \cdot 100\text{g}$; $p < 0,05$).

Ergebnisse

Tabelle 4: Mittelwerte (\pm SEM) der Kreatinin-Clearance nach 0, 3 und 6 Monaten in ml/min*100g

| | nichttransgen | | transgen | |
|--------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | WT | WT+DM | TG | TG+Diabetes mellitus |
| 0 Monate | 0,79 \pm 0,24 | 0,76 \pm 0,22 | 0,58 [°] \pm 0,22 | 0,58 \pm 0,18 |
| 3 Monate | 0,68 \pm 0,13 | 0,83 [#] \pm 0,10 | 0,51* \pm 0,16 | 0,73** \pm 0,19 |
| 6 Monate | 0,57 \pm 0,09 | 0,61 \pm 0,12 | 0,47 \pm 0,09 | 0,71 [§] \pm 0,08 |
| Studiendauer | | | | |

[°] Trend (p=0,06; vs. WT)

*p<0,05 vs. WT

[#]p<0,05 vs. WT

**p<0,01 vs. TG

[§]p<0,05 vs. TG

Für die Kontrollgruppe (WT) war über die Zeit ein kontinuierlicher Abfall der Clearance zu verzeichnen. Bei den transgenen nichtdiabetischen Ratten trat im Zeitverlauf ebenfalls ein weiterer Abfall der Kreatinin-Clearance auf.

In beiden diabetischen Gruppen fand sich ein nichtsignifikanter Kreatinin-Clearance-Anstieg bis zum dritten Monat, welcher danach wieder rückläufig war. Die nichttransgenen Tiere fielen hierbei bis unter ihr Ausgangsniveau. Die transgenen Tiere hatten nach 6 Monaten das Ausgangsniveau nicht unterschritten (**Abb. 24**).

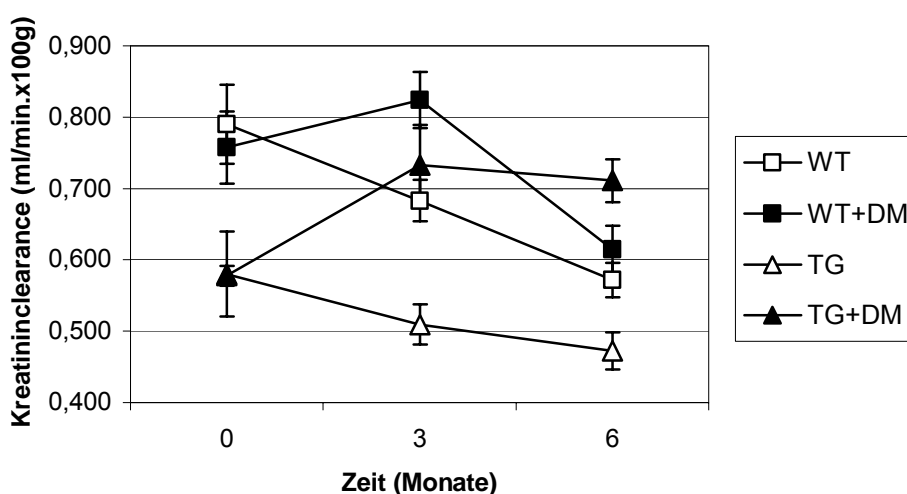


Abbildung 24: Kreatinin-Clearance – Mittelwerte (aus Tab. 2) im Verlauf bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM).

4.3.4.3 Harnstoff

Zu Beginn der Studie wiesen transgene Ratten signifikant höhere Harnstoffwerte auf (Kruskal-Wallis-Test; **Abb. 25**).

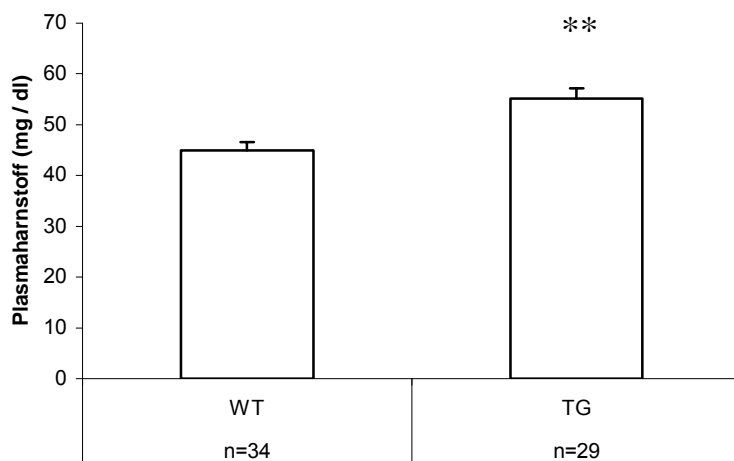


Abbildung 25: Plasma-Harnstoff zu Studienbeginn; Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$.

Nach 6 Monaten waren keine signifikanten transgen- oder diabetesbedingten Unterschiede nachweisbar (Kruskal-Wallis-Test).

4.3.4.4 Harnstoff-Clearance

Zu Studienbeginn waren transgenbedingte signifikante Unterschiede in der gewichtsbezogenen Harnstoff-Clearance zu verzeichnen. Diese zeigten sich sowohl bei Einzelbetrachtung aller 4 Gruppen, als auch bei Zusammenfassen jeweils beider transgenen und nichttransgenen Gruppen (Kruskal-Wallis-Test; **Abb. 26a**)

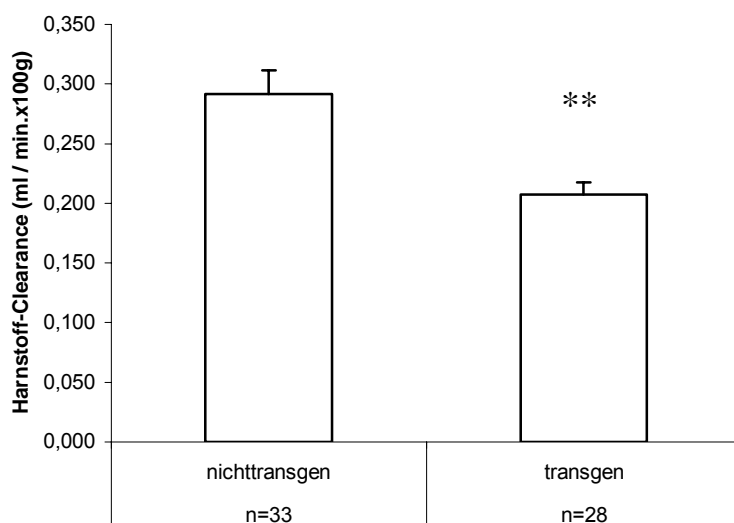


Abbildung 26a: Harnstoff-Clearance zu Studienbeginn; Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$.

Bei Studienende waren transgenbedingte Clearance-Unterschiede für nichtdiabetische und diabetische Tiere nachweisbar. Für die nichttransgenen und transgenen Gruppen wurde ein diabetesbedingter Unterschied der gewichtsbezogenen Harnstoff-Clearance gefunden. Diabetische Tiere wiesen jeweils signifikant höhere Clearances auf (Fisher LSD; **Abb. 26b**).

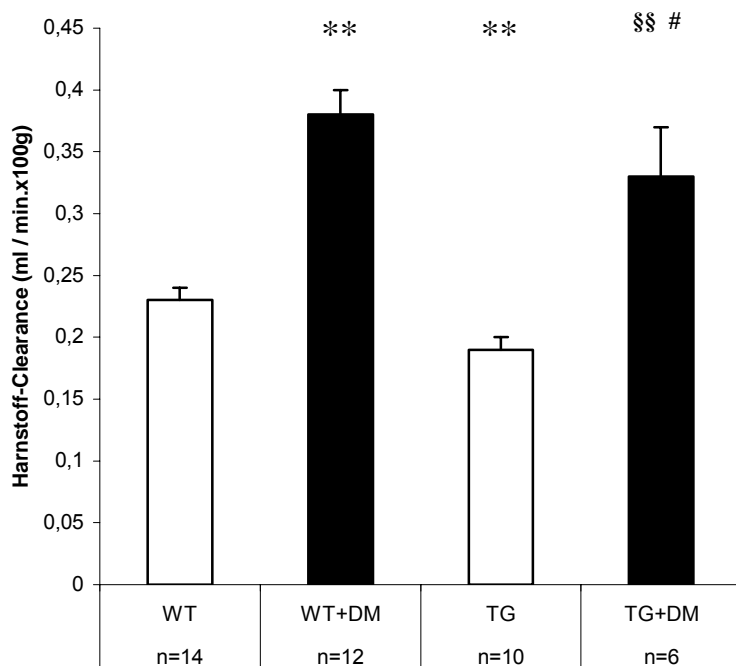


Abbildung 26b: Harnstoff-Clearance nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$ jeweils vs. WT; §§ $p < 0,05$ vs. TG; # $p < 0,05$ vs. WT+DM.

4.4 Glomeruläres Endothelinsystem

Die Testung des Transgen-Status erfolgte zu Beginn der Studie (s. 4.1.1.1.; Seite 33).

Alle weiteren Messungen erfolgten bei Studienende nach 6 Monaten.

4.4.1 Glomeruläre Endothelin-1 mRNA-Expression

Die glomeruläre ET-1-mRNA-Expression war bei transgenen nichtdiabetischen Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu nichttransgenen nichtdiabetischen Tieren (**Abb. 27**).

Bei den diabetischen Tieren zeigte sich dieser transgenbedingte Unterschied überraschenderweise nicht (Fisher LSD).

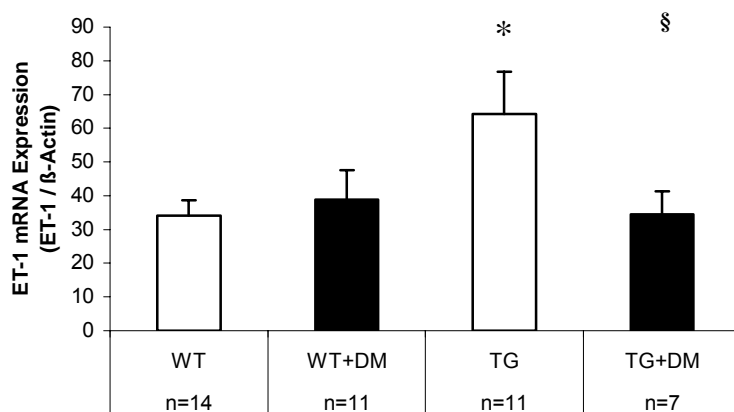


Abbildung 27: Glomeruläre ET-1-mRNA-Expression nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. WT; § $p < 0,05$ vs. TG.

4.4.2 Glomeruläre ET_A-R mRNA-Expression

Die mittels Real-Time PCR untersuchte glomeruläre ET_A-R mRNA-Expression zeigte keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test, **Abb. 28**). Auffallend ist die hohe interindividuelle Variabilität der nichttransgenen diabetischen Tiere, wohingegen die transgenen diabetischen Tiere ein sehr niedriges Meßwertenniveau aufwiesen.

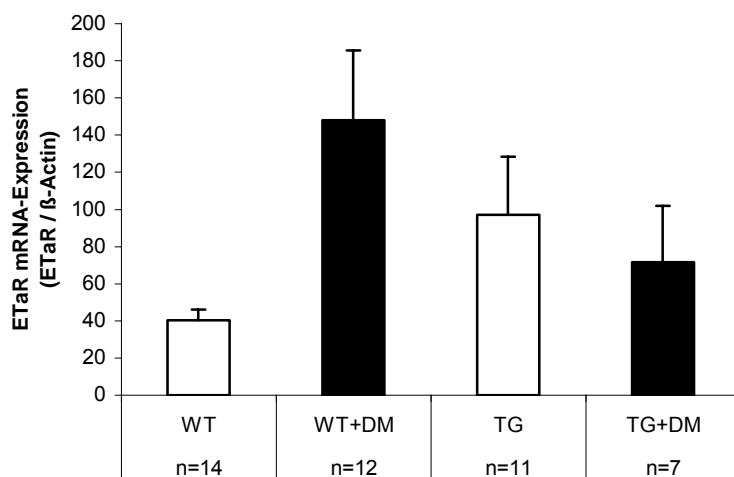


Abbildung 28: Glomeruläre ET_A-R mRNA-Expression nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte \pm SEM.

4.4.3 Glomeruläre ET_B-R mRNA-Expression

Die mittels Real-Time PCR untersuchte glomeruläre ET_B-R mRNA-Expression zeigte keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test). (**Abb.29**)

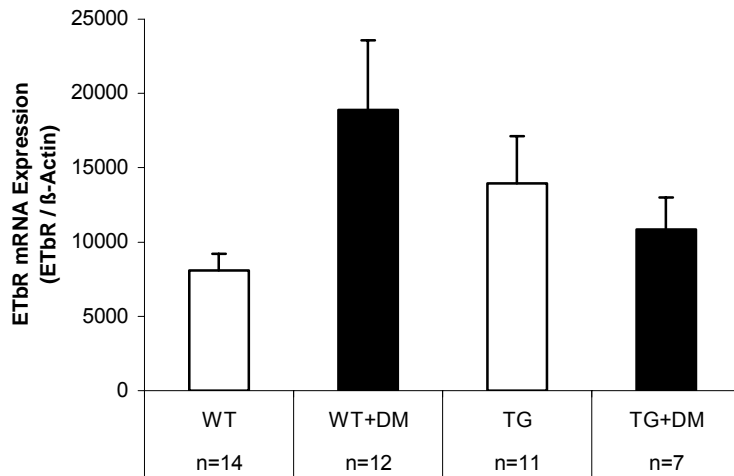


Abbildung 29: Glomeruläre ET_B-R mRNA-Expression nach 6 Monaten Studiendauer bei nichttransgenen (WT) und transgenen (TG) Ratten mit Normoglykämie oder Diabetes mellitus (DM); Mittelwerte ± SEM.

4.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit, dass das beabsichtigte Versuchsdesign erreicht wurde. Die Zuordnung der Versuchstiere zu den 4 Gruppen entsprechend diabetisch/ nichtdiabetisch und transgen/ nichttransgen wurde durch Blutzuckerbestimmungen und renalem DNS-Nachweis von humanem Endothelin-2 verifiziert. Zusätzlich wurden bei den transgenen Tieren erhöhte ET-Konzentrationen im Plasma und den glomerulären Kulturüberständen als Ausdruck der aktiven Synthese des Transgens dokumentiert. Der systolische Blutdruck war in allen Gruppen vergleichbar und nicht signifikant unterschiedlich. Im Versuchsverlauf starben 12% der diabetischen Wildtyp-Tiere und 55% der diabetischen ET-2-transgenen Tiere, ohne dass dieses auf eine renale Funktionseinschränkung zurückführbar war.

In den Wildtyp-Tieren führte die diabetische Stoffwechsellage zu signifikanten Anstiegen von Proteinurie, Albuminurie, Nierengewicht, glomerulärem Volumen, glomerulärer Matrixakkumulation und Fibronektinexpression, sowie erhöhter Harnstoffclearance als Zeichen der diabetischen Nephropathie. Die Hyperglykämie führte zu einer weiteren Erhöhung der ET-Plasmaspiegel ohne die glomeruläre ET-Produktion weiter zu verändern.

In den nicht-diabetischen ET-2-transgenen Tieren fanden sich signifikante Anstiege von Proteinurie und Albuminurie sowie glomerulärer Hypertrophie und Sklerose.

In den diabetischen ET-2-transgenen Tieren fanden sich signifikante Erhöhungen von Albuminurie, Nierengewicht, glomerulärer Hypertrophie und Sklerose sowie der Harnstoff-Clearance im Vergleich zu den nicht-diabetischen ET-2-transgenen Ratten. Diese Veränderungen gingen jedoch nicht in ihrem Verhältnis (prozentualer Anstieg im Vergleich zur nicht-diabetischen Gruppe) über das hinaus, was in Gegenwart einer diabetischen Stoffwechsellage bei den Wildtyptieren beobachtet wurde.

Die endogene Ratten-ET-1-mRNA-Expression war bei den ET-2-transgenen, nichtdiabetischen Tieren signifikant erhöht. Signifikante Veränderungen der ET-Rezeptor-mRNA in Gegenwart von Hyperglykämie und/oder ET-2-Überexpression wurden nicht beobachtet.

5 Diskussion

Die diabetische Nephropathie ist eine führende Ursache für chronische Nierenerkrankung und terminale Niereninsuffizienz⁴. Die therapeutischen Möglichkeiten, den Verlauf der DN günstig zu beeinflussen, sind begrenzt. Ein besseres Verständnis der Pathogenese bildet die Grundlage für neue oder verbesserte Behandlungsstrategien.

Die bisher vorliegenden Untersuchungen zur Bedeutung des Endothelinsystems bei diabetischer Nephropathie sind widersprüchlich. Endotheline sind potente Vasokonstriktoren und Mitogene⁵⁴. Die Behandlung mit Endothelin-Blockern verringert Proteinurie und Nierenfibrose bei diabetischen Tieren^{7, 8}. Bei Patienten mit diabetischer Nephropathie gehen erhöhte Endothelin-Plasma-Spiegel dem Auftreten von Sekundärkomplikationen voraus⁵. Jedoch korrelieren Plasma-ET-1-Spiegel nicht mit wichtigen klinischen Verlaufsparemtern des Diabetes, wie Blutzuckerspiegel, HbA_{1c}, Serumkreatinin und Albuminurie. Einen Einfluss der pharmakologischen Endothelin-Rezeptorblockade auf die Albuminurie konnte in einigen Studien nicht bestätigt werden⁹.

Vor diesem Hintergrund sollten in dieser Promotionsarbeit die pathophysiologische Bedeutung des Endothelinsystems für Entstehung und Verlauf der diabetischen Nephropathie weiter charakterisiert werden. Als neuer methodischer Ansatz wurde in dieser Arbeit eine diabetische Stoffwechsellage bei Ratten mit transgener Überexpression von ET-2 und ihren nicht-transgenen Geschwistertieren induziert. Nach 6-monatiger Versuchsdauer wurden dann die funktionellen, morphologischen und molekularbiologischen Veränderungen der diabetischen Nephropathie ermittelt und zwischen den 4-Versuchsgruppen verglichen. Im Folgenden werden zunächst die angewandten Modelle und Methoden kritisch bewertet. Im Anschluss werden die ermittelten Ergebnisse im Kontext der bisher zur Fragestellung publizierten Literatur diskutiert.

5.1 Methodenkritik

5.1.1 Modell des Streptozotozin-induzierten Diabetes mellitus

Es werden Diabetesmodelle mit absolutem und relativem Insulinmangel unterschieden. Zu den Diabetesmodellen auf Basis eines absoluten Insulinmangels gehören u. a. diabetogene Pharmaka (STZ, Chlorozotozin, Alloxan) und chirurgisches Entfernen des Pankreas. Diabestesmodelle, die eine autoimmune „Insulinitis“ beeinhaltend sind u. a. Immunisierung⁹⁹; Enzephalomyocarditis-Virus-Infektion¹⁰⁰ und Transfer von diabetogenen Zellen¹⁰¹.

Von den zwei STZ-Dosierungsmodellen weist nur das MLD-STZ-Modell (Mehrfach-Niedrigdosis Konzept; siehe 1.2.) eine β -Zell-Zerstörung unter Beteiligung von Immunmechanismen auf und gilt als ein Modell für den Typ 1 Diabetes¹⁰². Für die Simulation des Diabetes mellitus Typ 2 ist das STZ-Modell wegen fehlender Insulinrestsekretion ungeeignet. Anderen Autoren zufolge ist das STZ-Modell weder dem Typ 1 noch Typ 2 Diabetes ähnlich^{103, 104}. Langzeitstudien zeigten, dass das STZ-Modell auch nach 18-monatiger Laufzeit allein nicht geeignet ist, funktionelle und morphologische renale Schäden im Sinne einer fortgeschrittenen DN hervorzurufen. Erst bei Einwirkung einer zweiten Noxe (Hypertonus, Hypoxie) bildeten sich typische Phänomene der DN wie beim Menschen aus⁴⁸.

Ferner bestehen zwischen dem verwendeten Diabetes-Tiermodell und dem humanen Diabetes nur Ähnlichkeiten, was z.B. Blockade-Effekte der Endothelin-Rezeptoren betrifft. Diese differieren zwischen den Spezies. Auch ist der Ausprägungsgrad einer DN beim Mensch gegenüber der Ratte deutlich stärker. Gerade durch die nur milde Ausprägung einer DN im STZ-Rattenmodell können zusätzliche Noxen gut in ihrer Wirkung/ Schädigung beurteilt werden. Deshalb und aufgrund der zeitnahen Ausbildung eines DM, der ubiquitären Verfügbarkeit und der Einfachheit und Sicherheit des Verfahrens wurde das STZ-Rattenmodell ausgewählt.

Für das Erfolgsorgan Niere spielen Art und Entstehung des DM eine untergeordnete Rolle. Jedoch sind aufgrund der Inzidenz des DM Typ 2 Modelle, die eine Hyperinsulinämie imitieren, zu bevorzugen. Insbesondere die polygenetisch vererbten Mutationen des Leptins und seiner Rezeptoren sind dem humanen DM Typ 2 sehr ähnlich^{105; 106}.

5.1.2 Rattenmodell der Endothelin-Überexpression (h-endoET-2)

Die Entwicklung von transgenen⁵⁰ und in zunehmender Zahl so genannter „Knockout“-Modelle¹⁰⁷ ist heute eine etablierte Methode zur Untersuchung der Bedeutung der entsprechenden Genprodukte. Vorteile der Verwendung von humanen Genen (vor allem in transgenen Modellen) liegen in der möglicherweise besseren Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Verhältnisse im Menschen sowie der besseren Differenzierung zwischen Transgen-Effekten und Prozessen, die durch das entsprechende endogene Genprodukt verursacht werden⁵⁰.

Verschiedene genetische Manipulationen zur Analyse der Physiologie und Pathophysiologie des Endothelin-Systems sind bisher erfolgt. Zwei Tiermodelle der Endothelin-Überexpression wurden beschrieben: ET-1-transgene Mäuse⁵² und ET-2-transgene Ratten¹¹⁷. Daneben gibt es eine Reihe von das Endothelin-System betreffenden „Knock-out“-Tieren^{51, 108, 109}. Die Aminosäuresequenzen zwischen ET-1 und ET-2 differieren nur gering, die pharmakologischen Eigenschaften sind ähnlich. Dennoch unterscheiden sich beide Endotheline bezüglich der Gewebeverteilung und Rezeptoraffinität voneinander (siehe Einleitung). Nach Firth et al.¹¹⁰ wird in der Ratte ET-2 weniger ubiquitär als ET-1 exprimiert, so z. B. nicht in der Niere. Das Molekül wurde als vasoaktiver intestinaler Konstriktor (VIC) bei Maus und Ratte identifiziert¹¹¹. Eine direkte Übertragung von Schlussfolgerungen der ET-2-Wirkungen auf ET-1 ist deshalb nicht unkritisch möglich. Auch ist zu beachten, dass das Transgen-Produkt Präpro-h-endoET-2 biologisch noch inaktiv ist und für seine Aktivierung eine weitere Prozessierung durchlaufen muss. Dazu ist u. a. ECE nötig, deren Spezifität weniger gut erforscht ist (siehe Einleitung).

Kritisch betrachtet ist es bisher (wegen der Schwierigkeiten auf Peptid-Niveau zwischen dem Transgen-Produkt h-endoET-2 und endogenem Ratten-ET-2 und –ET-1 zu unterscheiden) nicht bewiesen, dass das Transgen-Produkt h-endoET-2 adäquat prozessiert wird. Die publizierten phänotypischen Befunde in dem Tiermodell sprechen jedoch dafür. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das Transgen-Produkt h-endoET-2 in der Niere exprimiert wird. **Die diabetische Stoffwechsellage bedingte keinen Unterschied in der h-endoET-2-mRNA-Expression zwischen den transgenen Gruppen.** Ob das (adäquat prozessierte) humane ET-2 in den transgenen Ratten Wirkungen haben könnte, die nicht mit der physiologischen Wirkung eines Ratten-ET-2 korrelieren, ist eine weitere, noch zu beantwortende Frage.

Die lokale Verfügbarkeit eines h-endoET-2 Rattenstammes und Vorerfahrungen der Untersucher mit diesen Tieren führten u. a. zur Wahl dieses Modelles. Ferner deuteten die Voruntersuchungen zur Albuminurie⁴⁹ und Glomerulosklerose auf eine Relevanz insbesondere des ET-2 Rattenmodelles hin. Das ET-1 Mausmodell schied aus, da eine DN bei Mäusen aufwändiger zu induzieren ist und aufgrund der umfassenden Analysen verschiedener Organsysteme (Niere, Herz, Auge) ein hoher „Gewebeverbrauch“ kalkuliert wurde.

5.1.3 Studienaufbau und Gruppenzusammensetzung

Zu Beginn der Studie wurde genomische DNA (Schwanzgewebe) aller Tiere untersucht. Es erfolgte eine Nachtestung am Studienende aus cDNA von glomerulärem und cortikalem Nierengewebe. 29 transgene (h-endoET-2) Tiere wurden identifiziert, den Gruppen TG (n=14) und TG+DM (n=15) zugeordnet und in die Auswertung einbezogen. Die 34 nicht-transgenen Tiere wurden den Gruppen WT (n=17) und WT+DM (n=17) zugeordnet und in die Auswertung einbezogen. **Das humane Endothelin-2 wurde nur in den transgenen Gruppen exprimiert. In den nichttransgenen Gruppen konnte das h-endoET-2 mittels quantitativer PCR in glomerulärer cDNA nicht nachgewiesen** werden. Damit konnte eine eindeutige Unterscheidung der Tiere in nichttransgene (WT) und transgene (TG) Tiere erfolgen.

Da sowohl nur-transgene und nur-diabetische Ratten mitgeführt wurden, konnten Effekte einer DN gegenüber Effekten des Transgens verdeutlicht werden. Die transgenen-diabetischen Tiere waren zur eigentlichen Beurteilung der Fragestellung notwendig.

Anfänglich konnten annähernd homogene Gruppen bezüglich Gruppenstärke und Alter der Tiere gebildet werden. Bei Versuchsende war die Gruppenstärke der Tiere zugunsten der nichtdiabetischen Gruppen verschoben. Ein signifikanter Überlebensvorteil der WT gegenüber der TG-Gruppe fand sich nicht, obwohl Endothelin als Alterungsprozess-Beschleuniger verdächtigt wird¹¹². Bei signifikant höherer Mortalität der TG+DM Gruppe im Vergleich zu allen übrigen Gruppen ist ein synergistischer Effekt von Transgen und Diabetes mellitus zu vermuten. Dass ein früherer Beginn der Insulinsubstitution die Überlebenswahrscheinlichkeit der TG+DM Gruppe deutlich erhöht hätte, ist nicht anzunehmen. Bis auf 2 Tiere, welche schon nach 4 Wochen Hyperglykämie verstarben und nur unzureichend Insulin verabreicht bekamen, erhielten alle im weiteren Verlauf gestorbenen Tiere der TG+DM Gruppe eine

suffiziente Insulintherapie. Dennoch betrug die Mortalität in dieser Gruppe ca. 55%. In der WT+DM Gruppe verstarben 2 Tiere vor Studienende. Dies entspricht einer Mortalität von 12%. Auch diese erhielten eine suffiziente Insulintherapie. Andere Studien zeigen Mortalitätsraten bei diabetischen Ratten von 17 bis 26% (keine Insulintherapie; maximal 4 Wochen Versuchsdauer)¹¹³. Aufgrund des Selektionseffektes durch die hohe Mortalität der Tiere in der TG+DM Gruppe, muss die Aussagekraft durch verminderte statistische Power für diese Gruppe als eingeschränkt betrachtet werden.

5.2 Nierenveränderungen unter Diabetes mellitus, transgener ET-2-Überexpression und der Kombination beider

5.2.1 Nierenveränderungen unter DM

Im Folgenden werden morphologische und funktionelle Veränderungen der hier erreichten DN beurteilt.

Die signifikante **Gewichtsverminderung** der diabetischen Tiere gegenüber ihren nichtdiabetischen Kontrollen spiegelt klinische Erfahrungen wider und wurde in vielen Studien belegt^{7, 22, 114}. Gewichtszunahmen aufgrund von Insulingaben wurden erwartet und bestätigt. Der Gewichtsverlauf der diabetischen Tiere spiegelt die Insulinsubstitution wider.

5.2.1.1 Eiweißausscheidung

Voruntersuchungen zeigten eine gesteigerte ET-1 Synthese bei Proteinüberladung des Tubulointerstitiums⁸¹. Die Proteinurie wurde insbesondere als Marker für eine ausgeprägte glomeruläre Störung untersucht. Vor allem fibrotische Prozesse (Glomerulosklerose) führen erfahrungsgemäß zur Proteinurie. Eine signifikante Proteinurie konnte in dieser Studie für die diabetischen nichttransgenen Tiere nicht gezeigt werden. Dies spricht für eine wenig ausgeprägte Schädigung des Glomerulums.

Die Albuminurie wird als sensitiver Marker einer beginnenden glomerulären Schädigung bei Diabetes mellitus und anderen, das kardiovaskuläre System betreffenden, Störungen angesehen und in den frühen Stadien der DN gegenüber der Proteinurie bevorzugt. Für eine DN im frühen Stadium sprechen die in dieser Studie gezeigten signifikanten Albuminurieunterschiede zwischen den nichttransgenen Gruppen – Ergebnisse, die mit vergleichbaren Studien korrespondieren^{7, 115, 116}.

5.2.1.2 Nierenhypertrophie

Den Anfangsstadien der DN ist die Hypertrophie / Hyperfiltration als ein Spezies-übergreifendes Phänomen zuzuordnen. Ross et al.¹¹⁷ und Seyer-Hansen¹¹⁸ beschreiben eine kompensatorische Hypertrophie bei STZ-induziertem Diabetes mellitus bei Ratten bereits 3 Tage nach Induktion. Verschiedene Arbeitsgruppen finden eine Erhöhung der absoluten und relativen Nierengewichte^{22, 113} diabetischer Tiere. Die Hypertrophie ist Langzeitstudien zufolge¹¹⁵ auch nach 14 Monaten diabetischer Stoffwechsellage bei Ratten nachweisbar. Diese Befunde wurden in dieser Studie bestätigt. Die relativen Nierengewichte für die WT+DM Gruppe waren signifikant höher als die der Kontrollgruppe (WT). Dies spricht für ein aktiviertes RAAS der diabetischen Tiere in dieser Studie.

Die Hypertrophie der Niere wird durch Vergrößerung der Glomerula (bei STZ-DM in Ratten nachweisbar) bedingt¹¹⁹. Die Hypertrophie der Glomerula persistiert ohne weitere Zunahme im Verlauf^{48, 120}. Kontinuierliche Insulin-Gaben scheinen dies zu verhindern¹²¹. Die Größe von Glomerula kann als Maßstab für glomeruläre Hypertrophie benutzt werden. Die glomerulären Volumina wurden histomorphometrisch ermittelt (siehe Material und Methoden; 3.2.1.). Eine diabetesbedingte glomeruläre Hypertrophie konnte nicht nachgewiesen werden. Dieser Befund widerspricht der Phase der anhaltenden Hyperfiltration, was sich in der Kreatinin-Clearance widerspiegelt. Er könnte durch bereits fibrotisch verkleinerte Glomerula erklärt werden (siehe unten).

5.2.1.3 Glomeruläre Matrixexpression

Die Glomerulosklerose bei Diabetischer Nephropathie wird von den meisten Autoren als Folge des erhöhten intraglomerulären Druckes und der damit verbundenen (chronischen) Hyperfiltration betrachtet^{17, 21}.

Bei der Analyse der Glomerulosklerose in dieser Studie zeigte sich, dass Diabetes mellitus erwartungsgemäß sowohl bei transgenen als auch bei nichttransgenen Tieren eine milde Glomerulosklerose verursacht. Eine Diabetes-typische Glomerulosklerose nach Kimmelstiel-Wilson (fokal-nodulär) wurde hier nicht gesehen. Dies bestätigt Voruntersuchungen, in denen auch nach maximal 18 Monaten unbehandeltem STZ-DM bei Ratten (ohne Co-Faktoren!) kaum Glomerulosklerose gefunden wurde^{48, 115, 120}.

Für **Fibronectin** (FN) als Bestandteil der EZM wurde eine deutliche Expressionssteigerung erwartet. Diese ist in Voruntersuchungen gut belegt: so bewirken u. a. Hyperglykämie¹²², ANG II (über TGF- β)¹²³ und ET-1¹²⁴ eine vermehrte

FN-Expression der Glomerula, welche durch Insulin und Kortikoide teilweise gehemmt werden kann. FN fungiert somit als Surrogatparameter für den glomerulären Fibroseprozeß. Bestätigend fanden sich signifikante Hyperglykämie-bedingte Unterschiede sowohl für das glomeruläre FN-Peptid als auch die glomeruläre FN-mRNA, allerdings nur für nichttransgene Tiere.

Die **TGF- β** -Zytokinfamilie wirkt vor allem auf mesenchymale Zellen proliferierend und aktivierend. Das mittels ELISA gemessene TGF- β 1 wird mit der Pathogenese der DN assoziiert. Es wird durch eine Vielzahl von Mediatoren und Stimuli beeinflusst (siehe Einleitung), u. a. Hyperglykämie, Proteinurie, Plasmin und Tubulusepithelzellen. TGF- β fördert durch Akkumulation von Komponenten der extrazellulären Matrix und Basalmembranproliferation die Fibrose der diabetischen Niere. Eine Neutralisation mittels TGF- β Antikörpern verhindert diese Mechanismen²⁷.

Der erwartete Anstieg des TGF- β 1 Peptids und der mRNA war in dieser Studie nur numerisch für die nichttransgene diabetische Gruppe nachweisbar, bei denen auch signifikant erhöhte Albuminurie und Fibronectin-Peptid und -mRNA-Expression gezeigt werden konnten.

Die physiologische Funktion von **PAI-1** ist die Inhibierung der **Plasminogen-Aktivatoren** *tissue plasminogen activator* (tPA) und *urokinase plasminogen activator* (uPA) zur Ausbildung von stabilen Thromben. Erhöhte Konzentrationen des PAI-1 Plasmaspiegels sind mit venösen und arteriellen Thrombosen, koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt assoziiert. Darüber hinaus spielt die PAI-1-Expression eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellmigration und Angiogenese⁹⁰.

Zahlreiche in vitro und in vivo Studien belegen die Aktivierung von TGF- β durch die Serin-Protease Plasmin, welche aus aktiviertem Plasminogen hervorgeht. Diese Wirkung von Plasmin wird wiederum durch PAI-1 reguliert¹²⁵. Ebenso scheint Hyperglykämie die PAI-1-Expression positiv zu beeinflussen.

Das Niveau der Glomerulosklerose und die FN-, TGF- β - sowie PAI-1-Expressionen sprechen für eine allenfalls beginnende DN und bestätigen die Limitationen des STZ-Modells (siehe 5.1.1.).

5.2.1.4 Nierenfunktion (Kreatinin/ Kreatininclearance; Harnstoff/ Harnstoffclearance)

Als Maß für die GFR wurde die Kreatinin-Clearance bestimmt, da das Serum-Kreatinin als nicht hinreichend sensitiv eingeschätzt wird. Dennoch bietet auch die Kreatinin-Clearance kein genaues Abbild der GFR, da ein Teil des Kreatinins im Tubulus aktiv

sezerniert wird. Dieser Anteil beträgt etwa 10% bei der gesunden (humanen) Niere und kann bei schweren Nephropathien auf bis zu 50% ansteigen, neben einer zusätzlichen Elimination über den Darm. In diesem Falle würde die Kreatinin-Clearance die GFR erheblich überschätzen¹²⁶. Aus diesen Angaben ergibt sich, dass die Kreatinin-Clearance im Falle einer GFR-Einschränkung das Ausmaß dieser unterschätzt und im Falle von Hyperfiltration möglicherweise die damit verbundene GFR-Steigerung ebenfalls unterschätzt wird. Zur Erhöhung der Sicherheit hinsichtlich der Beurteilung der Nierenfunktion wurden deshalb Harnstoff-basierte Nierenfunktionsparameter zusätzlich ermittelt, die alles in allem die Kreatinin-basierten Resultate bestätigten. Die nach 3 Monaten Diabetes gefundene signifikante Erhöhung der Kreatinin-Clearance der diabetischen Tiere im Vergleich zu nichtdiabetischen Kontrollen kennzeichnet die Phase der Hyperfiltration der Diabetischen Nephropathie und wurde in vielen Studien beschrieben^{21, 22, 23, 115}. Einige Autoren bemerkten einen Anstieg der Einzelnephron-GFR (SN-GFR) nur bei moderater Hyperglykämie²² (Insulingabe), bei nicht substituiertem Diabetes mellitus fanden sie hingegen eine Verringerung der SN-GFR²³. Da die Tiermodelle, Studienprotokolle, Insulindosen etc. deutlich divergieren, ist ein direkter Vergleich zwischen Studien nur bedingt möglich.

Die nichttransgenen diabetischen Tiere (WT+DM) wiesen nach 6 Monaten Diabetes mellitus im Vergleich zu nichttransgenen Kontrollen (WT) keine Hyperfiltration mehr auf. Voruntersuchungen stützen diesen Befund^{7, 96}, wobei teilweise (geringe) Reduktionen der Clearance gefunden wurden. Studien, die als Nierenfunktionsparameter das Serum-Kreatinin verwendeten, wiesen zumeist nichtsignifikante Kreatininerhöhungen für die diabetischen Gruppen aus^{113, 127}. Dies zeigt erneut, dass ohne zusätzliche Noxe eine relevante Nierenfunktionseinschränkung mit dem STZ-Modell nicht zu erreichen ist.

Der **Plasma-Harnstoff** stellt einen weiteren Nierenfunktionsparameter dar. Harnstoff ist ein Endprodukt des Protein-Stickstoff-Stoffwechsels, die Plasmakonzentrationen sind damit ernährungsabhängig. In den Glomerula wird Harnstoff vollständig filtriert. Im Tubulussystem erfolgt eine passive Rückdiffusion des Harnstoffes aufgrund guter Zellmembranpermeabilität. Diese Rückdiffusion nimmt mit steigender Passagegeschwindigkeit (Urinproduktion) ab. Die Harnstoff-Clearance unterschätzt somit die GFR. Im Falle der (diabetischen) Polyurie nähert sich die Harnstoff-Clearance jedoch der GFR an. Bei fortgeschrittener Nierenschädigung, wenn die Kreatinin-Clearance aufgrund tubulärer Sekretion „falsch normale“ Werte aufweist, sind erhöhte Harnstoffwerte ein Zeichen stärker eingeschränkter Nierenfunktion. Die Harnstoff-

Clearance der diabetischen Tiere war nach 6 Monaten Diabetes mellitus signifikant erhöht im Vergleich zu nichtdiabetischen Tieren. Dies ist analog zur Kreatinin-Clearance ein Effekt der Hyperfiltration, kann zum Teil aber auch durch Polyurie der diabetischen Tiere bedingt sein.

5.2.2 **Nierenveränderung unter transgener ET-2-Überexpression**

Signifikante transgenbedingte Gewichtsunterschiede bei männlichen Sprague Dawley (SD) Ratten sind aus vorhergehenden Studien bekannt^{34, 51}. Auch in dieser Studie zeigte sich, dass zu allen Zeitpunkten die transgenen Tiere signifikant leichter waren als die Kontrolltiere.

5.2.2.1 Eiweißausscheidung

Das verwendete transgene Rattenmodell ist durch eine frühzeitig einsetzende, kontinuierlich zunehmende Albuminurie vor allem bei männlichen Tieren gekennzeichnet⁵¹. Hier initial fehlende Unterschiede zwischen transgenen und nichttransgenen Tieren sind am ehesten Ausdruck einer zu diesem Zeitpunkt noch nicht etablierten Glomerulosklerose bei transgenen Ratten. Die zu diesem Zeitpunkt schon nachweisbare Einschränkung der glomerulären Funktion (GFR; siehe 5.2.2.4.) könnte protektiv bezüglich einer größeren Proteinurie wirken, am ehesten durch Verringerung des glomerulären Filtrationsdruckes infolge Vasokonstriktion am Vas afferens. ET-1 steigert via ET_A-R den Perfusionsdruck im Glomerulum und fördert damit die Albuminurie/ Proteinurie. Selektive ET_A-R Blockade vermindert die Proteinurie im Tierexperiment¹²⁸. Nach 6 Monaten Diabetes mellitus hingegen war bei den transgenen Gruppen gegenüber ihren nichttransgenen Kontrollen eine signifikante Proteinurie festzustellen. Dies deckt sich mit Resultaten aus Vorstudien^{51, Liefeldt-unveröffentlicht}. Bemerkenswert sind große interindividuelle Unterschiede der Albuminurie innerhalb der Gruppen.

5.2.2.2 Nierenhypertrophie

Liefeldt et al.⁵¹ beschrieben transgenbedingte Organgewichtsunterschiede für männliche SD-Ratten (Trend zu niedrigeren Gewichten bei transgenen Tieren), die sich in dieser Studie jedoch nicht nachweisen ließen⁴⁹. Es konnte lediglich eine numerische Verminderung der relativen Nierengewichte auf Mittelwertbasis gefunden werden. Auffällig waren größere Glomerula bei transgenen Tieren. Diesbezüglich fehlen bisher vergleichbare Untersuchungen. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist ein

transgenbedingter Untergang einzelner Glomerula und damit Nephrone und eine kompensatorische Hypertrophie der verbleibenden Glomerula.

5.2.2.3 Glomeruläre Matrixexpression

Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und nichttransgenen Gruppen. Dieser Befund steht im Kontrast zu unveröffentlichten Daten, nach denen männliche transgene Tiere verglichen mit nichttransgenen Kontrollen eine signifikante Glomerulosklerose aufweisen^{Liefeldt (unveröffentlicht)}. Allerdings sind diese Ergebnisse nicht direkt mit den aktuellen Befunden vergleichbar, da sich die Tiere im Alter unterschieden und eine semi-quantitative, nicht automatisierte Methode zur Analyse der Glomerulosklerose benutzt wurde. Für die glomeruläre FN-Expression konnte eine signifikante Erhöhung der transgenen nichtdiabetischen Tiere gegenüber den Kontrollen gezeigt werden. Dies bestätigt Voruntersuchungen transgener Ratten, die eine gesteigerte Glomerulosklerose aufwiesen⁵¹. Histologisch verifizierte sich dies allenfalls als Trend, was die eingeschränkte Aussagekraft von Surrogatparametern belegt.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen eine dezente transgenbedingte PAI-1-Expressionssteigerung im Glomerulum vermuten.

5.2.2.4 Nierenfunktion (Kreatinin/ Kreatininclearance; Harnstoff/ Harnstoffclearance)

Eine Verminderung der Clearance der transgenen Tiere war bereits zu Beginn der Studie erkennbar. Zum Studienende war dieser Unterschied zwischen der TG und WT Gruppe nur noch numerisch zu finden. Der altersbedingte stärkere Clearance-Abfall der WT Gruppe mit rascher Annäherung an das Clearance-Niveau der TG Gruppe kann hierfür verantwortlich gemacht werden. Die initial signifikant niedrigere Clearance bei transgenen Ratten ist vermutlich überwiegend funktionell bedingt und lässt sich mit vasokonstriktorisches Effekten von Endothelin(en) z.B. am Vas afferens erklären⁵⁴. Später im Verlauf könnte eine Transgen-induzierte Glomerulosklerose hinzukommen. Mit steigendem Alter erfolgt eine renale ET-Expressionssteigerung¹¹², wodurch sich die Kreatinin-Clearances zwischen transgenen und nichttransgenen Tieren angleichen dürften.

Korrespondierend zu den Ergebnissen für die Kreatininclearance wiesen die transgenen Tiere bereits zu Beginn der Studie höhere Harnstoffwerte auf. Ursächlich dafür war die signifikant niedrigere Harnstoff-Clearance. Ein erwarteter Anstieg des Plasma-Harnstoffs nach 6 Monaten Diabetes mellitus fand sich nicht. Es zeigte sich ein einheitliches Meßwertniveau.

5.2.3 **Nierenveränderungen unter Kombination von Diabetes mellitus und transgener ET-2-Überexpression**

5.2.3.1 Eiweißausscheidung

Eine Hyperglykämie als zusätzliche Noxe bei transgenen Ratten ließ die Proteinurie/ Albuminurie nicht, wie erwartet, überproportional steigen. Tatsächlich fand sich kein Unterschied der Proteinurie/ Albuminurie zwischen beiden transgenen Gruppen. Dies muss als Indikator dafür gewertet werden, dass die Kombination von Endothelin-Überexpression mit Hyperglykämie, verglichen mit Endothelin-Überexpression allein, zumindest nach 6 Monaten nicht mit gravierend verstärkter Glomerulosklerose einhergeht. Anders formuliert: Endothelin-transgene Ratten scheinen keine höhere Suszeptibilität für die Entwicklung einer Diabetischen Nephropathie zu besitzen.

5.2.3.2 Nierenhypertrophie

Eine diabetische Hypertrophie der Rattennieren fand sich für die transgenen Tiere nicht. Im Gegenteil waren die Glomerula diabetischer transgener Ratten numerisch kleiner als die nichtdiabetischer transgener Ratten. Der Unterschied zwischen beiden transgenen Gruppen könnte durch Selektion in der transgenen diabetischen Gruppe (durch höhere Mortalität) vorgetäuscht sein. Denkbar wäre auch eine ausgeprägtere Fibrose transgener Nieren, die eine stärkere diabetische Hypertrophie verhindert oder, wie bereits beschrieben, die verbliebenen Glomeruli reaktiv hypertrophieren lässt.

5.2.3.3 Glomeruläre Matrixexpression

Trotzdem transgene diabetische Tiere die höchste PAS-Positivität intraglomerulär aufwiesen, war eine überadditive Glomerulosklerose aus Effekten des Transgen und der Hyperglykämie hier nicht nachweisbar. Eine Insulin-bedingte Hemmung der FN-Expression kommt wegen der vergleichbaren Dosierung in den diabetischen Gruppen nicht in Betracht. Unerwartet ist, dass die ET-2 transgene diabetische Gruppe eher niedrigere glomeruläre TGF- β Spiegel im Vergleich zu den nichttransgenen diabetischen Tieren aufwiesen – möglicherweise bedingt durch die signifikant im Vergleich zur nichttransgenen diabetischen Gruppe verringerte ET-1-mRNA-Expression. Es wurde aufgrund der Makrophagen-aktivierenden Wirkung von ET-1¹²⁹ und daraus resultierenden TGF- β mRNA-Expressionssteigerung ein überadditiver Effekt erwartet. Dies wird gestützt durch Studien, in denen ET_A-R Antagonisten die TGF- β mRNA-Expression und somit die Fibrose der diabetischen Niere vermindern^{8, 94, 129}. Dennoch deutet sich keine erhöhte Suszeptibilität der transgenen Gruppen für die Ausbildung einer DN an. Da für die untersuchten Parameter zur DN jedoch insgesamt

ein eher frühes Stadium gefunden wurde, scheint auch die Aktivierung der Fibroseparameter nach 6 Monaten Studiendauer nicht vollständig ausgeprägt zu sein. Auch könnte eine differenzielle transkriptionelle Regulation von endogenem ET-1 durch das Transgen eine unterschiedliche „phänotypische“ Ausprägung bewirken. Die Kombination beider Faktoren (TG+DM) bewirkte überraschenderweise keine Steigerung der PAI-1-Expression.

5.2.3.4 Nierenfunktion (Kreatinin/ Kreatininclearance; Harnstoff/ Harnstoffclearance)

Ein Schlüsselresultat der vorgelegten Studie ist die anhaltend hohe Kreatinin-Clearance in der transgenen diabetischen Gruppe bei Versuchsende. Für die anhaltende Hyperfiltration in der TG+DM Gruppe nach 6 Monaten Diabetes mellitus gibt es mehrere mögliche Erklärungen:

- So kann vermutet werden, dass die hohe Mortalität in dieser Gruppe bei Studienende dazu geführt hat, dass vor allem „gesündere“ Tiere in die Auswertung eingingen (dagegen spricht, dass auch nach 3 Monaten Studiendauer das Ausmaß der Hyperfiltration offensichtlich bei transgenen diabetischen Tieren größer war als bei nichttransgenen diabetischen Tieren).
- Frühere Untersuchungen an dem verwendeten transgenen Rattenmodell legen nahe, dass das NO-System in transgenen Tieren (vermutlich kompensatorisch) aktiver ist^{34, 51}. Eine NO-vermittelte Vasodilatation am Vas afferens wird teilweise als Mechanismus der diabetischen Hyperfiltration angegeben^{114, 130, 131}.
- Weitere Erklärungsansätze könnten in einer in dieser Studie nachgewiesenen komplexen Regulation von Komponenten des endogenen Endothelin-Systems der Ratte durch das Transgen und / oder die Hyperglykämie liegen (s. ET-System).

In Kontrast zur Kreatinin- steht die Harnstoffclearance, welche bei den transgenen diabetischen Tieren im Vergleich zu nichttransgenen diabetischen Tieren signifikant vermindert war. Dies könnte, bei Überschätzung der Nierenfunktion dieser Gruppe durch die Kreatinin-Clearance (siehe oben) ein Anhaltspunkt für beginnende Nierenfunktionseinschränkungen sein. Konträr dazu liessen sich für die Plasma-Harnstoffspiegel jedoch keine Unterschiede nachweisen.

5.3 Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz

Für die Blutdruckmessung stehen „blutige“ (arterielle Druckmessung) und „unblutige“ (Schwanzplethysmographie in Anlehnung an RIVA-ROCCI) zur Verfügung. In dieser Studie wurde, trotz bekannter Abweichungen (siehe 4.1.4.), die weniger invasive, aber fehlerbehaftetere Schwanzplethysmographie gewählt. Die Transgenexpression wirkt sich vorangehenden Studien zufolge nicht auf den **Blutdruck** aus^{34, 51}, obwohl exogen verabreichtes Endothelin eine dosisabhängige, starke und nachhaltige Vasokonstriktion auslöst⁵⁴. Der para- bzw. autokrine Sekretions- und Wirkmechanismus scheint eine systemische Wirkung zu verhindern. Zudem dürften vasoaktive Substanzen, insbesondere NO^{53, 132, 133} und ADM¹³⁴, gegenregulierend wirken. Die Rezeptorverteilung der Gewebe insbesondere des ET_A-R scheint für den vasokonstriktiven Effekt nicht maßgeblich zu sein³⁴. So profitieren in Hypertonie-Modellen (z.B. SHR-Ratte, DOCA Ratte, Dahl Salz-sensitive Ratte) die hypertensiven Tiere eher von nichtselektiven ET-R-Antagonisten^{7, 135}. Interessanterweise weisen aber ET-1-Knockout-Mäuse einen erhöhten Blutdruck auf¹³⁶. Dies wird u. a. durch sympathische Überaktivität erklärt. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine längerfristige ET_B-R-Stimulation bei Ratten den Blutdruck erhöht¹³⁷. Nach 6 Monaten Diabetes zeigten sich in unserer Studie keine signifikanten transgenbedingten Blutdruckunterschiede. Innerhalb der transgenen nichtdiabetischen Gruppe fanden sich die deutlichsten interindividuellen Schwankungen. Dies ist am ehesten Folge der schlechteren Adaptation der transgenen Tiere an die Blutdruckmessung. Die Methode erforderte eine Gewöhnung der Tiere, die bei den meisten Tieren gut gelang. Dennoch befinden sich in jeder Gruppe mindestens 3 Tiere, von denen weniger als 3 Messwerte gewertet werden konnten.

Auch eine Diabetes-bedingte Blutdruckveränderung fand sich nicht. Diese scheint erst nach länger andauernder Hyperglykämie aufzutreten. In Diabetes-Studien, die mindestens 6 Monate (bis 14 Monate) liefen, konnte sowohl bei männlichen SD- Ratten als auch Munich-Wistar-Ratten eine signifikante Blutdruckerhöhung gefunden werden^{7, 115}. In kürzeren Studien von ca. 4-6 Wochen Hyperglykämie konnten dagegen keine Blutdruckunterschiede festgestellt werden^{22, 113}.

Der Transgenstatus wirkte sich nicht auf die **Herzfrequenz** aus. Interessanterweise war die Herzfrequenz bei diabetischen Tieren niedriger als bei nichtdiabetischen Tieren. Dies wurde auch in anderen Studien gefunden^{113, 116}, ist typisch für das STZ Modell und noch nicht genau erklärt¹³⁸. Eine erwartete Erhöhung und Fixierung der Ruhfrequenz diabetischer Tiere (als klinischer Ausdruck einer autonomen Neuropathie) fand sich

nicht. Die Herzfrequenz wurde zum Ende der Studie in Verbindung mit dem systolischen Blutdruck gemessen. Es kann eine Gewöhnung der diabetischen Tiere an den Untersucher durch häufigeren Kontakt während vorausgegangener Blutzuckermessungen und Insulingaben vermutet werden.

5.4 Regulation des Endothelinsystems unter Diabetes mellitus und transgener ET-2-Überexpression

Bisher sind keine Studien eines Endothelin-Überexpressionsmodelles, kombiniert mit dem STZ-Diabetes Modell, bekannt. Studien mit ET-1 transgenen Mäusen^{52, 139} weisen aufgrund erhöhter Glomerulopathie auf eine Beteiligung des ET hin, jedoch besteht in diesen keine diabetische Stoffwechsellaage.

Die Bestimmung der **Endothelin-Plasmaspiegel** erfolgte zur Beurteilung des Einflusses der Hyperglykämie auf das (endogene) Endothelin-System, zur Dokumentation der transgenen Überexpression von humanem ET-2 und zur Analyse eines möglichen Einflusses der Hyperglykämie auf die Transgenexpression. Wichtig ist zu betonen, dass mittels ELISA wegen der Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers nicht sicher zwischen endogenem und transgenem Endothelin unterschieden werden kann. Erhöhte ET-1-Plasmaspiegel bei diabetischer Stoffwechsellaage wurden für diverse Spezies (u.a. Ratte^{113, 114}, Mensch⁵) in Studien nachgewiesen⁸⁶. Andere Studien zeigten bei moderater¹⁴⁰ oder intensiver¹⁴¹ Hyperglykämie nicht erhöhte ET-1-Plasmaspiegel. Zu bedenken ist bei allen diesen Studien, dass Endotheline auto- oder parakrin, offenbar aber nicht systemisch wirken und Plasmaspiegel kein gutes Spiegelbild der Gewebesituation sind.

Die vorliegende Studie zeigte signifikant höhere ET-Plasmaspiegel in beiden transgenen Gruppen (mutmaßlich infolge der transgenen Überexpression von ET-2), jedoch keine signifikant höheren ET-Plasmaspiegel in den beiden diabetischen Gruppen (jeweils verglichen mit den entsprechenden Kontrollgruppen). Auch dies könnte als schwaches Argument gegen das Vorhandensein einer fortgeschrittenen Diabetischen Nephropathie sowohl in der nichttransgenen diabetischen wie in der transgenen diabetischen Gruppe gewertet werden.

Die Analyse der **glomerulären Endothelinexpression (ELISA)** von Endothelin(en) in Überständen glomerulärer Kulturen diente der genaueren Betrachtung der Aktivität des Endothelin-Systems im Kompartiment Glomerulum, dem vermuteten Hauptmanifestationsort der DN. Auch diese Analyse konnte keinen überzeugenden Beweis für

einen unabhängigen, signifikanten Einfluss der Hyperglykämie auf die Aktivität des (glomerulären) Endothelin-Systems liefern. Beachtet werden muss jedoch, dass die Glomerula 48h in einem nichtdiabetischen Kulturmilieu gehalten wurden. Inwieweit sich dies auf die ET-Expression ausgewirkt haben könnte, muss offen bleiben. Eine schwere DN bzw. Glomerulosklerose scheint jedoch unwahrscheinlich. Die glomeruläre Expression des Transgen konnte jedoch erneut belegt werden.

Die **Expression von ET-1-mRNA** wurde untersucht, um transkriptionell-regulatorische Einflüsse der Hyperglykämie und/oder der transgenen h-endoET-2-Expression auf das endogene (Ratten-) ET-System zu erfassen. Aus der Literatur sind widersprüchliche Angaben zum Einfluss von Hyperglykämie auf die ET-1-Expression zu entnehmen. In Kulturen von Ratten-Mesangiumzellen konnte nach 3 Monaten Diabetesdauer¹⁴¹ nachgewiesen werden, dass Hyperglykämie dosisabhängig eine ET-1-mRNA-Überexpression und eine erhöhte ET-1-Promotoraktivität induziert. Andere Autoren belegten signifikant verminderte renale ET-1-mRNA-Expressionen bei hyperglykämischen Ratten¹⁴⁰ (STZ-induziert). Eine moderate Hyperglykämie verstärkte den Effekt. Bemerkenswert ist, dass Sauerstoffmangel und natürliche Alterungsprozesse die renale ET-1-mRNA-Expression erhöhen¹¹², was altersabhängige Unterschiede in den zitierten Studien nahelegt. Die beschriebene Autoinduktion von ET-1 durch den ET_B-R ist in der Niere (Ratte-Mesangium; Mensch-Endothel, prox.Tubulus) eine Reaktion auf pathophysiologische Situationen^{64, 79}. In der humanen Niere wird sie als autokriner Reparaturmechanismus des Tubulussystems verstanden.

Die in dieser Studie mittels Real-Time-PCR gemessene ET-1-mRNA-Expression zeigte keinen Einfluss der Hyperglykämie in nichttransgenen Tieren. Dagegen fand sich überraschenderweise eine signifikante Steigerung in den transgenen, nichtdiabetischen Tieren. Offenbar ist h-endoET-2 selbst in der Lage, die endogene ET-1-Expression zu stimulieren. Diese Stimulation allerdings fehlte bei transgenen, diabetischen Tieren (diese Tiere wiesen eine signifikant niedrigere ET-1-mRNA-Expression als die transgenen, nichtdiabetischen Tiere auf). Diese differenzielle transkriptionelle Regulation muss als ein entscheidender Befund der vorgelegten Studie betrachtet werden, weil er die phänotypischen Auswirkung (Ausbleiben einer fortgeschrittenen DN) mutmaßlich entscheidend beeinflusst haben dürfte.

Signifikante Unterschiede in der **ET_A-R mRNA-Expression** fanden sich in der vorgelegten Arbeit nicht, numerische Unterschiede hingegen schon. Dies kann ein Hinweis für eine Down-Regulation des ET_A-R bei transgenen diabetischen Tieren sein.

Jedoch ist aufgrund der Selektion dieser Gruppe zum Studienende hin (siehe 5.1.3.) die Aussagekraft eingeschränkt.

Früheren Studien zufolge wird im STZ-Diabetesmodell bei Ratten die **ET_B-R-Expression** Proteinkinase C-vermittelt vermindert¹⁴². In unserer Studie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Ein numerischer Anstieg des ET_B-R infolge Hyperglykämie zeigte sich für die nichttransgenen Tiere, die Aussagen sind jedoch aufgrund abweichender Gruppenstärken und höherer interindividueller Variabilitäten eingeschränkt. Inwieweit komplexere Down- bzw. Up-Regulationen des intrarenalen Endothelinsystems die ET_B-R-mRNA-Expression beeinflussten, kann hier nicht verifiziert werden. Auch fehlen hierzu vergleichbare Studien. Auffallend ist jedoch, dass für beide ET-R ähnliche Expressionsmuster gefunden wurden. Die vermutete reaktive Rezeptorverminderung („down-regulation“) fand sich weder für den ET_A-R noch für den ET_B-R.

Problematisch sind Rückschlüsse vom Tiermodell auf den Menschen. Insbesondere die Unterschiede in der Rezeptorverteilung sind der Grund dafür. In der humanen Niere wird der ET_A-R eher im Glomerulum, der ET_B-R eher im Tubulus exprimiert, bei Überwiegen des ET_B-R. In der Rattenniere hingegen findet sich der ET_B-R eher im Glomerulum, der ET_A-R eher im distalen Tubulus. Für beide Spezies gilt: Beide Rezeptoren kommen in afferenten und efferenten Arteriolen vor^{82, 83}.

5.5 RAS

Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit zeigen an einer Reihe von relevanten funktionellen, morphologischen und molekularbiologischen Parametern, dass die selektive, transgene Überexpression von ET-2 in der Niere nicht zu einer Aggravierung der DN führt. Vor diesem Hintergrund muss die methodische Frage gestellt werden, ob der gewählte Versuchsansatz sensitiv genug bzw. überhaupt dazu geeignet war, unsere Ausgangshypothese beantworten zu können. Dass dies nur wahrscheinlich der Fall ist, soll anhand der gut dokumentierten pathophysiologischen Bedeutung des Renin-Angiotensin-System hergeleitet werden.

Eine große Anzahl von experimentellen und klinischen Untersuchungen hat gezeigt, dass das Renin-Angiotensin-System eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie spielt. Im Bereich der experimentellen Studien gibt es kaum ein Tiermodell, in dem die Inhibition des RAS, in der Regel pharmakologisch mit ACE-

Hemmer oder AT1-Blockern, nicht zu nephroprotektiven Effekten führt. Dieses gilt insbesondere auch für Modelle der diabetischen Nephropathie. Hier scheint die Wirksamkeit der RAS-Blockade zudem besonders intensiv zu sein, zumal das lokale renale RAS-System aufgrund einer verminderten ANG II-Empfindlichkeit der diabetischen Niere besonders aktiviert ist¹⁸. Eine über die reine Blutdrucksenkung hinaus gehende Nephroprotektion ist für die RAS-Blockade auch in vielen klinischen Untersuchungen belegt worden.

Schon 1993 wies Lewis⁴¹ nach, dass pharmakologische ACE-Blockade den Blutdruck signifikant senkt. In seiner an jüngeren Typ 1 Diabetikern durchgeführten Studie erreichten 21% der Placebogruppe gegenüber nur 11% der Captopril-behandelten Patienten (Captopril 75 mg/d) den definierten Endpunkt (Dialyse und/oder Transplantation, Tod). Dies entspricht einer Risikoreduktion von 50% (NNT = 10) bezüglich des definierten Endpunktes. Über die Reduktion des glomerulären Perfusionsdruckes mit resultierend initial abnehmender GFR wurde schon damals ein nephroprotektiver Effekt der ACE-Hemmer postuliert (siehe Einleitung). Nachfolgende Studien zur ACE-Blockade bestätigten diese Ergebnisse^{143, 144}.

Aufgrund der Erfolge der Blockade der ACE sind nachfolgend Angiotensin Rezeptor Blocker (ARB; sog. Sartane) verfügbar geworden. Diese zeigen ähnliche Effekte wie ACE-Inhibition, da sie an der gleichen Endstrecke (Verminderung der ANG II Wirkungen) angreifen. Bezüglich des Risiko (Endpunkte der Studien meist: Verdopplung des Serumkreatinin, Dialyse) konnte in fortgeschrittenen Stadien der DN eine Reduktion um etwa 20 % (RENAAL⁴², IDNT) gesehen werden. In den Anfangsstadien (II-III; Mikroalbuminurie) zeigte sich eine Reduktion um 70% bezüglich des Endpunktes: Progression zur Makroalbuminurie (IRMA II⁸⁸).

Gezielte Rezeptorblockade vermindert die entscheidenden Surrogatparameter der DN und weist somit indirekt auf die pathophysiologische Bedeutung des RAS hin.

Eine kombinierte Blockade des RAS (ACE Hemmer plus Sartan) zeigte in neueren Studien (CALM¹⁴⁵) zwar weitere Reduktionen der Albuminausscheidung, ging jedoch nicht mit einer gewünschten additiven Verminderung kardialer Ereignisse bei Hochrisikopatienten einher¹⁴⁶. Kardiovaskuläre Ereignisse sind jedoch insbesondere für Typ 2 Diabetiker die Hauptursache für Morbidität und Mortalität.

Der selektive Renin-Inhibitor Aliskiren (Rasilez[®]) gilt als neuester Angriffspunkt zur Hemmung des RAS und vermindert die Umwandlung von Angiotensinogen in Angiotensin I mit resultierend fallenden Angiotensin II Spiegeln. Tierversuchsstudien

zeigten, dass Aliskiren die Albuminurie gleichwertig zum AT-1 Blocker Losartan verminderte, den Blutdruck jedoch weit weniger gut beeinflusste^{33, 147}. Erste klinische Kurzzeitstudien zeigen beim Menschen eine Reduktion der Albuminurie um bis zu 20% als Add-on zur einer Maximaldosis eines AT-1 Blockers. Hier wird ein blutdruckunabhängiger nephroprotektiver Effekt vermutet¹⁴⁸, welcher mit einer Abnahme der Plasma-Renin-Aktivität (PRA) begründet wird. Diese sei ein weiterer Surrogatparameter u.a. für chronische Nierenerkrankungen. Langzeitdaten, insbesondere zur klinischen Sicherheit, müssen jedoch noch erhoben werden.

All diese therapeutischen Ansätze beinhalten eine Hemmung des RAS auf verschiedenen Stufen und weisen auf dessen pathophysiologische Bedeutung hin.

In Analogie zu unserem Versuchsansatz (STZ-induzierte DN in Gegenwart von ET2-Überpression) sind vergleichbare Untersuchungen (STZ-induzierte DN in Gegenwart von Renin-Überpression) ebenfalls in einem Ratten-Modell von der Arbeitsgruppe von Kelly et al.³³ durchgeführt worden. Ausgangspunkt war ein von Ganten et al.¹⁴⁹ etabliertes und charakterisiertes Hypertonie-Modell mit selektiver, transgener Renin-Überexpression. Ausgangshypothese der Arbeiten von Kelly et al. war, dass eine verstärkte renale Renin-Expression den Ausprägungsgrad der DN verstärkt. Dies wurde aus den Therapieerfolgen der stufenweisen Hemmung von RAS-Komponenten (siehe oben) deutlich.

Die Arbeitsgruppe zeigte, dass die transgenen Renin-Ratten, im Vergleich zur Gruppe ohne Hyperglykämie, eine deutlich ausgeprägtere DN mit signifikant erhöhter Albuminurie und Glomerulosklerose bei verminderter GFR aufwiesen. Ein Vergleich zu nichttransgenen diabetischen Ratten lässt die Studie jedoch nicht zu. Ferner wurde von Mullins et al.¹⁵⁰ das von Kelly verwendete Rattenmodell der Renin-Überexpression untersucht (nichttransgene Tiere verglichen mit transgenen unter der Prämisse der Hypertonieausbildung) und ebenso eine differentielle, transkriptionelle Gegenregulation einzelner (RAS-) Komponenten gesehen, für die sich in unserem ET-Modell auch Hinweise finden (siehe ET-1-mRNA-Expression).

Prinzipiell wäre unser Versuchsansatz jedoch in der Lage gewesen, bei entsprechender pathophysiologischer Bedeutung des ET-2 für die DN, diese auch aufzuzeigen. Es liegt hier der Schluss nahe, dass das ET-System eine weniger wichtige Rolle für die Pathogenese der DN spielt als das Renin-Angiotensin-System (siehe 5.6).

5.6 Therapeutische Ausblicke

Die aktuellen Ansätze in der Behandlung der DN verlangsamen die Progression der DN, können aber ihr Fortschreiten auch bei bestmöglicher RAS-Hemmung nicht aufhalten. Es gibt einen hohen Bedarf an neuen, additiv wirksamen Therapiestrategien. Hemmer des Endothelin-Systems sind derzeit in intensiver experimenteller und klinischer Testung. Dabei gibt es verschiedene Wege, das Endothelin-System pharmakologisch zu hemmen. Hierzu gehören zum einen Blocker der ET-Rezeptoren und zum anderen Inhibitoren des Endothelin-Converting-Enzymes.

Bei den ET-R-Blockern unterscheidet man gemischte ET_A-R/ ET_B-R-Antagonisten sowie selektive ET_A-R- oder ET_B-R-Antagonisten. Tierexperimentelle Arbeiten zur nichtselektiven pharmakologischen ET-Rezeptor Blockade haben verringerte renale und systemische Vasokonstriktion sowie proliferative Effekte beider Rezeptoren gezeigt^{82, 93}. Andere Autoren fanden hingegen trotz vergleichbarer Reduktion des systemischen Blutdrucks durch ET-Rezeptorblockade bzgl. der Nierenfunktion bei DN keinen protektiven Effekt⁹.

Selektive ET_A-R Blocker verringern lokale Vasokonstriktion sowie Zell- und Matrixproliferation^{44, 107}, was in diversen Tiermodellen gezeigt wurde. Eine Blockade bewirkt außerdem antiproteinurische Effekte⁷⁰, und vermindert die Angiotensin-vermittelte ET-1-Expression *in vitro*¹⁵¹. Ferner reduziert die Rezeptorblockade die Mikroalbuminurie und TGF- β -Urinausscheidung. Obwohl Marker für oxidativen Stress (H₂O₂, Thiobarbitursäurederivate) nicht reduziert werden, verlangsamt sich die Progression der DN über bisher unbekannte anti-inflammatorische Mechanismen (nachweislich verminderte Makrophageninfiltration)¹²⁹. Im NOD-Maus Diabetesmodell wurde durch ET_A-R Blockade der Beginn der Hyperglykämie hinausgezögert und die hyperglykämiebedingt-verringerte ECE Genexpression (Verringerung: ECE-1 ca.50%; ECE-2 ca.90%) in der Niere normalisiert¹⁵².

Studien beim Menschen lassen auf eine ET_A-R vermittelte Hemmung der Insulinsensitivität und eine renale Vasokonstriktion (afferente und efferente Arteriole) schließen. Dieses kann Plättchenaggregation und Mikrothrombenbildung in Kapillaren begünstigen. Es resultiert eine Zirkulationsstörung. Ferner wird der ET_A-R in Tubuluszellen bei diabetischer Stoffwechsellage vermehrt exprimiert. Es wird eine ET_A-R vermittelte zytoskelttale Schädigung und Apoptoseinduktion von Podozyten vermutet⁷⁴. Auch konnten andere Untersucher keinen Vorteil eines selektiven ET_A-R

Blockers gegenüber ACE-Inhibitoren bezüglich Podozytenverlustes und histopathologischen Podozytenschadens finden⁹.

Problematisch sind die möglichen Nebenwirkungen der Substanzen (Lebertoxizität: ALAT/ASAT ↑, Kopfschmerzen, teratogene Effekte)⁵⁷. Zudem verringern ET-R Blocker die ET-1 induzierte Kontraktion der Mesangialzellen, über eine dadurch gesteigerte Filtrationsfläche wird die Albuminurie verstärkt¹⁴⁷.

Diese teilweise konträren Ergebnisse könnten auf den ersten Blick die Schlussfolgerung erlauben (siehe 5.5), dass die Hemmung des Endothelin-Systems nur wenig Erfolg verspricht, den Verlauf von humaner DN günstig beeinflussen zu können. Dieses ist aber wahrscheinlich nicht zwangsläufig richtig. Die vorhandenen ET-Antagonisten greifen an sehr unterschiedlichen Orten in ein Gleichgewicht von günstigen und ungünstigen Endothelineffekten ein. Vielversprechend sind derzeit Ergebnisse zur selektiven ET_A-R Blockade. Sie erlaubt die Verminderung der renalen vasokonstriktiven Effekte des ET, während die vasodilatierenden Wirkungen des ET_B-R via NO erhalten bleiben^{7, 87, 93}. Kürzlich wurde eine randomisierte, Placebo-kontrollierte, doppel-blinde Dosisfindungsstudie für den ET_A-R-selektiven Blocker Avosentan (SPP301; Speedel, Basel) bei 286 Patienten mit DN und Makroalbuminurie veröffentlicht. Alle Patienten waren zuvor und während der Studie mit Standarddosierungen von ACE-Hemmern oder AT-1 Blockern behandelt. Mit dieser add-on-Therapie konnte über 12 Wochen bei allen Avosentan-Dosierungen (5, 10, 25 und 50 mg / Tag) signifikante Verringerungen in der Albuminurie erzielt werden. Diese lagen im Mittel in der Größenordnung von -16,3% bis -29,9%. In der Placebo-behandelten Gruppe stieg die Albuminurie im Vergleichszeitraum im Mittel um 35,5% an. Veränderungen der Kreatinin-Clearance und des systolischen Blutdruckes wurden nicht beobachtet¹⁵³. Diese Ergebnisse sind vielversprechend und bilden die Grundlage für eine geplante große klinische Outcome-Studie mit Avosentan bei Patienten mit DN. Sie weisen wiederum auf eine gewisse doch vorhandene pathophysiologische Bedeutung des Endothelinsystems hin und konterkarieren teilweise Studienergebnisse anderer Autoren (siehe oben).

Unsere Untersuchungen zeigen, dass der Verlauf und der Ausprägungsgrad einer DN im Rattenmodell in Gegenwart von ET-2-Überexpression nicht aggraviert wird. Dies bedeutet jedoch nicht automatisch eine fehlende „Beteiligung“ des ET-Systems in der Entstehung der DN, sondern kann auch durch eine kompliziertere Regulation von Hormon und Rezeptor erklärt werden. Zum einen kann man sich vorstellen, dass die ET-2-Überexpression zu einer balancierten Stimulation beider ET-Rezeptoren führt, die

sich in ihrer Gesamtwirkung dann aufheben. Zum anderen scheint die mit dem Modell versuchte Überexpression des humanen ET-2 im Rattenmodell zur endogenen Überexpression von Ratten-ET-1 und sowohl des ET_A- als auch ET_B-Rezeptors zu führen. Somit kann hier kein Nettoeffekt erzielt werden. Studien der pharmakologisch selektiven ET_A-Rezeptorblockade (u.a. auch Wenzel et al.¹⁵³) bringen hingegen ein Rezeptorgleichgewicht „durcheinander“ und stellen einen vielversprechenden Therapieansatz dar. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind im Einklang mit der Beobachtung, dass die gemischte Endothelin-Rezeptorhemmung bei DN weniger nephroprotektiv zu sein scheint als die selektive ET_A-Rezeptorblockade.

Im Hinblick auf den späteren möglichen klinischen Einsatz wird die Frage von besonderer Bedeutung sein, ob der gewählte Weg der pharmakologischen ET-Hemmung additiv zur RAS-Blockade (add-on) sein wird. Da die pathophysiologischen Endstrecken ähnlich sind (gehemmte Vasokonstriktion) und das ET mit dem RAAS in engem Zusammenhang steht, scheint eine kombinierte Blockade von ET-R und ACE zunächst nicht unbedingt sinnvoll. So zeigten *in vitro* Versuche an Mesangialzellen, dass Angiotensin II und ET-1 ähnliche Effekte haben (Vasokonstriktion, Proliferation der EZM, Fibronektin-/ Kollagensynthesesteigerung, Zytokinfreisetzung). Insofern ist eine Therapie mit ACE-Inhibitoren (siehe oben) sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen durch verminderte ANG II Bildung und Reduktion des glomerulären Filtrationsdruckes wirksam. Proteinurie und Fibrose werden reduziert, Endothelin Spiegel werden darüber hinaus reduziert⁸⁴.

6 Zusammenfassung

Fragestellung: Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselkrankheit mit weltweit zunehmender Prävalenz. In Deutschland sind ca. 7–8 % der Erwachsenenbevölkerung betroffen, ca. ein Drittel entwickeln renale Manifestationen im Sinne einer diabetischen Nephropathie. Die bisherigen Ergebnisse zur pathophysiologischen Bedeutung des Endothelin-Systems für die diabetische Nephropathie sind inkonsistent, teilweise sogar widersprüchlich. In dieser Promotionsarbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass eine verstärkte renale Endothelin-Expression den Ausprägungsgrad von diabetischer Nephropathie verstärkt.

Methoden: Um die Hypothese zu prüfen, wurde in einem Rattenmodell mit transgener Überexpression von humanem Endothelin-2 (h-endoET-2) eine diabetische Stoffwechsellage mittels Streptozotizin-Injektion induziert und der Verlauf über insgesamt 6 Monate beobachtet. Als Kontrolle bzw. Vergleichspunkt dienten nichtdiabetische transgene Geschwistertiere und nichttransgene Tiere mit und ohne Diabetesinduktion (insgesamt 4 Versuchsgruppen). Alle 4 Wochen wurden Blutzucker, Plasmakreatinin, Plasmaharnstoff, 24 h-Albuminurie und 24 h-Proteinurie sowie Kreatinin- und Harnstoffclearances berechnet bzw. gemessen. Nach 6 Monaten Versuchsdauer wurde der systolische Blutdruck gemessen, die Tiere getötet und die Nierengewichte bestimmt. Im Plasma und in glomerulären Kulturüberständen wurden die Endothelin-Konzentrationen per ELISA gemessen. Mittels Computer-gestützter Histomorphometrie wurde das glomeruläre Volumen und der Glomerulosklerosegrad erfasst. Aus den Nieren wurden die Glomeruli isoliert und glomeruläre mRNA-Expression von ET-1, ET-2, ET-Rezeptoren (A/B), Fibronectin, TGF- β und PAI-1 (quantitative PCR) und Proteinexpression von Fibronectin, TGF- β und PAI-1 (ELISA) bestimmt.

Ergebnisse: Die Zuordnung der Versuchstiere zu den 4 Gruppen entsprechend diabetisch/ nichtdiabetisch und transgen/ nichttransgen wurde durch Blutzuckerbestimmungen und renalen DNS-Nachweis von humanem Endothelin-2 bestätigt. Bei transgenen ET-2-Tieren dokumentierten erhöhte ET-Konzentrationen im Plasma und den glomerulären Kulturüberständen die aktive Synthese des Transgens.

Die Hyperglykämie führte zu einer weiteren Erhöhung der ET-Plasmaspiegel ohne die glomeruläre ET-Produktion weiter zu verändern. Im Versuchsverlauf starben 12% der diabetischen Wildtyp-Tiere und 55% der diabetischen ET-2-transgenen Tiere, ohne dass dieses auf eine renale Funktionseinschränkung zurückführbar war. Der systolische Blutdruck war in allen Gruppen vergleichbar und nicht signifikant unterschiedlich.

In den Wildtyp-Tieren führte die diabetische Stoffwechsellage zu signifikanten Anstiegen von Proteinurie, Albuminurie, Nierengewicht und glomerulärem Volumen, glomerulärer Matrixakkumulation und Fibronektinexpression sowie erhöhter Harnstoffclearance als Zeichen der diabetischen Nephropathie. In den nicht-diabetischen ET-2-transgenen Tieren fanden sich signifikante Anstiege von Proteinurie und Albuminurie sowie leicht verstärkter glomerulärer Hypertrophie und Sklerose. In den diabetischen ET-2-transgenen Tieren fanden sich signifikante Erhöhungen von Albuminurie, Nierengewicht, glomerulärer Hypertrophie und Sklerose sowie der Harnstoff-Clearance, jedoch ohne, dass diese in ihren Relationen über die Veränderungen bei den diabetischen Wildtyp-Tieren hinausgingen. Die endogene Ratten-ET-1-mRNA-Expression war bei den ET-2-transgenen nichtdiabetischen Tieren signifikant erhöht. Signifikante Veränderungen der ET-Rezeptor-mRNA in Gegenwart von Hyperglykämie und/oder ET-2-Überexpression wurden nicht beobachtet.

Schlussfolgerungen: Die Kombination von transgener Endothelin-2-Überexpression und Hyperglykämie führt in diesem Tiermodell zu keiner verstärkten Ausprägung von diabetischer Nephropathie bei der Ratte. Unsere Ausgangshypothese konnte somit nicht bestätigt werden. Der gewählte Versuchsansatz gibt neue Einblicke in die Rolle von Endothelin in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie. Man kann spekulieren, dass hier das Endothelinsystem im Vergleich zum Renin-Angiotensin-System eine weniger bedeutsame Funktion einnimmt. Die Ergebnisse sind im Einklang mit Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass die selektive ET_A-Rezeptorblockade einer gemischten Endothelin-Rezeptorhemmung überlegen ist.

7 Literaturnachweis

1. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21:220-29
2. Lippert J, Ritz E, Schwarzenbeck A, Schneider P. The rising tide of endstage renal failure from diabetic nephropathy type II-an epidemiological analysis. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10:462-467
3. Ritz E, Kleopas W. Terminale Niereninsuffizienz-Spätkomplikation des Diabetes. *Cardiovasc* 2002; 2(4):26-31
4. European Dialysis and Transplant Association. Report on management of renal failure in Europe, XXVI, 1995. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:Suppl 7:1-32
5. Takahashi K, Ghatei MA, Lam HC, O'Halloran DJ, Bloom SR. Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologica* 1990;33(5):306-10
6. Schneider JG, Tilly N, Hierl T et al. Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus. *Am J Hypertens* 2002; 15:967-72
7. Benigni A, Colosio V, Brena C, Bruzzi I, Bertani T, Remuzzi G. Unselective inhibition of endothelin receptors reduces renal dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes* 1998; 47:450-56
8. Cosenzi A, Bernobich E, Trevisan R, Milutinovic N, Borri A, Bellini G. Nephroprotective effect of bosentan in diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42(6):752-6
9. Gross ML, El-Shakmak A, Szabo A et al. ACE-inhibitors but not endothelin receptor blockers prevent podocyte loss in early diabetic nephropathy. *Diabetologica* 2003; 46:856-68
10. Alberti KGMM, Zimmet PZ for the WHO Consultation Group. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part I: Diagnosis and classifications of diabetes mellitus. Provisorial report of a WHO consultation. *Diab Med* 1998; 15:539-553
11. Hasslacher C, Ritz E, Wahl P, Michael C. Similar risks of nephropathy in patients with type I or type II diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 1989;4:859-63
12. Wrenger E, Neumann KH, Lehnert H. Diagnostik und Therapie der diabetischen Nephropathie. *Der Urologe* 2003; 42(2):W269-84
13. Krolewski AS, Canessa M, Warram H et al. Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1988; 318(3):140-5
14. Derby L, Warram JH, Laffel LM, Krolewski AS. Elevated blood pressure predicts the development of persistent proteinuria in the presence of poor glycemic control, in patients with type I diabetes. *Diab Metab* 1989; 15(5 Pt 2):320-6
15. Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999; 341(15):1127-33
16. Peters AL, Davidson MB, Schriger DL, Hasselblad V. A clinical approach for the diagnosis of diabetes mellitus: an analysis using glycosylated hemoglobin levels. Meta-analysis Research Group on the Diagnosis of Diabetes Using Glycated Hemoglobin Levels. *JAMA* 1996; 16;276(15):1246-52
17. Hien P, Böhm B Hrsg. *Diabetes-Handbuch*. Springer 2005
18. Cooper ME. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologica* 2001; 44:1957-72
19. Nawroth PP Hrsg. *Kompendium Diabetologie*. Springer 1999

20. Brito PL, Fioretto P, Drummond K et al. Proximal tubular basement membrane with in insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 1998; 53(3):754-61
21. Thomson SC, Vallon V, Blantz RC. Kidney function in early diabetes: the tubular hypothesis of glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286:F8-15
22. Vallon V, Richter K, Blantz RC, Thomson S, Osswald H. Glomerular hyperfiltration in experimental diabetes mellitus: potential role of tubular reabsorption. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2569-76
23. Hostetter TH, Troy JL, Brenner BM. Glomerular haemodynamics in experimental diabetes mellitus *Kidney Int* 1981;19:410-15
24. Bank N, Aynedjian HS. Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney Int* 1993; 43(6):1306-12
25. Chen S, Khan AZ, Cukiernik M, Chakrabarti S. Differential activation of NF- κ B and AP-1 in increased fibronectin synthesis in target organs of diabetic complications. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284:1089-97
26. Rossert J, Terraz-Durasnel C, Brideau G. Growth factors, cytokines, and renal fibrosis during the course of diabetic nephropathy. *Diabetes Metab* 2000; 26(7) Suppl 4:16-24
27. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF- β by anti-TGF- β antibody attenuates kidney hypertrophy and enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 1996; 45:522-30
28. Kelly DJ, Aaltonen P, Cox AJ et al. Expression of the slit-diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy: differing effects of anti-proteinuric therapies. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:1327-32
29. Toyoda M, Suzuki D, Umezono T et al. Expression of human nephrin mRNA in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(2):380-5
30. Yard BA, Chorianopoulos E, Herr D, Fokko J van der Woude. Regulation of endothelin-1 and transforming growth factor- β 1 production in cultured proximal tubular cells by albumin and heparan sulphate glycosaminoglycans. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:1769-75
31. Gilbert RE, Cooper ME. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of Glomerularinjury? *Kidney International* 1999; 56:1627-37
32. Zimpelmann J, Kumar D, Levine DZ et al. Early diabetes mellitus stimulates proximal tubule renin mRNA expression in the rat. *Kidney Int* 2000; 58(6):2320-30
33. Kelly DJ, Wilkinson-Berka JL, Allen TJ, Cooper ME, Skinner SL. A new model of diabetic nephropathy with progressive renal impairment in the transgenic (mRen-2)27 rat (TGR). *Kidney Int* 1998; 54(2):343-52
34. Liefeldt L, Böcker W, Schönfelder G, Zintz M, Paul M . Regulation of the endothelin system in transgenic rats expressing the human endothelin-2 gene. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26 Suppl 3:32-3
35. Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM et al. Advanced glycation endproducts cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest* 2001; 108:1853-63
36. Zoja C, Benigni A, Remuzzi G. Cellular responses to protein overload: key event in renal disease progression. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004; 13(1):31-7
37. Auer J, Berent R, Weber T, Eber B. Clinical significance of pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *Curr Med Chem* 2002; 9:1831-50
38. UK Prospective Diabetes Study Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylurease or insulin compared with conventional treatment and risk of

- complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352:837-53
39. Hasslacher C. Diabetische Nephropathie-Klassifikation, Diagnose, Prävention. *Cardiovasc* 2002
 40. ACCORD-Studie, *arzneimittel-telegramm* 2008; 39:18-19
 41. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Eng J Med* 1993; 329:1456-62
 42. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Eng J Med* 2001; 345:861-69
 43. Mogensen CE, Viberti G, Halimi S et al. Effect of Low-Dose Perindopril/Indapamide on Albuminuria in Diabetes Preterax in Albuminuria Regression: PREMIER. *Hypertension* 2003; 41:1063-1071
 44. Ellis EN, Good BH. Prevention of Glomerular basement membrane thickening by aminoguanidine in experimental diabetes mellitus. *Metabolism* 1991; 40(10):1016-9
 45. Kelly DJ, Gilbert RE, Cox AJ, Soulis T, Jerums G, Cooper ME. Aminoguanidine ameliorates overexpression of prosclerotic growth factors and collagen deposition in experimental diabetic nephropathy *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(10):2098-107
 46. Forbes JM, Cooper ME, Thallas V et al. Reduction of the accumulation of advanced glycation end products by ACE inhibition in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes* 2002; 51(11):3274-82
 47. Evan AP, Mong SA, Gattone VH, Connors BA, Aronoff GR, Luft FC. The effect of streptozotocin and streptozotocin-induced diabetes on the kidney. *Ren Physiol* 1984; 7(2):78-89
 48. Hirose K, Osterby R, Nozawa M, Gundersen HJ. Development of Glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat. *Kidney Int* 1982; 21(5):689-95
 49. Hocher B, Liefeldt L, Thöne-Reinecke C et al. Characterization of the renal phenotype of transgenic rats expressing the human endothelin-2 gene, *Hypertension* 1996; 28(2):196-201
 50. Paul M, Wagner J. Transgenic rats: New experimental models for the study of candidate genes in hypertension research. *Annu Rev Physiol* 1994; 56:811-29
 51. Liefeldt L, Schonfelder G, Bocker W et al. Transgenic rats expressing the human ET-2 gene: a model for the study of endothelin actions in vivo. *J Mol Med.* 1999:565-74
 52. Hocher B, Thöne-Reinecke C, Rohmeiss P et al. Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest* 1997; 99(6):1380-89
 53. Hunley TE, Kon V. Update on endothelin-biology and clinical implications. *Pediatr Nephrol* 2001; 16:752-62
 54. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 322:411-15
 55. Inoue A Yanagisawa M et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:2863-7
 56. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S et al. The human preproendothelin-1 gene: complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem* 1989; 264(25):14954-59

57. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension investigators. *N Engl J Med* 1998; 338:784-90
58. Kohno M, Yasunari K, Yokokawa K et al. Interaction of adrenomedullin and platelet-derived growth factor on rat mesangial cell production of endothelin. *Hypertension*. 1996; 27:663-7
59. Shimada K, Matsushita Y, Wakabayashi K et al. Cloning and functional expression of human endothelin-converting enzyme cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 207:807-12
60. Valdenaire O, Richards JG, Faull RLM, Schweizer A. XCE, a new member of the endothelin-converting enzyme and endopeptidase family, is preferentially expressed in the CNS. *Mol Brain Res* 1999; 64:211-21
61. Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy J et al. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter. *Eur J Biochem* 1999; 264:341-49
62. Ortmann J, Nett PC, Celeiro J et al. Downregulation of renal endothelin-converting enzyme 2 expression in early autoimmune diabetes. *Exp Biol Med* 2006; 231(6):1030-3
63. Thone-Reinicke C, Simon K, Richter CM et al. Inhibition of Both Neutral Endopeptidase and Endothelin-Converting Enzyme by SLV306 Reduces Proteinuria and Urinary Albumin Excretion in Diabetic Rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44:76-9
64. Iwasaki S, Homma T, Matsuda Y, Kon V. Endothelin receptor subtype B mediates autoinduction of endothelin-1 in rat mesangial cell. *J Biol Chem* 1995; 270:6997-7003
65. Fukui M, Nakamura T, Ebihara I et al. Gene expression for endothelins and their receptors in glomeruli of diabetic rats. *J Lab Clin Med* 1993;122(2):149-56
66. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and Characterization of an Endothelin-3 specific receptor from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 1993; 268(25):19126-33
67. Simonson MS, Wann S, Mene P et al. Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 708-12
68. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348(6303):732-35
69. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348(6303):730-32
70. Tsukahara H, Ende H, Magazine HI, Bahou WF, Goligorsky MS. Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective ETB receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269(34):21778-85
71. Goligorsky MS, Tsukahara H, Magazine H, Andersen TT, Malik AB, Bahou WF. Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide. *J Cell Physiol* 1994; 158(3):485-94
72. Puffenberger EG, Hosada K, Washington SS et al: A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's-disease. *Cell* 1994; 79:1257-66

73. Baynash AG, Hosoda K, Giaid A et al. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 1994; 79(7):1277-85
74. Iwasaki S, Homma T, Kon V. Site specific regulation in the kidney of endothelin and its receptor subtypes by cyclosporine. *Kidney Int* 1994; 45:592-97
75. Rabelink TJ, Stroes ESG, Bouter KP, Morrison P. Endothelin blockers and renal protection: a new strategy to prevent end-organ damage in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 1998; 39:543-49
76. Herman WH, Emancipator SN, Rhoten RLP, Simonson MS. Vascular and Glomerular expression of endothelin-1 in normal human kidney. *Am J Physiol* 1998; 275(Renal Physiol 44):F8-F17
77. Kohan DE. The renal medullary endothelin system in control of sodium and water excretion and systemic blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15(1):34-40
78. Ge Y, Bagnall A, Stricklett PK et al. Collecting duct-specific knockout of the endothelin B receptor causes hypertension and sodium retention. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291(6):F1274-80
79. Ong AC Jowett TP, Firth JD, Burton S, Karet FE, Fine LG. An endothelin-1 mediated autocrine growth loop involved in human renal tubular regeneration. *Kidney Int* 1995; 48(2):390-401
80. Orisio S, Benigni G, Bruzzi I et al. Renal endothelin-gene expression is increased in remnant kidney and correlates in rats with reduced kidney mass. *Kidney Int* 1993; 43:354-58
81. Zoja C, Morigini M, Figliuzzi M 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):934-41
82. Jandeleit-Dahm K, Allen TJ, Youssef S, Gilbert RE, Cooper ME. Is there a role for endothelin antagonists in diabetic renal disease? *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2000; 2:15-24
83. Wendel M, Knels L, Kummer W, Koch T. Distribution of endothelin receptor subtypes ETA and ETB in the rat kidney. *J Histochem Cytochem* 2006; 54(11):1193-203
84. Ruiz-Ortega M, Gomez-Garre D, Alcazar R et al. Involvement of ANG II and endothelin in matrix protein production and renal sclerosis. *J Hypertens Suppl* 1994; 12(4) :51-8
85. Scholz H, Krämer BK, Hamann M, Götz KH, Kurtz A. Effects of endothelins on renin secretion from rat kidneys. *Acta Physiol Scand* 1995; 155(2):173-82
86. Ferri C, Pittoni V, Piccoli A et al. Insulin stimulates endothelin-1 secretion from human endothelial cells and modulates its circulation levels in vivo. *J Clin Endocrin Metab*. 1995; 80(3):829-35
87. Khan MA, Dashwood MR, Mumtaz FH, Thompson CS, Mikhailidis DP, Morgan RJ. Upregulation of endothelin a receptor sites in the rabbit diabetic kidney: Potential relevance to the early pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nephron* 1999; 83:261-267
88. Ahlborg G, Lindstrom J. Insulin sensitivity and bigET-1 conversion to ET-1 after ETA- or ETB-receptor blockade in humans. *J Appl Physiol* 2002; 93(6):2112-21
89. Bruzzi I, Remuzzi G, Benigni A. Endothelin: a mediator of renal disease progression. *J Nephrol* 1997; 10(4):179-83

90. Magdolen V, Arroyo de Prada N, Sperl S et al. Natural and synthetic inhibitors of the tumor-associated serine protease urokinase-type plasminogen activator. *Adv Exp Med Biol* 2000; 477:331-41
91. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res* 1979; 7(6):1513-23
92. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156-9
93. Hocher B, Schwarz A, Reinbacher D et al. Effects of endothelin receptor antagonists on the progression of diabetic nephropathy. *Nephron* 2001; 87:161-69
94. Nakamura T, Ebihara I, Fukui M et al. Modulation of Glomerularendothelin and endothelin receptor gene expression in aminonucleoside-induced nephrosis. *J Am Soc Nephrol* 1995; 5(8):1585-90
95. Sorokin A, Kohan DE. Physiology and pathology of endothelin-1 in renal mesangium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285(4):F579-89
96. Dhein S, Hochreuther S, Bollig K, Hufnagel C, Raschack M. Long-term effects of the endothelin(A) receptor antagonist LU 135252 and the angiotensin-converting enzyme inhibitor trandolapril on diabetic angiopathy and nephropathy in a chronic type I diabetes mellitus rat model. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293(2):351-9
97. Bäcklund T, Palojoki E, Grönholm T et al. Dual inhibition of angiotensin converting enzyme and neutral endopeptidase by omapatrilat in rat in vivo. *Pharmacol Res* 2001; 44(5):411-8
98. Lane PH, Steffes MW, Mauer SM. Estimation of glomerular volume: a comparison of four methods. *Kidney Int* 1992; 41(4):1085-9
99. Elias D, Marcus H, Reshef T, Ablamunits V, Cohen IR. Induction of diabetes in standard mice by immunization with the p277 peptide of a 60-kDa heat shock protein. *Eur J Immunol* 1995; 25(10):2851-7
100. Buschard K, Josefsen K, Horn T, Fredman P. Sulphatide and sulphatide antibodies in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1993; 342(8875):840.
101. Ylinen L, Teros T, Liukas A et al. The role of lipid antigen presentation, cytokine balance, and major histocompatibility complex in a novel murine model of adoptive transfer of insulinitis. *Pancreas* 2000; 20(2):197-205
102. Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967; 126(1):201-5
103. Phillips A, Janssen U, Floege J. Progression of diabetic nephropathy. Insights from cell culture studies and animal models. *Kidney Blood Press Res* 1999; 22(1-2):81-97
104. McNeill JH. *Experimental models of diabetes*. CRC Press 1999; 418pp
105. Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med* 1976 May; 119(1):85-90
106. Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA, Morton NM, Davenport M. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* 1997; 46(2):313-6
107. Webb DJ, Monge JC et al. Endothelin: new discoveries and rapid progress in the clinic. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19:5-8
108. Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H et al. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 1994; 368(6473):703-10
109. Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA et al. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 1994; 79(7):1267-76

110. Firth JD, Ratcliffe PJ. Organ Distribution of the Three Rat Endothelin Messenger RNAs and the Effects of Ischemia on Renal Gene Expression. *J Clin Invest.* 1992;90 Sept:1023-1031
111. Bloch KD, Hong CC, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2. *Genomics* 1991; 10(1):236-42
112. Barton M, Lattmann T, d'Uscio LV, Lüscher TF, Shaw S. Inverse regulation of endothelin-1 and nitric oxide metabolites in tissue with aging: implications for the age-dependent increase of cardiorenal disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36(5 Suppl 1):S153-6
113. Chen H, Brahmabhatt S, Gupta A, Sharma AC. Duration of streptozotocin-induced diabetes differentially affects p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation in renal and vascular dysfunction. *Cardiovasc Diabetol* 2005; 5;4(1):3
114. Itoh Y, Imamura S, Yamamoto K et al. Changes of endothelin in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of an angiotensin converting enzyme inhibitor, enalapril maleate. *J Endocrin* 2002;175:233-39
115. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* 1986; 77(6):1925-30
116. Pfab T, Thöne-Reineke C, Theilig F et al. Diabetic endothelin B receptor-deficient rats develop severe hypertension and progressive renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(4):1082-9
117. Ross J, Goldman JK. Effect of streptozotocin-induced diabetes on kidney weight and compensatory hypertrophy in the rat. *Endocrinology* 1971; 88(4):1079-82
118. Seyer-Hansen K. Renal hypertrophy in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Sci Mol Med Suppl* 1976; 51(6):551-5
119. Romen W, Takahashi A. Autoradiographic studies on the proliferation of Glomerular and tubular cells of the rat kidney in early diabetes. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1982; 40(3):339-45
120. Gross ML, Ritz E, Schoof A et al. Comparison of renal morphology in the Streptozotocin and the SHR/N-cp models of diabetes. *Lab Invest* 2004; 84(4):452-64
121. Mayhew TM, Sharma AK, McCallum KN. Effects of continuous subcutaneous insulin infusion on renal morphology in experimental diabetes. I. Blood glucose levels, body size, kidney weight and glomerulotubular morphometry. *J Pathol* 1987; 151(2):147-55
122. Ayo SH, Radnik RA, Garoni JA, Glass WF, Kreisberg JI. High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. *Am J Pathol* 1990; 136(6):1339-48. Erratum in: *Am J Pathol* 1990; 137(2):preceding 225
123. Ruster C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(11):2985-2991
124. Chang JM, Chiu YW, Tsai JC, Chen HC. Effects of endothelin-1 on thymidine uptake and fibronectin production of diabetic glomeruli. *Nephrology (Carlton)* 2007; 12(1):62-6
125. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000; 342(24):1792-801
126. Manjunath G, Sarnak MJ, Levey AS. Estimating the Glomerular filtration rate. Dos and don'ts for assessing kidney function. *Postgrad Med* 2001; 110(6):55-62

127. Krolewski AS, Laffel LM, Krolewski M, Quinn M, Warram JH. Glycosylated hemoglobin and the risk of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med* 1995;332:1251-1255
128. Ortmann J, Amann K, Brandes R et al. Role of podocytes for reversal of glomerulosclerosis and proteinuria in the aging kidney after endothelin inhibition. *Hypertension* 2004; 44(6):974-81
129. Sasser JM, Sullivan JC, Hobbs JL et al. Endothelin A receptor blockade reduces diabetic renal injury via an anti-inflammatory mechanism. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(1):143-54
130. Schnack C, Schernthaner G. Angiotensin II type-1 receptor antagonists and diabetes mellitus. *Wien Med Wochenschr* 2001; 151(7-8):165-8
131. Bank N, Aynedjian HS. Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney Int* 1993; 43(6):1306-12
132. Goligorsky MS, Tsukahara H, Magazine H, Andersen TT, Malik AB, Bahou WF. Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide. *J Cell Physiol* 1994;158(3):485-94
133. Hirata K, Kikuchi S, Saku K et al. Apolipoprotein(a) phenotypes and serum lipoprotein(a) levels in maintenance hemodialysis patients with/without diabetes mellitus. *Kidney Int* 1993; 44(5):1062-70
134. Jougasaki M, Schirger JA, Simari RD, Burnett JC Jr. Autocrine role for the endothelin-B receptor in the secretion of adrenomedullin. *Hypertension* 1998; 32(5):917-22
135. Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H et al. Effects of hypertension, diabetes mellitus, and hypercholesterolemia on endothelin type B receptor-mediated nitric oxide release from rat kidney. *Circulation* 1999; 9;99(9):1242-8
136. Ling GY, Cao WH, Onodera M et al. Renal sympathetic nerve activity in mice: comparison between mice and rats and between normal and endothelin-1 deficient mice. *Brain Res* 1998; 19;808(2):238-49
137. Fink G, Li M, Lau Y, Osborn J, Watts S. Chronic activation of endothelin B receptors: new model of experimental hypertension. *Hypertension* 2007; 50(3):512-8
138. Pfab T, Thöne-Reineke C, Theilig F et al. Diabetic endothelin B receptor-deficient rats develop severe hypertension and progressive renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(4):1082-9
139. Shindo T, Kurihara H, Maemura K et al. Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1. *J Mol Med* 2002; 80(2):105-16
140. Shin SJ, Lee YJ, Lin SR, Tan MS, Lai YH, Tsai JH. Decrease of renal endothelin 1 content and gene expression in diabetic rats with moderate hyperglycemia. *Nephron* 1995; 70(4):486-93
141. Hargrove GM, Dufresne J, Whiteside C, Muruve DA, Wong NC. Diabetes mellitus increases endothelin-1 gene transcription in rat kidney. *Kidney Int* 2000; 58(4):1534-45
142. Awazu M, Sugiura M, Inagami T, Ichikawa I, Kon V. Cyclosporine promotes Glomerularendothelin binding in vivo. *J Am Soc Nephrol* 1991; 1(11):1253-8
143. Lovell HG. Angiotensin converting enzyme inhibitors in normotensive diabetic patients with microalbuminuria. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; (2):CD002183
144. Rossing P, Tarnow L, Boelskifte S, Jensen BR, Nielsen FS, Parving HH. Differences between nisoldipine and lisinopril on glomerular filtration rates and

- albuminuria in hypertensive IDDM patients with diabetic nephropathy during the first year of treatment. *Diabetes* 1997; 46(3):481-7
145. Rossing K, Christensen PK et al. Dual blockade of the renin-angiotensin system in diabetic nephropathy: a randomized double-blind crossover study. *Diabetes care* 2002; 25:95-100
 146. Ontarget-Investigators (2008) Yusuf S, Teo KK, Pogue J et al. Telmisartan, Ramipril, or Both in Patients at High Risk for Vascular Events. *N Engl J Med* 358: 1547–59
 147. Kelly DJ, Skinner SL, Gilbert RE, Cox AJ, Cooper ME, Wilkinson-Berka JL. Effects of endothelin or angiotensin II receptor blockade on diabetes in the transgenic (mRen-2)²⁷ rat. *Kidney Int* 2000; 57(5):1882-94
 148. Parving H-H, et al. Aliskiren Combined with Losartan in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *N Eng J Med* 2008; June 5, 358:2433-46
 149. Ganten D, Wagner J, Zeh K et al. Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 15;89(16):7806-10
 150. Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 1990; 5;344(6266):541-4
 151. Cao Z, Cooper ME, Wu LL et al. Blockade of the renin-angiotensin and endothelin systems on progressive renal injury. *Hypertension* 2000; 36(4):561-8
 152. Ortmann J, Nett PC, Celeiro J et al. Downregulation of Renal Endothelin-Converting Enzyme 2 Expression in Early Autoimmune Diabetes. *Exp Biol Med* 2006; 231:1030-33
 153. Wenzel RR, Littke T, Kuranoff S et al (SPP301 (Avosentan) Endothelin Antagonist Evaluation in Diabetic Nephropathy Study Investigators). Avosentan reduces albumin excretion in diabetics with macroalbuminuria. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(3):655-64

8 Danksagung

"Wer geduldig ist, der ist weise; wer aber ungeduldig ist, offenbart seine Torheit."

Sprüche Salomons 14,29

Danken möchte ich allen konkret und auch abstrakt Beteiligten insbesondere, aber nicht ausschließlich, für Ihre Geduld!

9 Lebenslauf

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

10 Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Johannes Manhart, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

>> Einfluss einer transgenen Überexpression von humanem Endothelin-2 (h-endoET-2)
auf die diabetische Nephropathie der Ratte<<

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt,
ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer
Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift