

Aus dem Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

---

**Nephroprotektive Effekte des Angiotensin II Rezeptor Agonisten  
Compound 21 im Modell der Anti-Thy1-induzierten chronisch-progressiven  
Glomerulosklerose der Ratte**

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

vorgelegt von

Daniel Brand

Tierarzt aus Mettingen

Berlin 2015

Journal-Nr.: 3557

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Achim Gruber, Ph.D.  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Harm Peters  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. a. D. Dr. Michael Schmidt

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

kidney diseases, angiotensin, glomerulopathy, rats, animal models, fibrosis,  
inflammation, tissue proliferation

[MeSH]:

receptor, angiotensin, type 2

Tag der Promotion: 19.03.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-581-7

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2015**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Meiner Familie



# 1 Inhaltsverzeichnis

<b><u>1</u></b>	<b><u>Inhaltsverzeichnis</u></b> .....	5
<b><u>2</u></b>	<b><u>Abkürzungsverzeichnis</u></b> .....	8
<b><u>3</u></b>	<b><u>Einleitung</u></b> .....	11
<b><u>4</u></b>	<b><u>Literaturübersicht</u></b> .....	12
4.1	Epidemiologie der chronischen Niereninsuffizienz .....	12
4.2	Mechanismen der chronischen Niereninsuffizienz .....	14
4.3	Der Transforming Growth Faktor-beta und sein Einfluss auf die CNI..	17
4.4	Histopathologisches Erscheinungsbild der CNI .....	18
4.5	Das Renin-Angiotensin-System .....	21
4.6	Angiotensin II .....	23
4.7	Die Angiotensin II-Rezeptoren .....	25
4.8	Therapieansätze der chronischen Niereninsuffizienz .....	27
4.9	Das Modell der Anti-Thy1-induzierten cGS der Ratte .....	28
4.10	Compound 21 .....	29
4.11	Fragestellung .....	29
<b><u>5</u></b>	<b><u>Material und Methoden</u></b> .....	30
5.1	Materialien .....	30
5.2	Tierversuch .....	30
5.2.1	Tiere .....	30
5.2.2	Tierhaltung .....	30
5.2.3	Futter und Trinkwasser .....	30
5.2.4	Wirkstoff und Wirkstoffzubereitung .....	31
5.2.5	Die Anti-Thy1-induzierte cGS der Ratte .....	31
5.3	Studienprotokoll .....	33
5.4	Versuchsparameter .....	34
5.4.1	Blutdruck .....	34
5.4.2	Urinsammlung .....	34
5.4.3	Tötung der Tiere .....	35

5.4.4	Blut- und Organentnahme .....	35
5.4.5	Aufarbeitung der Proben .....	36
<b>5.5</b>	<b>Krankheitsparameter</b> .....	36
5.5.1	Messung der Proteinurie.....	36
5.5.2	Berechnung der glomerulären Filtrationsrate.....	37
<b>5.6</b>	<b>Histologie</b> .....	38
5.6.1	Einbettung und Anfertigung der histologischen Schnitte .....	38
5.6.2	PAS-Färbung.....	39
5.6.3	Immunhistologische Färbungen .....	40
5.6.4	TUNEL-Assay.....	42
5.6.5	Histologische Auswertung .....	42
<b>5.7</b>	<b>Analyse der mRNA</b> .....	43
5.7.1	Isolierung und Einstellung der mRNA .....	43
5.7.2	Reverse Transkription .....	45
5.7.3	RT-PCR-Analyse .....	45
5.7.4	Quantifizierung der RT-PCR Analyse .....	48
<b>5.8</b>	<b>Analyse der Proteine</b> .....	49
5.8.1	Isolierung und Einstellung der Proteine .....	49
5.8.2	Western Blot.....	50
<b>5.9</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	55
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	56
<b>6.1</b>	<b>Futteraufnahme und Größenwachstum</b> .....	56
<b>6.2</b>	<b>Blutdruck</b> .....	57
<b>6.3</b>	<b>Proteinurie</b> .....	58
<b>6.4</b>	<b>Parameter der Nierenfunktion</b> .....	60
6.4.1	Kreatininkonzentration des Serums .....	60
6.4.2	Harnstoffkonzentration des Serums .....	60
6.4.3	Glomeruläre Filtrationsrate .....	61
<b>6.5</b>	<b>Parameter der renalen Hypertrophie</b> .....	62
6.5.1	Organengewichte.....	62
6.5.2	Glomeruläre Fläche und glomeruläres Volumen .....	63
<b>6.6</b>	<b>Parameter der renalen Fibrose</b> .....	64

6.6.1	Matrixscore und immunhistologische Darstellung des Kollagen I .....	64
6.6.2	Relative TGF- $\beta$ 1, Fibronectin, Kol I, PAI-1 und TIMP-1 mRNS-Expression .....	69
6.6.3	Relative TGF- $\beta$ , Kol I und Fibronectin Protein-Expression .....	73
<b>6.7</b>	<b>Parameter der renalen Inflammation</b> .....	<b>76</b>
6.7.1	CD3- und ED1-positive Zellen .....	76
6.7.2	Relative IL 6, TNF- $\alpha$ und MCP-1 mRNS-Expression .....	80
<b>6.8</b>	<b>Parameter der renalen Proliferation und Apoptose</b> .....	<b>82</b>
6.8.1	PCNA- und TUNEL-positive Zellen.....	82
6.8.2	Relative $\alpha$ -SMA mRNS-Expression .....	87
6.8.3	Relative $\alpha$ -SMA Protein-Expression.....	87
<b>6.9</b>	<b>AT2-Rezeptor-Expression</b> .....	<b>88</b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>Diskussion</u></b> .....	<b>90</b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b> .....	<b>108</b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>Summary</u></b> .....	<b>111</b>
<b><u>10</u></b>	<b><u>Abbildungsverzeichnis</u></b> .....	<b>114</b>
<b><u>11</u></b>	<b><u>Tabellenverzeichnis</u></b> .....	<b>116</b>
<b><u>12</u></b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b> .....	<b>117</b>
<b><u>13</u></b>	<b><u>Danksagung</u></b> .....	<b>132</b>
<b><u>14</u></b>	<b><u>Selbstständigkeitserklärung</u></b> .....	<b>133</b>

## 2 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACTH	Adrenocorticotropin
AG	Arbeitsgruppe
AngII	Angiotensin II
ANP	atriale natriuretische Peptid
APC Zellen	Antigen präsentierenden Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
aqua dest.	destilliertes Wasser
AT1 Rezeptor	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor
AT1a Rezeptor	Angiotensin II Typ 1a Rezeptor
AT1b Rezeptor	Angiotensin II Typ 1b Rezeptor
AT2 Rezeptor	Angiotensin II Typ 2 Rezeptor
AVP	antidiuretisches Hormon
BCA	Bicinchoninicacid
C21	Compound 21
cAMP	cykloAdenosinmonophosphat
CD3	Cluster of differentiation 3
cDNA	komplementäre Desoxiribonukleinsäure
cGMP	cyklo Guanosinmonophosphat
cGS	chronische Glomerulosclerose
cGS+C21	chronische Glomerulosclerose + Compound 21
CNI	chronische Niereninsuffizienz
CO <sup>2</sup>	Kohlenstoffdioxid
Kol I	Kollagen I
Cu	Kupfer
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure

---

dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	2'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate
E	Extinktion
ED1	Ektodysplasin1
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GLDH	Glutamatdehydrogenase
glom.	glomerulär
GmbH	Gesellschaft mit begrenzter Haftung
GPCR	G- Protein gebundenen Rezeptoren
GS	Gesichtsfeld
H <sub>2</sub> O	Wasser
Harnstoffkonz.	Harnstoffkonzentration
HCl	Salzsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
IL	Interleukin
Kon	Kontrolle
Krea	Kreatinin
LAP	Latency Associated Peptide
LH	Luteinisierendes Hormon
LTBP	Latent TGF-β Binding Protein
mAb 1-22-3	monoklonaler Antikörper 1-22-3
MCP	Metoclopramid
MCP 1	Monocyte chemoattractant protein 1
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mRNS	Messenger Ribonucleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NH <sub>4</sub>	Ammoniumion
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
OH	Hydroxid

PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Protein
PAS	Periodic acid-Schiff
PBS	Phosphat Bufferd Saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
RT-PCR	Realttime-Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
RAS	Renin Angiotensin System
RNS	Ribonukleinsäure
SERPIN	Serin Protease Inhibitor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Smad	TGF- $\beta$ Signaltransduktionsmoleküle
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor-beta
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinase-1
TL	Tibiallänge
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor-alpha
TUNEL	Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling
Uni-NX	Uninephrektomie
Verd.	Verdünnung
$\alpha$ -SMA	alpha-Smooth Muscle Actin

### 3 Einleitung

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die bis heute stark kontrovers diskutierte Rolle des Angiotensin II Typ 2 Rezeptors (AT2-Rezeptors) auf den Krankheitsverlauf chronisch-progressiver Nierenerkrankungen. Der AT2-Rezeptor ist, wie der Angiotensin II Typ1 Rezeptor (AT1-Rezeptor) auch, ein Teil des Renin-Angiotensin-Systems (RAS). Dies nimmt mit seinem wichtigstem Mediator, dem Angiotensin II (AngII), eine zentrale Rolle in der Progression renaler Erkrankungen ein. Dabei werden über den AT1-Rezeptor profibrotische, proinflammatorische und proliferative Wirkungen vermittelt. Im Dissens zu diesen ungünstigen Effekten wird momentan davon ausgegangen, dass über den AT2-Rezeptor konträre, nephroprotektive Effekte mediiert werden.

Die bisherigen Untersuchungen des AT2-Rezeptors erfolgten entweder indirekt über die Blockade des AT1-Rezeptors, über die Nutzung genetisch veränderter Versuchstiere oder mittels des kurzlebigen, peptidischen AT2-Rezeptor Agonisten CGP42112A. Dieser wirkt am Rezeptor sowohl agonistisch als auch antagonistisch. Erst durch die Entwicklung des selektiven und nicht-peptidischen AT2-Rezeptor Agonisten Compound 21 hat sich diese Situation geändert. Mit Hilfe des Compound 21 soll in dieser Arbeit die Frage geklärt werden, in wie weit die selektive Stimulation des AT2-Rezeptors die Progression der chronisch-progressiven Nierenerkrankungen beeinflusst. Und es soll untersucht werden, ob die durch die Stimulation des AT2-Rezeptors hervorgerufenen Effekte, denen des AT1-Rezeptors entgegen gestellt sind. Als Tiermodell diente die Anti-Thy1-induzierte, chronisch-progressive Glomerulosklerose der Ratte. In diesem Modell finden sich im fortgeschrittenen Stadium gleichzeitig pathohistologische Merkmale der Fibrose, Inflammation und Proliferation. Es können also eventuelle antifibrotische, antiinflammatorische und antiproliferative Effekte des AT2-Rezeptors untersucht werden. Diese Tatsache ermöglicht neben der Erforschung der Effekte des AT2-Rezeptors und des Compound 21 auch die Suche nach weiteren Therapieoptionen der chronischen Niereninsuffizienz.

Die durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnisse dienen somit nicht nur der spezifizierten Charakterisierung des AT2-Rezeptors und seinen Wirkungen, sondern auch der Überprüfung des Wirkstoffes Compound 21 und seinen Effekten auf die Progression der chronisch-progressiven Nierenerkrankung.

## 4 Literaturübersicht

### 4.1 Epidemiologie der chronischen Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz (CNI) tritt gehäuft bei Tieren im mittleren bis oberen Alterssegment auf, so leiden ca. 1 % aller Hunde in einem Alter von 7-10 Jahren an einer CNI und mit zunehmendem Lebensalter steigt die Zahl der Erkrankungen exponentiell an. Bei Katzen ist die Prävalenz der CNI im Vergleich zu Hunden sogar doppelt so hoch (**Tabelle 1**). Es bestehen keine Geschlechts- oder Größendispositionen, lediglich eine Rassedisposition, die sowohl bei Hunden (Berner Sennenhund, Pudel, Yorkshire Terrier) als auch bei wenigen Katzenrassen (Polyzystic Kidney Disease bei Perserkatzen, Nierenamyloidose der Abessinier Katzen) zu beobachten ist (Kraft et al. 1996, Minkus et al. 1994, Reusch et al. 1994, Suter et al. 2006).

Lebensalter in Jahren	% der Hunde mit CNI	% der Katzen mit CNI
07-10	ca. 1 %	ca. 2 %
10-15	ca. 2,5 %	ca. 3 %
>15	ca. 6 %	ca. 12 %

**Tabelle 1:** Prävalenz der chronischen Niereninsuffizienz bei Hunden und Katzen in verschiedenen Alterssegmenten

Die CNI bei Hund und Katze stellt in der Kleintiermedizin eine der häufigsten Todesursachen dar und kann aufgrund ihrer Prävalenz und Inzidenz gleichgesetzt werden mit den Herz-Kreislauf-erkrankungen der Mitteleuropäer. Eine pathogenetische Therapieform steht nicht zur Verfügung und somit bleibt lediglich die symptomatische Behandlung. Durch die vorhandenen Therapieformen wird weder der progressive Verlauf der Erkrankung aufgehalten, noch geht die Erkrankung in Regression über. Die symptomatische Therapie der CNI wirkt nur verlangsamernd auf den Krankheitsverlauf (Peters et al. 2000 ). Zudem beginnt die Therapie meist in einem späten Stadium der Nierenschädigung, da sich erst eine klinische Symptomatik einstellt, wenn die Nierenfunktion zu ca. 70 % eingeschränkt ist. Selbst zu diesem Zeitpunkt sind die Symptome noch unspezifisch und variieren. Das Krankheitsbild der CNI wird in vier nicht klar voneinander abzugrenzende Stadien eingeteilt (**Tabelle 2**) (Kraft et al. 1996):

Stadium	Symptome
Stadium der eingeschränkten Leistungsbreite	eingeschränkte Leistungsfähigkeit, kaum Allgemeinstörungen
Stadium der mäßigen Insuffizienz	Leistungseinschränkung, Mattigkeit, Inappetenz, Lethargie Apathie, wechselnde Kotkonsistenz, Veränderungen an Haut- und Haarkleid (Alopezie, glanzloses, struppiges Fell) Diarrhoe, Vomitus
Stadium der fortgeschrittenen Insuffizienz	gestörtes Allgemeinbefinden, Vomitus, Diarrhoe, Exsikkose, Retinopathien verwaschene Schleimhäute (Acetongeruch); Stomatitis, Ulzera, Anorexie
Stadium der terminalen Insuffizienz	verstärkte Symptomatik → urämisches Koma Endstage-kidney → Schrumpfniere

**Table 2:** angelehnt an Kraft und Dürr 1996 Stadien der chronischen Niereninsuffizienz

Über das Vorkommen der chronischen Niereninsuffizienz der domestizierten Ratte ist bisher wenig bekannt. Es gibt keine konkreten Zahlen zur Prävalenz und Inzidenz.

In der Humanmedizin besteht eine ähnliche Problematik, denn auch hier ist die CNI nur symptomatisch therapierbar. Jedoch sind effektivere Therapieoptionen vorhanden, wie beispielsweise die Haemodialyse und die Nierentransplantation. Im Jahr 2006 wurden 66.508 Patienten dialysiert, das waren 4,9 % mehr Patienten als im Vorjahr. Außerdem befanden sich 25.210 Patienten in der Transplantationsnachsorge. Daraus resultiert, dass sich im Jahr 2006 rund 91.718 Patienten in einer chronischen Nierenersatztherapie befanden. Dies ist eine Steigerung von 67 %, ausgehend vom Jahr 1995 als sich 54.656 Patienten in einer chronischen Nierenersatztherapie befanden. (Frei et al. 2006/07). Im Jahr 2006 wurden 2.776 Nieren-transplantationen in Deutschland durchgeführt und auf der Warteliste für eine Transplantation standen 8.473 Personen. Es wurden 2.824 Patienten neu auf die Warteliste aufgenommen und damit überschritten die Neuaufnahmen weiterhin die Transplantationen, jedoch war die Anzahl der auf eine Transplantation wartenden Personen weiter rückläufig.

Diese Daten zeigen deutlich, dass trotz intensiver Forschung noch immer ein dringender Bedarf an neuen und effektiveren Behandlungsmethoden besteht (Amiel et al. 1999).

## 4.2 Mechanismen der chronischen Niereninsuffizienz

Die CNI ist sowohl beim Hund, als auch bei der Ratte und dem Menschen durch einen progressiven Funktionsverlust der Niere gekennzeichnet, der bedingt ist durch die Abnahme der glomerulären Filtrationsrate. Kausal für die Entstehung der CNI können diverse Faktoren sein, meist ist es jedoch das fortdauernde Bestehen einer Grunderkrankung (z.B. chronisch-interstitielle Nephritiden, Glomerulopathien, Amyloidosen, Pyelonephritiden, Neoplasien, etc.) Es können auch zusätzliche renale Insulte, bzw. Ereignisse, die die CNI selbst hervorruft (Infektionen der unteren Harnwege, Steinbildung oder eine systemische Hypertonie) ursächlich sein. Zudem scheint die Niere selbst Mechanismen zur Kompensierung der Schädigung zu aktivieren, die eine autonome Progradienz der Erkrankung bedingen und zu irreversiblen Schäden führen können. Dies konnte im Tiermodell nachgewiesen werden, in dem die CNI trotz der Eliminierung der Grunderkrankung progressiv voranschritt (Stünzi et al. 1990). Diese Pathomechanismen ergeben sich aus dem Bestreben der Niere, die Homeostase des Organismus, also die Konstanz des Flüssigkeits-, Elektrolyt- und des Säure-Basehaushaltes sowie der Ausscheidung urinpflichtiger Substanzen aufrecht zu erhalten. Das Bestreben der Niere kann verschiedene Schäden hervorrufen, wie zum Beispiel eine erhöhte Ammoniogenese, einen verstärkten Sauerstoffverbrauch, glomeruläre Hypertonie, Hyperfiltration und Hypertrophie (Roudebush et al. 2000).

Wird durch eine Grunderkrankung die Anzahl der Nephrone reduziert, so kommt es zu einer kompensatorischen Erhöhung des glomerulären Filtrationsvolumens (Komatsu et al. 1995). Das führt zeitweilig zu einer angemessenen Kompensierung. Bei anhaltender vermehrter Beanspruchung der verbliebenen Nephrone kommt es zu haemodynamischen Veränderungen und letztendlich zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion. Diese Annahme wurde tierexperimentell bestätigt. Bei Ratten wurde die Nierenmasse chirurgisch vermindert und als Resultat folgten eine verstärkte Perfusion der verbliebenen Nierenmasse und ein Druckanstieg in den glomerulären Kapillaren. Zudem entwickelten die Tiere eine kompensatorische Hypertrophie der verbliebenen Glomeruli. Daraus resultierte ein Anstieg des glomerulären Filtrationsvolumens, wodurch die Reduktion der Nierenmasse kompensiert werden konnte. Hält dieser Zustand für einen längeren Zeitraum an, kommt es zur Verschlechterung der Nierenfunktion (Shea et al. 1978). Die molekulare Grundlage bilden verschiedene Hormone. Eine wichtige Rolle nimmt das RAS mit AngII, als seinem wichtigsten Mediator ein. Das RAS wird durch die Hypoxie des Nierengewebes aktiviert, woraufhin von den juxtaglomerulären Zellen vermehrt Renin gebildet wird. Renin führt zu einem verstärkten Umsatz von Angiotensinogen in AngII. Außerdem werden andere vasomotorische Hormone, wie z.B. das atriale natriuretische Peptid (ANP), Prostaglandine und Thromboxan A<sub>2</sub> ausgeschüttet, die ebenfalls die glomeruläre Hyperfiltration und Hypertonie beeinflussen.

Experimentell konnte gezeigt werden, dass nach einer Teilresektion der Nierenmasse bei Ratten das Glomerulusvolumen und die glomeruläre Filtrationsrate parallel zueinander ansteigen (Brown et al. 1990, Meyer et al. 1988, Shea et al. 1978). Dabei ist die Volumenzunahme der Glomeruli auf die Expansion extrazellulärer Matrixproteine zurückzuführen. Die Expansion von Matrixproteinen kann nicht nur durch glomeruläre Hypertonie, sondern auch durch Hyperglykämie, Inflammation und andere schädigenden Noxen verursacht werden. Die Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen ist ein Bestandteil der physiologischen Wundheilung, welche in die Schädigungsphase, Matrixexpansionsphase und die Resolutionsphase eingeteilt wird. Am Ende der Wundheilung stehen die Wiederherstellung der physiologischen Funktion und der Abbau der extrazellulären Matrixproteine. Bei der CNI tritt der Abbau der Matrixproteine nicht ein, sondern es kommt zu einer Art überschießenden Wundheilung, welche durch massive Akkumulation von Matrixproteinen, die zu einer Organfibrose und verminderter glomerulärer Filtrationsrate führt, gekennzeichnet ist. Ursächlich für die massive Akkumulation der Matrixproteine sind eine gesteigerte Synthese der Matrixproteine verbunden mit einem gehemmten Abbau und die lokale Überexpression von matrixbindenden Rezeptoren.

Die gesteigerte Synthese der Matrixproteine findet in Form der Produktion von Kollagen I (Kol I), Fibronectin und anderen Proteinen statt und wird direkt durch AngII über AT1-Rezeptoren vermittelt (Dinh et al. 2001, Mezzano et al. 2001, Mosher et al. 1992, Pichler et al. 1998, Wolf et al. 2003). Dies ist die physiologische Reaktion auf den initialen Entzündungsstimulus und stellt einen Versuch des Organismus dar, die Entzündung zur Abheilung zu bringen. Die synthetisierten Matrixproteine können im nächsten Schritt nicht oder stark vermindert abgebaut werden, da zusätzlich zur Matrixproteinexpansion Gewebeproteinasen vermindert produziert werden und vom Organismus verstärkt Protease-Inhibitoren, wie tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1), Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) oder Elastasen synthetisiert werden. Diese verhindern den Abbau der Matrixproteine und sorgen für deren Akkumulation. Die Expression der Protease-Inhibitoren wird vermittelt über das AngII und die AT1-Rezeptoren (Pichler et al. 1998). Denn das RAS wird ständig durch die noch bestehende oder rezidivierend auftretende Noxe, wie zum Beispiel die Hypertension, die Hyperglykämie oder die Inflammation stimuliert.

Unter physiologischen Umständen werden übermäßig synthetisierte Matrixproteine durch gleichzeitig produzierte Proteinasen abgebaut, so dass die Akkumulation der Matrixproteine in sich beschränkt bleibt und eine normale Funktion des Organs erreicht wird (Löffler et al. 2007). Dieses Gleichgewicht ist im Falle der Fibrose ausgehebelt und somit kann die Fibrose eines Organs als eine überschießende Wundheilung angesehen werden.

Die Anreicherung der Matrixproteine führt zur Senkung des Glomerulusfiltrates, was den Grundstein des Circulus vitiosus der Glomerulosklerose darstellt (Pesce et al. 1991). Unabhängig von der auslösenden Ursache enden chronische Nephropathien meist in generellen Nierenschädigungen unter Einbeziehung sämtlicher Komponenten des Nierengewebes. Der Untergang einzelner Nephrone kann anfänglich durch eine Hyperperfusion der übrigen Nephrone ausgeglichen werden. Dies führt ab einem bestimmten Grad der Hyperperfusion dazu, dass urinpflichtige Stoffe, wie z.B. Kreatinin und Harnstoff retiniert werden. Somit entsteht eine Azotämie, die später in die klinisch auffällige Urämie übergeht. Harnstoff ist dabei einer der wichtigsten Parameter. Er wird in der Leber aus Stickstoff gebildet, der das Hauptprodukt des Eiweißstoffwechsels ist und kann zusätzlich im proximalen Tubulus der Niere aus Glutaminsäure und Glycin gebildet werden. Der Harnstoff wird in den Henleschen Schleifen der Niere konzentriert und mit dem Primärurin über das Sammelrohrsystem ausgeschieden (Frank et al. 2000).

Im Falle einer CNI wird die Ammoniogenese im renalen Gewebe auf Grund einer Hypokaliämie gesteigert und parallel werden vermehrt Harnstoff und Ammoniak im Tubulussystem retiniert. Da sowohl Harnstoff als auch Ammoniak in wässriger Lösung sauer reagieren entwickelt sich im renalen Gewebe durch die Kumulation dieser eine Azidose. Diese pH-Wert Senkung wird durch einen gesteigerten Sauerstoffverbrauch der restlichen, vermehrt belasteten Nephrone verstärkt, denn daraus resultiert eine lokale Hypoxie. Die Hypoxie bedingt eine verstärkte Bildung von freien Radikalen und Reaktiven Oxygen Species (ROS), die degenerierende Prozesse auslösen, welche durch das aktivierte RAS mit AngII verstärkt werden (Benigni et al.).

Die Azidose ist ursächlich für eine gesteigerte Kalziumausscheidung über die Niere, wodurch das Calcium-Phosphor Gleichgewicht gestört wird mit dem möglichen Resultat eines renalen Hyperparathyreoidismus (Stacy et al. 1970).

Mit fortschreitender Nierenschädigung stellt sich eine progressiv entwickelnde Proteinurie ein. Diese lässt sich in Urinproben meist nicht verifizieren, da sie mit einer Polyurie einhergeht, welche die Proteinurie maskiert. Es wird vermutet, dass die Ausscheidung der Proteine zum Teil durch die glomeruläre Hypertension bedingt ist, denn der erhöhte Druck kann zu einer Ausdehnung der Glomeruli führen. Dadurch weiten sich die Poren der Kapillarschlingen und somit können Proteine ausgeschieden werden (Oberbauer et al. 1996). Einen weiteren Grund stellt die Änderung der Ladung der glomerulären Basalmembran dar. Neutralisierende Lipoproteine und kationische Proteine akkumulieren an der glomerulären Basalmembran, wodurch deren negative Ladung vermindert wird. Dadurch kommt es zu einer schwächeren Abstoßung der Proteine (Krämer et al. 2007). Ein wichtiger Mediator der Proteinurie ist AngII, welches den Widerstand der efferenten, glomerulären Arteriolen erhöht

und zu einer vermehrten Synthese von Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) aus verschiedenen Zellen der Niere führt. TGF- $\beta$  beeinträchtigt die Autoregulation der afferenten, glomerulären Arteriolen. Diese Effekte führen zu einem erhöhten glomerulären Filtrationsdruck, der sowohl direkt als auch indirekt durch AngII bedingt ist. Des Weiteren hemmt AngII die Nephren Transkription, welche essentiell ist für die Integrität der Podozyten. Diese gehen ohne eine intakte Nephren-Nephren Signaltransduktion in Apoptose über, wodurch die Proteinurie verstärkt wird.

Das Albumin, welches einen Großteil der über den Urin ausgeschiedenen Proteine ausmacht, wird unter physiologischen Umständen in den proximalen Tubuli mittels Endozytose reabsorbiert. Dieser Prozess wird durch AngII verstärkt, denn über die Stimulation der AT2-Rezeptoren kommt es zu einer erhöhten Aktivität der Protein-Kinase B, die den Effekt der Endozytose mediiert. Die vermehrte Reabsorption des Albumins in den proximalen Tubuli führt zu einer verstärkten Aktivierung des RAS und zur Freisetzung verschiedene profibrotischer und proinflammatorischer Cytokine, wie TGF- $\beta$  und Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), wodurch eine verstärkte Infiltration des Gewebes mit Immunzellen bedingt wird.

Ein weiteres bedeutendes Symptom der CNI ist die Hypertension, welche bedingt wird durch die Aktivierung des RAS und welche verstärkt wird durch eine geringere Produktion vasodilatativ wirkende Prostaglandine durch die Niere.

### **4.3 Der Transforming Growth Faktor-beta und sein Einfluss auf die CNI**

TGF- $\beta$  ist ein profibrotisches, multifunktionales Zytokin, dass bei der Entstehung und Progression der Fibrose eines Organs eine Schlüsselrolle übernimmt. Als typisches pleiotropes Zytokin wird TGF- $\beta$  von Leukozyten und vielen anderen Zelltypen, wie z.B. den renalen proximalen Tubuluszellen, produziert und vermittelt sowohl autokrin, parakrin als auch juxtakrin seine Wirkung (Fraser et al. 2002, Zhang et al. 2002). Die Expression von TGF- $\beta$  wird im Fall der CNI durch das RAS mediiert, denn AngII führt durch die Stimulation der AT1-Rezeptoren zu einer verstärkten Expression dessen.

Das TGF- $\beta$  wird als Proform von den Zellen sezerniert. Diese besteht aus einem 25 kDa großem Homodimer und einem 75 kDa großem Latency Associated Peptide (LAP), welches eine Protektionsfunktion übernimmt und in seiner Form variieren kann (Branton et al. 1999). TGF- $\beta$  vermittelt seine Effekte über den TypII-Rezeptor, der nach der Bindung in eine aktive Form übergeht (Annes et al. 2003, Lyons et al. 1988). In dieser aktiven Form phosphoryliert er den Typ I-Rezeptor, der dadurch seine Konformation ändert. Diese aktive Form phosphoryliert im weiteren Geschehen sogenannte TGF- $\beta$  Signaltransduktionsmoleküle

(Smad), die in der Lage sind in den Zellkern einzudringen und sich an Smad bindende Elemente (SEB) zu heften (Shi et al. 2003). Diese Proteinkombination ist in der Lage mit anderen Transskriptionsfaktoren in Kontakt zu treten und durch die Bindung die Transskription TGF- $\beta$  spezifischer Gene zu aktivieren. Gleichzeitig ist er selbst als Transskriptionsfaktor aktiv (Feldmann et al. 2003, Shi and Massague et al. 2003). TGF- $\beta$  wirkt dadurch direkt auf den Zellzyklus über die Hemmung der Cyclin-abhängigen Kinase 2, wodurch der Zellzyklus in der G1-Phase gestoppt wird (Krämer et al. 2007). Zudem stimuliert TGF- $\beta$  die Angiogenese, die Wundheilung und die Proliferation mesangialer Zellen (z.B. Fibroblasten). Gleichzeitig hemmt es das Immunsystem, in dem es die Proliferation der T-Zellen verhindert genauso wie die Proliferation epithelialer Zellen (Li et al. 2006, Moses et al. 1990). Neben der chemotaktischen Wirkung von TGF- $\beta$  auf Monozyten und neutrophile Granulozyten stimuliert es die Synthese extrazellulärer Matrixproteine, wie Fibronectin und Proteoglykane und vermindert zugleich ihren Abbau durch die gesteigerte Expression von Proteinaseinhibitoren (PAI-1, TIMP-1) (Branton et al. 1999, Hocevar et al. 1999). Im Ergebnis führt eine übermäßige TGF- $\beta$  Expression somit zur Organfibrose durch Akkumulation der extrazellulären Matrixproteine (Lopez-Armada et al. 1996, O'Donnell et al. 2000). Zusätzlich steigert TGF- $\beta$  die Expression von vernetzenden Proteinen (Integrinen). In tierexperimentellen Versuchen wurde der TGF- $\beta$  Antagonist Decorin im akuten Modell der Anti-Thy1-Nephritis eingesetzt, was zu einer signifikanten Verminderung der Matrixakkumulation führte, die Organfibrose aber nicht aufhalten konnte, so dass davon ausgegangen wird, dass weitere Faktoren an der Fibroseformation beteiligt sein müssen (Peters et al. 2000).

#### **4.4 Histopathologisches Erscheinungsbild der chronischen Niereninsuffizienz**

Das histologische Bild einer chronisch-insuffizienten Niere zeigt gleichzeitig unterschiedliche Stadien der Entzündung nebeneinander (Remuzzi and Bertani et al. 1998).

Zellproliferation:

Die Proliferation mesangialer Zellen in einer gesunden Niere liegt unter 1% (Pabst and Sterzel et al. 1983, Schocklmann et al. 1999). In chronisch insuffizienten Nieren wurde eine Erhöhung des Cyclin A und der Cyclin-abhängigen Kinase 2 nachgewiesen (Shankland et al. 1997). Diese Proteine sind wichtige Regulatoren im Zellzyklus und zeigen eine erhöhte Teilungsaktivität der Zellen an. Des Weiteren wurde experimentell gezeigt, dass bei progressiven Glomerulopathien eine Proliferation der Mesangialzellen immer einhergeht mit der Zunahme von extrazellulärer Matrix und, dass eine Schädigung von Podozyten kausal

sein kann für eine progressive Nierenerkrankung (Pavenstadt et al. 2000). Die Funktion der Podozyten besteht in der glomerulären Filtration, die durch zahlreiche Fußausläufer, welche durch Diaphragmen miteinander verbunden sind, ermöglicht wird. Außerdem sind Podozyten in der Lage auf vasoaktive Substanzen mit Kontraktionen zu reagieren und diese auf die Basalmembran des Glomerulums zu übertragen, mit der sie über alpha3 beta1-Komplexe verbunden sind. So können Podozyten die glomeruläre Filtration beeinflussen und eine Schädigung der Podozyten hat dadurch weitreichende Folgen, welche von einer Veränderung der Filtrationsbarriere bis hin zur Proteinurie reichen (Pavenstadt et al. 2000, Shankland et al. 2006). Bei der CNI steigt der glomeruläre Filtrationsdruck an, woraus eine Auflösung der Diaphragmen resultiert und die Filtrationsbarriere wird durchlässiger für größere Proteine. Die Proteine gelangen in die Tubuli und werden zum Teil mit dem Urin ausgeschieden und/oder lagern sich in den Tubuli ab. In einer anderen Arbeit wurde aufgezeigt, dass die Proliferation mesangialer Zellen immer der Zellinfiltration durch Monozyten und Makrophagen vorangestellt ist, ebenso wie der letztendlichen Ausbildung einer Glomerulosklerose (Floege et al. 1992).

#### Fibrose:

Die Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine kann als eine Art überschießende Wundheilung verstanden werden, bei der die Phase der Reparatur übermäßig erfolgt. Es liegt eine gesteigerte Synthese der Matrixproteine durch Fibroblasten vor, die durch AngII in ihrem Wachstum stimuliert werden (Ruiz-Ortega and Egido et al. 1997). Gleichzeitig ist der Abbau der Matrixproteine vermindert und es liegt eine übermäßige lokale Expression von Matrixbindenden Rezeptoren vor. Die daraus resultierende Akkumulation ist charakteristisch für die mesangioproliferative Glomerulonephritis (Krämer et al. 2007).

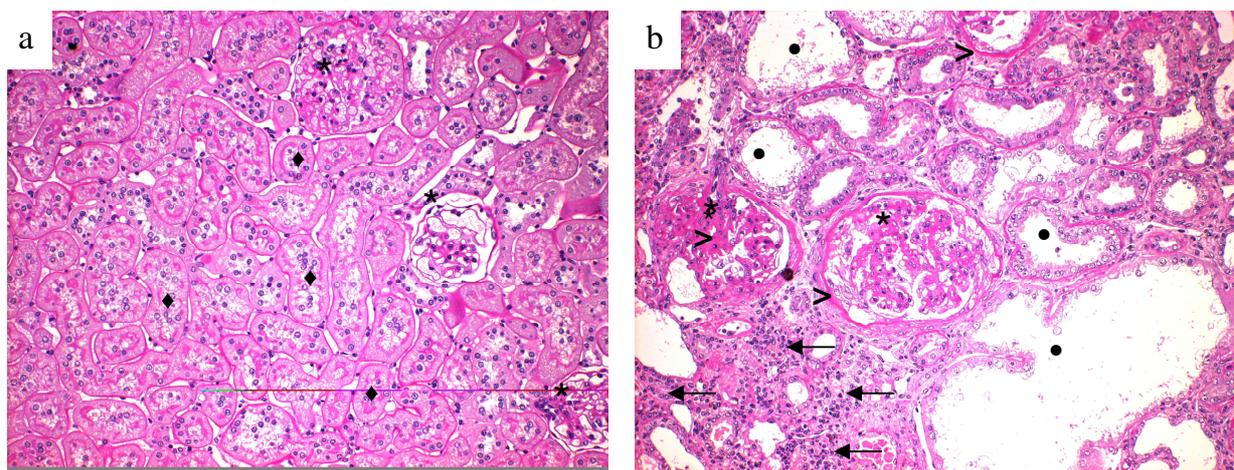
#### Zellinfiltration:

Das mononukleäre Zellinfiltrat wird gebildet durch Lymphozyten und Makrophagen (Dahme et al. 1999). Die Rolle der Lymphozyten im Krankheitsgeschehen der Glomerulonephritiden ist nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass sie die Intensität der Proteinurie und der Infiltration durch Makrophagen beeinflussen (Huang et al. 1997, Lan et al. 1991). Die Aufgabe einiger Subpopulationen der T-Lymphozyten besteht darin infizierte oder tumorös-entartete Zellen aufzufinden und entweder über die Sekretion von Perforin und Granzymen abzutöten oder über Caspasen die Apoptose der Zelle einzuleiten (Cagigi et al. 2010, Griffiths and Mueller et al. 1991, Joag et al. 1989, Krahenbuhl and Tschopp et al. 1991).

Makrophagen beeinflussen Dauer und Intensität einer Entzündungsreaktion in starkem Ausmaß (Lee et al. 2008). Sie können über den klassischen Weg, also über die Stimulation

ihres Interferon  $\alpha$  Rezeptors oder über den alternativen Weg, also über verschiedene Interleukine aktiviert werden. Dabei wurde die Rolle der Makrophagen lange Zeit auf die Antigenpräsentation, Phagozytose und Synthese bestimmter proinflammatorischer und antimikrobieller wirksamer Mediatoren beschränkt. Heutzutage wird vermutet, dass es bei Makrophagen verschiedene Subtypen gibt. Die über den klassischen Weg aktivierten Makrophagen bewirken chronische Entzündungen und Gewebeschäden, wohingegen die alternativ aktivierten Makrophagen die Entzündungsreaktion abschwächen und Reparaturvorgänge fördern (Duffield et al. 2003).

Diese Zelltypen infiltrieren im Geschehen der CNI das tubulointerstitielle Gewebe und die Glomeruli, da durch die Entzündungsreaktion im Gewebe verschiedene chemotaktisch wirkende Faktoren, wie zum Beispiel MCP-1 und Interleukine freigesetzt werden. Die Freisetzung dieser Chemokine ist zum Teil durch das RAS mit seinem AngII bedingt (Karkar et al. 2008).



**Abbildung 1:** Die Abbildung zeigt zwei Perjodsäure Schiffsreagenz (PAS) gefärbte Gewebsschnitte mit Meyer's Hämatoxylin als Gegenfärbung, in denen saure Mucopolysaccharide rot dargestellt werden (400fache Vergrößerung). In der Abbildung a) ist die Morphologie einer gesunden Niere einer Ratte zu erkennen mit soliden, regelmäßigen Tubuli (◆), wenigem interstitiellem Gewebe und gesunden Glomeruli (\*). Die Abbildung b) zeigt einen Ausschnitt aus einer fibrotischen Niere. Die Glomeruli sind geschwollen (\*), die Tubuli dilatiert mit massiv veränderten Tubuluszellen (●). Das interstitielle Gewebe hat zugenommen und es ist eine intensive Infiltration des Gewebes mit Entzündungszellen zu erkennen (←). Die Expression der extrazelluläre Matrix (hier rot) hat im peritubulärem, periglomerulärem Bereich ebenso massiv zugenommen, wie im glomerulärem Raum (<).

#### 4.5 Das Renin-Angiotensin-System

Es wurde lange Zeit angenommen, dass das RAS ein klassisches zirkulierendes Hormonsystem sei mit Nieren, Lunge und Leber als Substrat- und Enzymquelle (Dinh et al. 2001, Chung et al. 2006) (**Abbildung 2**). Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, dass auch lokale, autokrine RAS in verschiedenen Organen vorhanden sind. Das wichtigste Effektormolekül beider Formen des RAS ist das AngII. Dieses wird im klassischen RAS aus dem in der Leber gebildeten  $\alpha_2$  Globulin Angiotensinogen über zwei Schritte synthetisiert. Als erstes wird dazu das Angiotensinogen in der Leber in den Blutkreislauf sezerniert. Damit gelangt es zu dem plasmaständigen Renin. Renin ist eine Aspartylprotease, die in einer Propräform synthetisiert wird und über zwei enzymatische Schritte über Prorenin in Renin umgewandelt wird, das in den Granula der juxtaglomerulären Zellen gespeichert wird. Die Ausschüttung des Renins wird über intrahepatische, humorale und sympathische Mechanismen reguliert, dabei hemmt AngII und eine Volumenexpansion die Freisetzung durch ein negatives Feedback. Die Funktion des Renins besteht darin, von Angiotensinogen das Decapeptid Angiotensin I (AngI) abzuspalten. Im weiteren Verlauf wird das Angiotensin I über das Plasma zu den Endothelien der Lunge und zu den Hoden transportiert, in denen es durch das Angiotensin-Konvertierende-Enzym (ACE) durch Abspaltung zweier Aminosäuren in das Oktapeptid AngII umgewandelt wird (Lentz et al. 1976). Das AngII wird über die Aminopeptidase A weiter zu AngiotensinIII (AngIII) und AngiotensinIV (AngIV) reduziert (Ruster and Wolf et al. 2006).

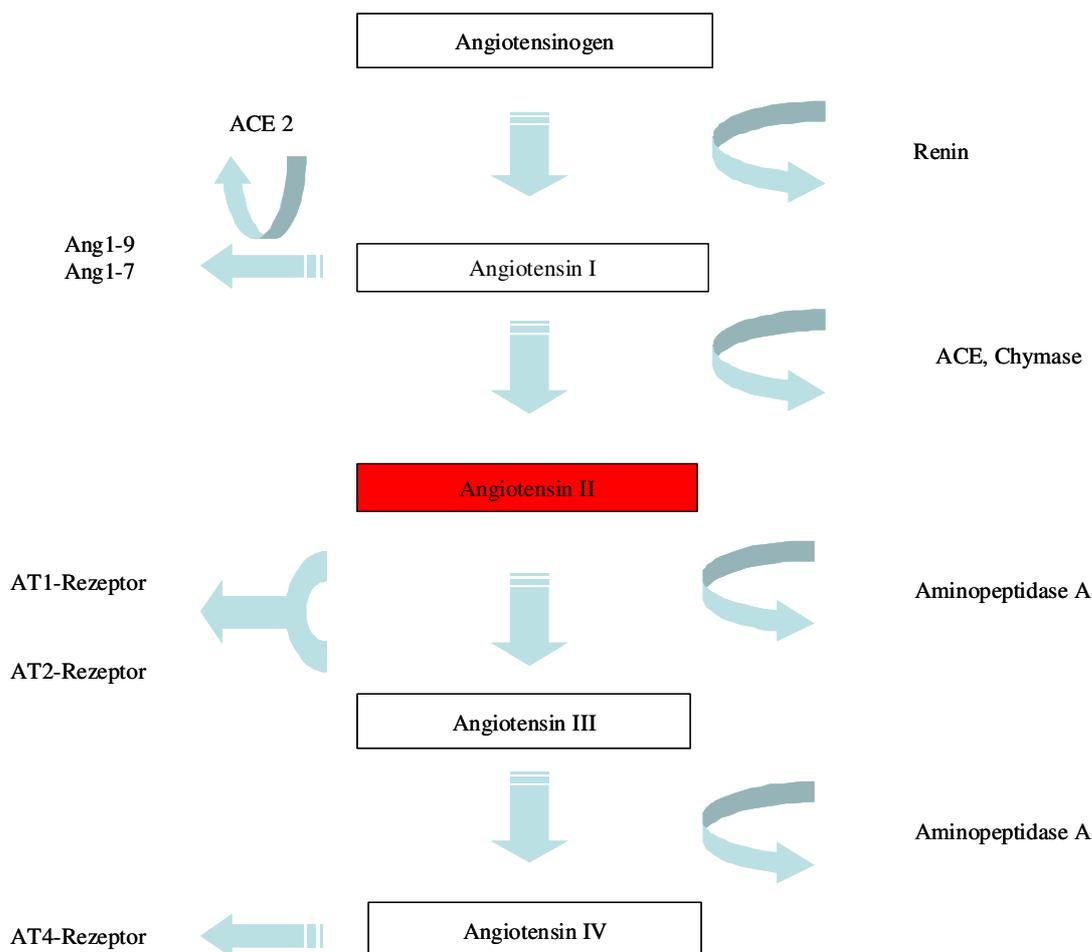
Neben dem klassischen Weg der AngII Produktion gibt es einen alternativen Weg. Hier wandeln nicht-Renin Enzyme, wie z.B. die Metalloproteinase Chymase, Cathepsin G, chymostatin-sensitives AngII generierendes Enzym (CAGE), Tonin oder der Gewebsplasminogenaktivator das AngI in AngII um. Tatsächlich verhält es sich so, dass in einigen Organen ein Großteil (60-80 %) der AngII Produktion Chymase-abhängig ist. Die Chymase ist beispielsweise in kardiovaskulären Geweben und in der Niere vorhanden (Chung et al. 2006).

Wie bereits angedeutet, existieren neben dem klassischen RAS in einigen Organen, wie Niere, Nebenniere, Gefäßen, Herz und Gehirn lokale RAS. In diesen sind alle Komponenten, die im klassischen RAS vorkommen, vorhanden, nur dass sie unabhängig davon arbeiten. Diese Form des RAS wurde z.B. in den proximalen Tubuluszellen der Niere nachgewiesen. Sie geben Angiotensinogen in den Urin ab, welches in den distalen Tubuli reabsorbiert wird und in AngII umgewandelt werden kann. Dies hat unter anderem eine direkte, Aldosteron-unabhängige Wirkung auf die Expression von Natriumkanälen. Das lokale RAS kann durch renale Gewebsschäden, Hyperglykämie und Proteinurie stimuliert werden (Burns et al. 1993,

Pichler et al. 1998). Einige lokale RAS arbeiten jedoch nicht völlig unabhängig vom systemischen RAS (Danser et al. 1994).

Außerdem wurde ein weiteres ACE gefunden, das in den Podozyten, Mesangialzellen und den glomerulären Endothelzellen expremiert wird. Dieses ACE2 synthetisiert kein AngII, sondern wandelt AngII und AngI in inaktives Ang1-9 oder in vasodilatativ, antiproliferativ wirkendes Ang1-7 um. Durch das ACE2 wird eine Anreicherung des AngII im Glomerulum und somit ein Anstieg der Permeabilität des Glomerulums verhindert (Burrell et al. 2004).

Die Wirkungen des AngII werden über AT1- und AT2-Rezeptoren vermittelt (Dinh et al. 2001, Chung et al. 2006, Pichler et al. 1998). Die Expression der AT1-Rezeptoren wird stimuliert durch verschiedene Reize, wie verringerte Natriumwerte, Glukokortikoide, insulinähnlicher Wachstumsfaktor, Progesteron und epidermaler Wachstumsfaktor. Herunterreguliert wird die Expression der AT1-Rezeptoren z.B. durch eine hohe Konzentration von AngII, hohe Plasmareninkonzentration, Mineralokortikoide, all-trans-Retinsäure, Östrogen und Stickstoffmonoxid. Die Expression der AT2-Rezeptoren wird stimuliert durch Gewebeschäden, Entzug von Serum, Zugabe von Insulin, insulinähnlichem Wachstumsfaktor, Interferon  $\gamma$  und Interleukin  $\beta$  und ist unabhängig von der Konzentration des AngII. Vermindert wird die Expression durch Zugabe von Serum, Lysophosphatsäure, Glukokortikoide und bestimmte Wachstumsfaktoren. Über die Wirkungen, die durch die Stimulation der AT2-Rezeptoren vermittelt werden, ist wenig bekannt. Es wird vermutet, dass die über den AT2-Rezeptor stimulierten Effekte den Wirkungen des AT1-Rezeptors entgegengesetzt sind.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Reaktionskaskade des RAS. Angiotensinogen wird durch Renin zu Angiotensin I (AngI) umgewandelt. Das AngI wird im weiteren Verlauf durch das Angiotensin-Konvertierende-Enzym (ACE) oder die Chymase zu Angiotensin II (AngII) gespalten, welches über seine Effekte über die Angiotensin Rezeptoren vermitteln kann. Die Rezeptoren werden eingeteilt in die AT1- und die AT2-Rezeptoren. (AT1-Rezeptor = Angiotensin II-Rezeptor Typ1; AT2-Rezeptor = Angiotensin II-Rezeptor Typ2, AT4-Rezeptor = Angiotensin II-Rezeptor Typ4, ACE = Angiotensin-Konvertierendes-Enzym, Ang = Angiotensin). Modifiziert nach Dinh et al (Dinh et al 2001)

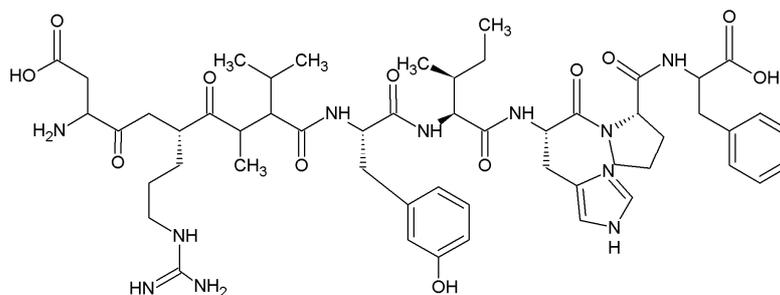
#### 4.6 Angiotensin II

AngII ist ein Oktapeptid und das wichtigste vasopressorische Effektormolekül des RAS. Es wird, wie in Abbildung 2 dargestellt, auf dem klassischen Weg aus Angiotensinogen synthetisiert. Angiotensinogen ist ein  $\alpha_2$  Globulin und wird in der Leber produziert und hier in das Plasma freigegeben. Das Molekulargewicht des Angiotensinogen beträgt 51.982 Da und es besteht aus 477 Aminosäuren (Berg et al. 2003, Uniprot.org). Über das Plasma erreicht es die Nieren, in denen die Peptidase Renin gebildet wird. Renin besteht aus 402 Aminosäuren

und hat ein Molekulargewicht von 44.276 Da. Seine Ausschüttung wird durch verschiedene Signale, wie adrenerge Stimulation der juxtaglomerulären Zellen, cAMP, Katecholamine, Plasmanatrium- und -kaliumspiegel, Blutdruck oder vasodilatatorische Medikamente hervorgerufen und durch die bereits genannten negativen Feedbacks vermindert (Davis et al. 1971). Das Angiotensinogen wird durch die Spaltung von Leucinbindungen in Angiotensin I umgewandelt. Angiotensin I ist das Substrat des ACE, welches vor allem in den Endothelien der Lunge und den Geweben des Hodens vorkommt. Das ACE wandelt Angiotensin I durch Abspaltung eines Dipeptides zu AngII um.

Neben dem klassischen Weg der Synthese wird AngII auch über einen alternativen Weg in verschiedenen Organen, wie zum Beispiel der Niere oder den kardiovaskulären Geweben durch die Chymase und andere nicht-Renin Enzyme unabhängig von ACE und Renin synthetisiert.

Ein weiterer Weg zur Herstellung des AngII stellen die lokalen RAS verschiedener Organe, wie Herz und Niere da, die ebenfalls weitestgehend unabhängig vom systemischen RAS arbeiten. Das AngII ist die biologisch aktive Form des AngI, denn seine Affinität zum AT1-Rezeptor und zum AT2-Rezeptor, welche seine wichtigsten Wirkungen vermitteln, ist um ein vielfaches höher. Es kann durch die Aminopeptidase A in AngIII und AngIV umgewandelt werden. AngIII bindet an die gleichen Rezeptoren wie das AngII nur mit einer wesentlich geringeren Affinität. Das AngIV bindet an die AT4-Rezeptoren, die profibrotische Effekte vermitteln.



**Abbildung 3:** Die Abbildung zeigt die schematische molekulare Struktur des Angiotensin II. O = Sauerstoff, CH<sub>3</sub> = Methylgruppe, OH = Hydroxygruppe, N = Stickstoff, NH = Amino-  
gruppe, NH<sub>2</sub> = Aminogruppe (pubchem.ncbi)

#### 4.7 Die Angiotensin II-Rezeptoren

Das AngII wirkt im Organismus über verschiedenen Rezeptoren, welche in zwei Subtypen eingeteilt werden können, die AT1-Rezeptoren und die AT2-Rezeptoren (Boulay G. et al. 1992). Bei Nagetieren werden die AT1-Rezeptoren zusätzlich in zwei Subtypen eingeteilt, die AT1a- und die AT1b-Rezeptoren (Blume et al. 2001, Dinh et al. 2001). Die Rezeptoren kommen in der Nebennierenrinde, der Niere, dem Gehirn, am Herz, an der Aorta, der Lunge und der Leber vor, wobei der AT1a-Rezeptor in der Regel dominant exprimiert wird. Eine Ausnahme bildet das kardiale Gewebe in dem ausschließlich der AT1a-Rezeptor vorkommt und die Hypophyse bzw. die Nebennierenrinde, in denen der AT1b-Rezeptor überwiegt (Gasc et al. 1994). Die AT1-Rezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und ihre DNS-Sequenz wurde bei der Ratte auf dem X-Chromosom 17 und 2 lokalisiert. (Berg et al. 2003, Lottspeich et al. 1998, Uniprot.org). Die Rezeptoren bestehen aus 359 Aminosäuren, die einen sieben transmembranen Glykoproteinkomplex, an welchen im intrazellulären Raum das G-Protein gekoppelt ist, bilden. Wie für GPCR typisch liegt bereits ohne Anwesenheit eines Agonisten ein Gleichgewicht zwischen aktiven und inaktiven Rezeptoren vor (de Gasparo et al. 2000). Durch die Bindung des AngII wird die Konformation des Rezeptors geändert, wodurch die aktive Untereinheit des G-Proteins abgespalten wird (Gether and Kobilka et al. 1998). Der Rezeptor hat nun einen aktiven Status, wodurch sich das Gleichgewicht der Rezeptoren in Richtung aktiv verlagert (Thomas et al. 2000). Die abgespaltene Untereinheit des G-Proteins löst verschiedene Signalkaskaden aus, bei denen die Phospholipasen A, C, D, die Inositolphosphate, Kalziumkanäle und mehrere Serin/ Threonin- und Tyrosinkinase beteiligt sind und an deren Ende die unterschiedlichen Wirkungen des AT1-Rezeptors stehen (Ganten et al. 2006). Zu den klassischen renalen Wirkungen gehören unter anderem: Vasokonstriktion, gesteigerte Natriumresorption, Aldosteronausschüttung, Verminderung des renalen Blutflusses, renale Renininhibition, glatte Muskelzellproliferation, zentrale Osmosekontrolle, extrazelluläre Matrixbildung und eine chemotaktische Wirkung.

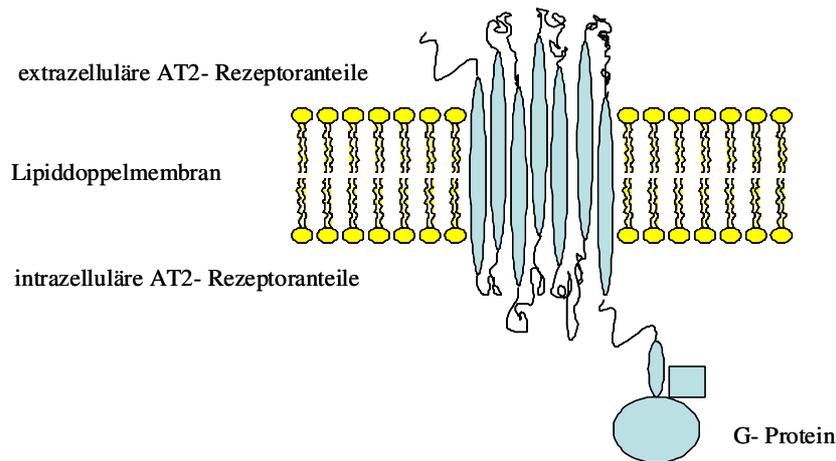
Neben diesen klassischen Wirkungen wird durch die Initiierung von Signaltransduktionskaskaden auch die Expression von verschiedenen Proteinen, die wichtige Funktionen beim Zellwachstum und der Proliferation übernehmen, ausgelöst.

Der AT2-Rezeptor ist ebenfalls ein G-Protein gekoppeltes Glykoprotein, welches aus sieben transmembranen Domänen besteht (**Abbildung 4**). Es stimmen lediglich 34 % der 363 Aminosäuren mit dem AT1-Rezeptor überein (Uniprot.org) Das Gen des Rezeptors wurde auf dem X-Chromosom lokalisiert bei q22-q23. Welche genauen Signaltransduktionskaskaden nach der Konformationsänderung durch die Stimulation mittels AngII durch die freigesetzte aktive Untereinheit des G-Proteins ausgelöst werden, ist nicht bekannt. Ungewöhnlich ist,

dass einige seiner Wirkungen ohne die Aktivierung von G-Proteinen stimuliert werden und das viele seiner Wirkungen stark abhängig sind vom Zelltyp (Johren et al. 2004).

Der wichtigste Weg der Signaltransduktion scheint die Aktivierung von Phosphatasen zu sein, wie die Serin/ Threonin-Phosphatase, die Tyrosinphosphatasen und die Thyrosin/ Threonin-Phosphatase. Diese wirken durch Dephosphorylierungsprozesse den Effekten von Wachstumsfaktoren und der AT1-Rezeptoren entgegen und vermitteln antiproliferative Effekte. Zudem sind sie in der Lage die Apoptose zu induzieren (Steckelings et al. 2005). Ein weiterer Signaltransduktionsmechanismus ist das NO/cGMP System, welches in vaskulären und neuronalen Geweben präsent ist. Hier führt es zur Vasodilatation, verursacht in der Niere die Natriuresis und beeinflusst die neuronale Zelldifferenzierung. Das aktivierte G-Protein ist in der Lage die Phospholipase A<sub>2</sub> zu aktivieren, welche über die Freisetzung von Arachidonsäure weitere Wirkungen vermittelt. Der vierte Signaltransduktionsmechanismus führt über die Synthese von Ceramiden zur Aktivierung der Caspase 3 und darauffolgend zu proapoptotischen Prozessen. Neben diesen vier Mechanismen konnte für den AT2-Rezeptor ein „Binding Protein“ isoliert werden, das nach Bindung an den exprimierten Rezeptor die Aktivität von Proteinkinasen vermindert. Zudem soll das Protein die Expression des Rezeptors steigern und antiproliferative Wirkungen vermitteln (Ganten et al. 2006). Die Expression des AT2-Rezeptors nimmt post partum stark ab, wodurch das Vorkommen des Rezeptors im adulten Organismus auf wenige Organe beschränkt ist (Castro-Chaves and Leite-Moreira et al. 2004). Der Rezeptor kommt im Nebennierenmark, Uterus, Ovar, bestimmten Hirnregionen und in Endothelzellen vor. Kardial wird der AT2-Rezeptor von den Kardiomyozyten und den Endothelzellen der koronaren Herzgefäße exprimiert. Die Intensität der Expression wird durch Kardiomyopathien, Gefäßverletzungen, Nierenschädigung, Hirnschädigungen oder einfachen Wundheilungen gesteigert, ist aber unabhängig von der AngII Konzentration (Ruiz-Ortega et al. 2003). In weitaus höherer Konzentration wird der AT2-Rezeptor in fetalem Gewebe einschließlich des Gehirns exprimiert. Dies legt den Verdacht nah, dass er eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Gewebe (vor allem Hirn und Niere) übernimmt.

Es wird angenommen, dass die Wirkungen des AT2-Rezeptors, denen des AT1-Rezeptors entgegengesetzt sind, jedoch werden sie unter physiologischen Bedingungen immer durch die Effekte des AT1-Rezeptors überdeckt, da dieser in viel höherer Konzentration vorhanden ist (Rompe et al. 2010). Zu den vermittelten renalen Effekten gehören unter Anderem: Zelldifferenzierung, Vasodilatation, Inhibition der Zellproliferation, Apoptose und das Remodeling der extrazellulären Matrix.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelter Angiotensin II Typ2-Rezeptor. (AT2-Rezeptor). Dargestellt wird die transmembrane Position des Rezeptors, der aus sieben miteinander verbundenen Glykoproteinen besteht und an dessen intrazellulären Anteilen ein G-Protein gekoppelt ist (angelehnt an Dinh et al (Dinh et al 2001))

#### 4.8 Therapieansätze der chronischen Niereninsuffizienz

Obwohl das Verständnis der Pathogenese der chronischen Glomerulonephritiden immer besser wird, stehen keine zufriedenstellenden Therapiekonzepte zur Verfügung. Sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin kann daher der Verlauf der Erkrankung nicht aufgehalten oder rückgängig gemacht werden, sondern es kann lediglich die Progression der CNI verlangsamt werden mit dem Ziel das bestmögliche Befinden des Patienten längstmöglich aufrecht zu erhalten.

Im Vordergrund einer jeden Therapie steht die Behandlung der Grunderkrankung. Dies ist im Fall der CNI meist nicht möglich, da die Ursache der Krankheitsentstehung häufig unbekannt ist. Oft entsteht die CNI aus idiopathischen, seltner aus hereditären Ursachen, welche sich in einem späteren Stadium der Erkrankung kaum noch ausmachen lassen. Somit bleibt nur die symptomatische Therapie, die bei der CNI sehr effektiv sein kann. Die Therapie beginnt mit dem Ausgleich des Flüssigkeits- und Säure-Base-Haushaltes (Suter et al. 2006). Dabei werden die Tiere mit Ringer-Laktat-Lösung und 5 % Glukose-Lösung infundiert, wobei die Infusionslösung in der Regel mit Natriumbikarbonaten supplementiert wird. Zeigen die Tiere zusätzlich gastrointestinale Störungen, wie z.B. Magengeschwüre, Erbrechen und/ oder Diarrhoe, so erfolgt eine Therapie mit H<sub>2</sub>-Blockern, wie Cimetidin oder Ranitidin, die Gabe von Antiemetika, wie Maropitant, und die Applikation von Antacida. Der nächste therapeutische Schritt besteht darin, die Tiere zur Nahrungsaufnahme zu bewegen, so dass sie die katabole Stoffwechsellage überwinden. Unter Umständen kann die Zwangsernährung indiziert sein

oder die Applikation von Benzodiazepinen in geringen Dosen zur Appetitanregung. Auf lange Sicht muss die Ernährung der Tiere auf eine spezifische Nierendiät umgestellt werden, bei der der Proteingehalt und der Phosphatgehalt des Futters stark gesenkt wurde (Farr and Smadel et al. 1939, Jacob et al. 2002, Suter et al. 2006). Bei Hunden beispielsweise sollte der Proteingehalt bezogen auf die Trockensubstanz zwischen 14-16 % liegen, wobei nur hochwertige Proteine verfüttert werden dürfen, um das Stoffwechselgleichgewicht langfristig aufrecht zu erhalten (Suter et al. 2006). Der Phosphatgehalt des Futters darf 0,15-0,3 % bezogen auf die Trockenmasse nicht überschreiten, um die Hyperphosphatämie zu senken. Geschieht dies nicht, muss die Absorption im Darm vermindert werden. Des Weiteren sollte eine Therapie mit ACE-Hemmern begonnen werden, die das Ziel verfolgt, die negativen Wirkungen des AngII, die über die Stimulation der dominant exprimierten AT1-Rezeptoren vermittelt werden, zu unterbinden (Remuzzi et al. 1990). Dies hat zur Folge, dass unter der Therapie die Proteinurie und der renale Blutdruck gesenkt werden und somit die Progression der Erkrankung verlangsamt wird.

Eine Niereneratztherapie, wie sie in der Humanmedizin existiert mit der Haemodialyse und der Nierentransplantation, ist in der Tiermedizin möglich aber mit hohem Aufwand und Kosten verbunden und daher wird sie nur selten angewandt.

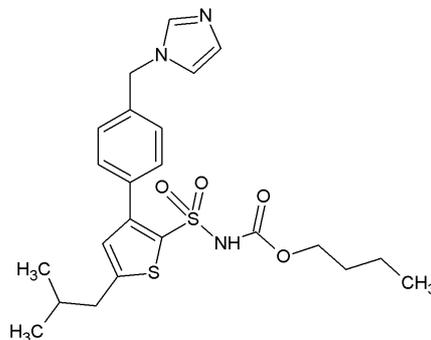
### **4.9 Das Modell der Anti-Thy1-induzierten cGS der Ratte**

Zur Induktion der Anti-Thy1-induzierten chronischen Glomerulosklerose (cGS) wird der mAb 1-22-3-Antikörper genutzt. Dieser monoklonale Antikörper ist spezifisch gegen ein Thy1-ähnliches-Epitop, welches bei Ratten auf der Oberfläche von Mesangialzellen exprimiert wird, gerichtet und hat somit auf diesen Zelltyp eine Wirkung (Krämer et al. 2007). Nachdem der mAb 1-22-3 Antikörper die Epitope der Mesangialzellen gebunden hat, werden die Zellen durch komplementvermittelte Lyse zerstört und die Architektur des Glomerulums kann nicht mehr gewährleistet werden. Die daraufhin in den Glomeruli auftretende Reaktion gleicht der mesangioproliferativen Glomerulonephritis des Menschen.

Die Kombination aus Antikörper und Uninephrektomie stellen einen initialen Reiz dar, der zu einer Autoprogression der Erkrankung führt, bei der eine vollständige Ausheilung nicht eintreten kann. Dabei beginnt die cGS mit einer kurzen inflammatorischen, mesangioproliferativen Glomerulonephritis und geht über in eine eigenständig fortschreitende Erkrankung, die mit einer autoprogressiven Funktionsverschlechterung der Niere einhergeht. Ohne Intervention führt die cGS in einem Zeitraum von wenigen Monaten zum Versterben der Tiere.

#### 4.10 Compound 21

Die schwedische Forschergruppe um Y. Wan hat 2004 Compound 21 (C21) von der Ursprungssubstanz L-162,313 abgeleitet (Wan et al. 2004). Compound 21 ist der erste selektive, nicht-peptidische AT<sub>2</sub>-Rezeptor Agonist, der in der Forschung neue Wege zur Untersuchung des RAS eröffnet. Lange Zeit wurde angenommen, dass die Wirkungen des AT<sub>2</sub>-Rezeptors denen des AT<sub>1</sub>-Rezeptors entgegengestellt sind. Compound 21 gibt nun zum ersten Mal die Gelegenheit, die Wirkungen des AT<sub>2</sub>-Rezeptors durch eine direkte und selektive Stimulation zu untersuchen. Die Bioverfügbarkeit des Compound 21 liegt bei oraler Applikation bei 20-30 % und die biologische Halbwertszeit beträgt ca. 4 h in der Ratte (Wan et al. 2004).



**Abbildung 5:** Schematische molekulare Struktur des Compound 21. O = Sauerstoff, S = Schwefel, CH<sub>3</sub> = Methylgruppe, N = Stickstoff, NH = Aminogruppe (Wan et al. 2004)

#### 4.11 Fragestellung

Mit der vorliegenden Arbeit sollen die Wirkungen des AT<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten Compound 21 auf das Krankheitsgeschehen der chronischen Glomerulosklerose der Ratte näher charakterisiert werden. Es soll untersucht werden, ob eine direkte AT<sub>2</sub>-Rezeptor Stimulation positive, also antifibrotische, antiinflammatorische und antiproliferative Wirkungen im Fall der cGS zur Folge hat und in wieweit diese Behandlung den chronisch-progressiven Krankheitsverlauf beeinflusst.

Fragestellungen:

- Welchen Einfluss nimmt die direkte Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors durch Compound 21 auf den chronisch-progressiven Krankheitsverlauf der cGS ?
- Führt die Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors durch Compound 21 zu antifibrotischen, antiinflammatorischen und antiproliferativen Effekten?

## **5 Material und Methoden**

### **5.1 Materialien**

Alle verwendeten Materialien wurden, wenn nicht anders aufgeführt von der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

### **5.2 Tierversuch**

Der durchgeführte Tierversuch sowie die an den Tieren vorgenommenen Eingriffe wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt und sie werden dort unter der Tierversuchsnummer G 0096/ 09 geführt.

Bei der Durchführung der Eingriffe an den Versuchstieren wurden alle Vorschriften des Tierschutzgesetzes befolgt und bei der Beseitigung der getöteten Tiere wurde § 8 Abs. 1 und 2 des Tierkörperbeseitigungsgesetzes eingehalten.

#### **5.2.1 Tiere**

Für den Versuch wurden 30 männliche Wistar-Ratten von der Firma Charles River (Sulzfeld) verwendet, mit einem Körpergewicht zwischen 180g bis 200g und einem Lebensalter von ca. 6 Wochen.

#### **5.2.2 Tierhaltung**

Die Tiere wurden in der Versuchstierhaltung des Center for Cardiovascular Research in der Hessischen Str. 3-4, Berlin in dreier Gruppen in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus und unter konstanten 22 C° gehalten. Ihr Wohlbefinden und ihr Körpergewicht wurden täglich durch den Doktoranden und die Tierpfleger kontrolliert.

#### **5.2.3 Futter und Trinkwasser**

Die Tiere bekamen vom Tag der Einstellung an bis zum Tag der Tötung Zuchtfutter für Ratten (#1314, Altromin, Lage) (**Tabelle 3**), welches sich aufgrund eines erhöhten Proteingehaltes vom einfachen Haltungsfutter (Rohproteingehalt: 22,5 %) differenziert. Das Futter wurde, wie das Wasser auch ad libitum angeboten. Mit dieser Form der Fütterung wurde die Nierenschädigung verstärkt.

Inhaltsstoffe	Menge
Rohprotein	22,50%
Lysin	1,20%
Rohfett	5,00%
Rohfaser	4,50%
Rohasche	6,50%
Kalzium	0,90%
Phosphor	0,70%
Zusatzstoffe	Menge/ kg
Vitamin A	1500 IE
Vitamin D <sup>3</sup>	600 IE
Vitamin E	75 mg
Kupfer	5 mg

**Table 3:** Liste der Inhaltsstoffe und Zusatzstoffe des Zuchtfutters für Ratten von Altromin (#1314)

#### 5.2.4 Wirkstoff und Wirkstoffzubereitung

Das Compound 21 lag in Pulverform vor und wurde für die Applikation in PBS gelöst. Die applizierte Dosis des Compound 21 betrug 0,3 mg/ kg KG (entspricht einer Menge von 0,09 mg für eine Ratte mit einem Körpergewicht von 300 g). Die Applikation wurde per os (p.o.) durchgeführt unter zur Hilfenahme einer Pipette (Eppendorf Pipette, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg). Das Compound 21 hat eine orale Bioverfügbarkeit von 20-30 %. Die biologische Halbwertszeit in der Ratte beträgt ca. 4 Stunden. Die Behandlung der Tiere wurde 14 Tage nach der Induktion der Erkrankung gestartet. Die Tiere wurden einmal täglich mit Compound 21 behandelt über 20 Wochen.

#### 5.2.5 Die Anti-Thy1-induzierte cGS der Ratte

Das Tiermodell der Anti-Thy1-induzierten chronisch-progressiven Glomerulosklerose der Ratte wurde durch unsere Arbeitsgruppe erstmalig in Deutschland etabliert. Dies erfolgte vor allem durch die Arbeit von Frau Dr. Stephanie Krämer und Herrn Dr. Sebastian Martini. Das Modell beruht auf dem Einsatz des mAb 1-22-3 Antikörpers. Dieser monoklonale Antikörper ist gegen ein Thy1 ähnliches Epitop der Mesangialzellen des Glomerulums gerichtet und für die Herstellung des Antikörpers wurden monoklonale Maus-Hybridoma-Zellen der mAb 1-22-3 Stammsammlung (Center of Applied Microbiology and Research, Salisbury, England) in

Kultur gebracht. Dabei wurde eine antikörperhaltige Lösung produziert, die nach einer Aufarbeitung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde. Das Thyl ähnliche Epitop ist spezifisch für die Mesangialzellen und nachdem der Antikörper das Epitop gebunden hat, kommt es zur komplementvermittelten Mesangialzellyse. Eine der Aufgaben der Mesangialzellen ist die Aufrechterhaltung der Architektur des Glomerulums und durch den Verlust dieser Zellen ist die Stabilität des Glomerulums nicht mehr gegeben. Als Resultat tritt im Glomerulum ein partieller Funktionsverlust ein. Diese Form der Nierenschädigung läuft in drei zeitlich von einander getrennten Phasen ab und am Ende einer akuten Nephritis steht immer die vollständige funktionelle und anatomische Regeneration der Niere. Durch eine linksseitige Uninephrektomie vor der Antikörperinjektion kann die Regeneration der Niere verhindert werden und es kommt zum chronisch-progressiven Funktionsverlust mit narbigem Umbau der Niere.

Für die Uninephrektomie wurden die Tiere mittels Isofluran narkotisiert. Die Tiere wurden in einen Acrylglaszylinder verbracht in den ein Isofluran/ Sauerstoff Gemisch geleitet wurde. Nach kurzer Zeit erreichten die Tiere das Toleranzstadium und wurden aus dem Zylinder entnommen und auf einer Wärmeplatte auf der rechten Seite liegend fixiert. Vor der Fixierung wurde die linke Flanke kaudal des Arcus costae in einer Fläche von ca. 6 bis 8  $\text{cm}^2$  geschoren und mit Alkohol desinfiziert. Der Eingriff begann mit einem ca. drei cm langen Hautschnitt parallel zum Rippenbogen. Anschließend wurde der Musculus obliquus abdominalis externus, der Musculus obliquus abdominalis internus und der Musculus transversus abdominalis mit einem Scherenschlag durchtrennt. Im folgenden Schritt wurde das Peritoneum eröffnet, so dass ein freier Blick auf die linke Niere des Tieres bestand. Unter Vorlagerung der Niere konnte die Vena und Arteria renalis freigelegt werden. Auf die Gefäße wird eine Moskitoklemme gesetzt. Proximal der Schere wurde eine Massenligatur gelegt und distal der Klemme wurde die Niere abgesetzt ohne das Gewebe zurückblieb. Die Klemme wurde vorsichtig geöffnet und der Gefäßstumpf auf eventuelle Blutungen kontrolliert. Hatte die Ligatur einen sicheren Sitz wurde der Gefäßstumpf in das Abdomen zurückverlagert und anschließend konnte das Peritoneum mit der Bauchmuskulatur mittels Sultanscher Diagonalhefte wieder vernäht werden. In der gleichen Weise wurde mit der Haut verfahren. Bereits vor der Operation bekamen die Tiere zur Analgesie Temgesic subkutan (s.c.) injiziert. Post operativ wurden sie zusätzlich p.o. mit 100 mg/ kg Novalgin (Novaminsulfon 500 mg/ ml, Wintrop Arzneimittel GmbH, Fürstenfeldbruck) versorgt und zweimal täglich visitiert.

Durch die Kombination aus Uninephrektomie und Antikörperinjektion wurde eine chronische Reizung des verbliebenen Nierengewebes erreicht, welche zum chronisch-progressiven Verlauf der Erkrankung führte und klinisch durch eine sich steigernde Proteinurie gekennzeichnet

war. Der mAb 1-22-3 Antikörper wurde drei Tage post operationem den Tieren injiziert in einer Konzentration von 4 mg Antikörper/ kg KG. Dazu wurden die Tiere erneut mittels Isofluran in Narkose versetzt. Die Injektion des Antikörpers musste streng intravenös (i.v.) geschehen und um eine Punktion der Schwanzvene zu erleichtern, wurde der Schwanz der Ratten für ein bis zwei Minuten in ca. 40 °C warmes Wasser gelegt. Dadurch bedingt kam es zu einer lokalen Vasodilatation, die mit der Vergrößerung des nun leichter zu punktierenden Gefäßlumens einherging. Fünf Tage nach der Antikörperinjektion wurden die Ratten für 24 h in metabolische Käfige gesetzt, um den Urin zu sammeln. Im Urin wurde der Proteingehalt zur Überprüfung der richtigen Injektion des Antikörpers bestimmt. Zudem konnten so Tiere die auf die Injektion des Antikörpers reagierten (Responder) von Tieren die nicht oder nur schwach auf die Injektion des Antikörpers reagierten (Nonrespondern) differenziert werden.

### 5.3 Studienprotokoll

Dreißig männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht zwischen 180g und 200g und einem Lebensalter von 6 Wochen wurden direkt nach ihrer Ankunft in der Tierhaltung gemischt, um eventuelle Verwandtschaften in einer Gruppe auszuschließen und bei dieser Gelegenheit wurden die Tiere zu dritt in einen Käfig gesetzt. Nach der Bestimmung der ersten Proteinurie wurden die Tiere randomisiert, so dass die cGS Ko-Gruppe und die cGS + C21-Gruppe den gleichen durchschnittlichen Wert der Proteinurie aufwiesen. Dabei wurden die drei Versuchsgruppen gebildet: Eine gesunde Kontrollgruppe (zweierige Tiere ohne Therapie), eine kranke Kontrollgruppe (Uninephrektomie (Uni-NX) + Antikörperinjektion, ohne Therapie) und eine kranke, mit Compound 21 behandelte Gruppe (Uni-NX + Antikörperinjektion, mit Therapie) (**Tabelle 4**). Die Uninephrektomie und die anschließende Antikörperinjektion wurden eine Woche nach Ankunft der Tiere durchgeführt, damit für die Tiere die ausreichende Möglichkeit bestand sich an die neuen Begebenheiten zu akklimatisieren.

Gruppe	Uninephrektomie	Antikörperinjektion	Compound 21 Behandlung
Kon (n = 6)	Nein	Nein	Nein
cGS (n = 12)	Ja	Ja	Nein
cGS+C21 (n = 12)	Ja	Ja	Ja

**Tabelle 4:** Einteilung der Versuchstiere in die unterschiedlichen Versuchsgruppen mit Angabe der an ihnen durchgeführten Eingriffe

## **5.4 Versuchsparmeter**

Zur Verlaufskontrolle wurde während des Versuches in regelmäßigen Abständen die Proteinurie bestimmt. Des Weiteren wurde am Ende des Versuches der Blutdruck der Tiere plethysmographisch festgestellt.

### **5.4.1 Blutdruck**

Der systolische Blutdruck wurde plethysmographisch (Life Science Instruments Ltd, Woodland Hills, Californien, USA) an der Schwanzarterie der Ratten gemessen. Für diese Messung wurden die Tiere trainiert, um den Stress, der die Messwerte beeinflussen könnte, so gering wie möglich zu halten. Die Ratten wurden für die Messung in eine Akrylglasröhre geleitet, die der Fixierung der Tiere diente. Zur Beruhigung der Ratten wurde die Röhre zusätzlich abgedunkelt. Die Manschette des Blutdruckmessgerätes, in der ein Sensor integriert war, wurde über den Schwanz bis 1 cm vor die Schwanzwurzel gezogen. Bei jedem Tier erfolgte eine dreimalige Messung des systolischen Blutdrucks und als Messwert diente der daraus gebildete Mittelwert.

Die Messungen wurden auf einer Wärmeplatte durchgeführt, so dass die Gefäße des Schwanzes dilatierten. Zu Trainingszwecken wurde der Blutdruck zweimal während des Versuches gemessen und die finale Blutdruckmessung fand 24 h vor der Tötung der Tiere statt.

### **5.4.2 Urinsammlung**

Um die Nierenfunktion zu überwachen, wurde alle vier Wochen der Proteingehalt im Urin der Tiere bestimmt. Dazu mussten die Tiere vorab für 24 Stunden in metabolische Käfige (Metabolic Cage-3701M081, Techniplast, Bagaggiato, Italien) verbracht werden. In diesen wurden sie einzeln auf Gittern gehalten, so dass Urin und Kot getrennt voneinander gesammelt werden konnten. Der Käfig enthielt ein spezielles Trichtersystem, welches den ausgeschiedenen Harn in graduierte Auffangröhrchen leitete und verhindern sollte, dass es zu einer Kontamination des Harns mit Futterresten oder Kot kam. Ein anderes Problem hätte durch übermäßiges Wachstum von Mikroorganismen im Urin entstehen können, denn diese würden die Proteine des Urins abbauen. Die mikrobielle Beeinflussung des Proteingehaltes wurde verhindert, in dem die Auffangröhrchen mit 0,1 ml Penicillin/ Streptomycin (10.000 IU/ ml) (Biochrom KG, Berlin) versehen wurden, so dass die Bakterien im Wachstum gehemmt wurden. Nach 24 h wurden die Tiere wieder aus den Käfigen entnommen. Das gesamte Harnvolumen jedes Tieres wurde notiert und von jedem Tier wurden 2 ml Harn in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Zur weiteren Verwendung, der so gewonnenen Proben, wurde der Urin zunächst für 5 Minuten bei 2100 g zentrifugiert.

Dadurch setzten sich größere Schwebeteilchen ab, die eine spätere photometrische Messung stören würden. Der Überstand wurde in neue 2 ml Reaktionsgefäße pipettiert und für folgende Analysen bei -20°C gelagert.

### **5.4.3 Tötung der Tiere**

Am Ende des Versuches wurden die Tiere mit einer Mischung aus Ketamin (50 mg/ kg KG, Ketamin 10 %ige Injektionslösung WDT, Garbsen) und Xylazin (10 mg/ kg KG, Rompun 2 %ige Injektionslösung, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) narkotisiert. Diese wurde intra peritoneal (i.p.) in einer Mischspritze appliziert.

### **5.4.4 Blut- und Organentnahme**

Das Abdomen der narkotisierten Tiere wurde mit Sterilium (Bode Chemie, Hamburg) desinfiziert. Danach wurde der Bauchraum mit einem halbmondförmigen Scherenschnitt, der einen halben Zentimeter kaudal des Präputiums begonnen wurde, eröffnet und jeweils zum rechten und linken Rippenbogen fortgeführt. Der so isolierte Lappen wurde nach kranial über den Thorax verlagert, so dass eine freie Sicht auf das Darmkonvolut der Tiere möglich war. Das Konvolut wurde aus dem Abdomen entnommen und zur Seite verlagert, so dass die Aorta abdominalis und die Vena cava caudalis dargestellt werden konnte. Zur Vereinfachung der Punktion der Aorta abdominalis wurde dessen Endaufzweigung stumpf frei präpariert. Die freiliegende Endaufzweigung wurde vorsichtig mit einer Kanüle (Sarstedt Multifly Set, Nümbrecht) punktiert und unter vorsichtigem Vorschieben wurde die Kanüle in eine sichere Position für die Blutentnahme gebracht. Die Butterflykanüle war mit einer S Monovette (9ml mit EDTA, Sarstedt, Nümbrecht) verbunden, mit welcher durch die Erzeugung eines Unterdrucks so viel Blut wie möglich entnommen wurde. Vor der Punktion wurde die Kanüle mit Heparin (Rotexmedica GmbH Arzneimittelwerk, Trittau) gespült, um eine Gerinnung des Blutes darin zu vermeiden. Durch die Blutentnahme und den damit verbundenen Volumenverlust kam es zum Herzstillstand. Trat dieser ein wurde die S-Monovette entfernt und durch eine Spritze (BD Discardit<sup>TM</sup> II Spritzen, BD Heidelberg) ersetzt. Diese enthielt 20 ml eiskaltes PBS, welches für die Perfusion der Organe des Tieres genutzt wurde. Insgesamt wurde das Tier mit mindestens 60 ml eiskaltem PBS perfundiert. Durch die Volumensubstitution fing das Herz erneut an zu schlagen. Das Ziel der Perfusion ist es, den Großteil der Erythrozyten aus den Gefäßen und Organen zu spülen, so dass die gewonnen Proben später besser ausgewertet werden konnten. Im darauf folgenden Schritt wurden beide oder der Gruppenzugehörigkeit des Tieres entsprechend eine Nieren mit einem Scherenschnitt entnommen und in ein 50 ml Falcon Tube (BD Falcon Tubes, BD Heidelberg), welcher mit eiskaltem PBS gefüllt war, gegeben.

Das gewonnene Blut wurde in ein Heparinröhrchen überführt und dann bei 2100 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Haematokrit der Tiere bestimmt und 2 ml des gewonnenen Plasmas für nachfolgende Untersuchungen bei -20 °C in 2 ml Reaktionsgefäßen aufbewahrt.

### **5.4.5 Aufarbeitung der Proben**

Die gewonnenen Nieren wurden von ihrer Kapsel befreit und gewogen, um das absolute Gewicht zu bestimmen. Dann wurden sie mit einer Rasierklinge in der Sagittalen halbiert. Die deutlich sichtbare Papille und das restliche Bindegewebe wurden mittels einer kleinen Schere abgetrennt und verworfen, so dass nur die Nierenrinde verblieb. Von jeder Nierenhälfte wurden die Pole abgetrennt, in Kryotubes (KryoTubes<sup>TM</sup>, NUNC<sup>TM</sup> Brand Products, Denmark) verbracht und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Ein Streifen der Niere wurde nach Carnoy und ein weiterer Streifen der Niere wurde mit Formalin fixiert.

## **5.5 Krankheitsparameter**

Zur Evaluierung der chronischen Glomerulosklerose und der Effekte der Compound 21-Behandlung wurden die entnommenen Proben der Nieren und die gewonnenen Urin und Plasma Proben auf verschiedenen Parameter hin untersucht.

Die Nierenfunktion und der Grad der Nierenschädigung wurden durch die Bestimmung der Proteinurie und des Kreatinin- und Harnstoffgehaltes im Plasma analysiert. Die morphologischen Veränderungen wurden histologisch anhand gefärbter Gewebsschnitte untersucht. Diese Färbungen lassen außerdem eine Einteilung der Tiere durch den Matrixscore zu, welcher die Intensität der tubulointerstitielle Matrixprotein-Expression angibt. Histochemische Färbungen ermöglichen zudem Aussagen über den Gehalt an Proliferating Cell Nuclear Antigen-positiven Zellen (PCNA), Ektodysplasie 1-positiven Zellen (ED1), Cluster of Differentiation 3-positiven Zellen (CD3) und Kol I.

Die relative mRNA (Messenger Ribonucleinsäure)-Expression von bestimmten Proteinen wurde durch die RT-PCR (Realtime-Polymerase Chain Reaction) untersucht. Die wichtigsten Parameter sind TGF- $\beta$ , alpha-Smooth Muscel Actin ( $\alpha$ -SMA), PAI-1, Kol I, Fibronectin und die Rezeptorsubtypen des AngII.

### **5.5.1 Messung der Proteinurie**

Die Proteinurie wurde mit der Pyrogallol-Rot-Methode in 96 Well Mikrotiterplatten (Watanabe N, Clin Chem, 1986; Fluitest USP, Pyrogallol Rot Methode, Firma Biocon, Vöhl-Marienhagen) bestimmt. Bei dieser Methode reagierten die Proteine im Harn mit

Pyrogallol-Rot-Molybdat und bildeten dabei einen purpur farbenden Komplex. Die Intensität der Färbung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 580 nm gemessen und sie war direkt proportional zum Proteingehalt, so dass dieser errechnet werden konnte.

Zu Beginn wurde eine Standardreihe mit einer Proteinkonzentration von 0, 1, 2, 3, 4 und 5 g/l hergestellt. Für die erste Messung wurde der Urin im Verhältnis von 1:2 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Von jeder verdünnten Probe wurden zweimal 10 µl zur Doppelbestimmung entnommen und in eine 96 Well Mikrotiterplatte pipetiert. Zu den 10 µl der Probe wurden 350 µl des Pyrogallol Rot Reagenz gegeben. Dieses wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach folgte die Extinktionsmessung am Plattenphotometer Tecan Sunrise (Tecan Austri GmbH, Österreich). Zur Berechnung des Proteingehaltes der Urinproben wurden die ermittelten Extinktionswerte in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Proteinurie (mg/d)} = \frac{\text{E (Probe)} * \text{Harnvolumen (l)} * \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{E (Standard)}}$$

**Abbildung 6:** Formel zur Berechnung des Proteingehaltes des Urins aus der gemessenen Extinktion der Proben. E = Extinktion; mg = Milligramm; d = Tag; l = Liter

Überstiegen die Extinktionswerte der Proben die Extinktionswerte der Standardreihe, so mussten die Harnproben weiter verdünnt werden. Dazu wurden zu 50 µl der vorherigen Verdünnungsstufe 50 µl physiologische Kochsalzlösung gegeben, so dass eine Verdünnung von 1:4 entsteht. Danach wurde wie oben beschrieben erneut die Extinktion der Proben gemessen und waren die Werte wiederholt zu hoch so wurden die Proben solange verdünnt, bis die Extinktionswerte der Proben unter denen der Standardreihe lagen.

### 5.5.2 Berechnung der glomerulären Filtrationsrate

Die Nierenfunktion wurde durch die Bestimmung der Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen im Serum erfasst. Die Bestimmung dieser Parameter erfolgte in einem Fremdlabor (Labor 28 AG, Medizinisches Versorgungszentrum, Mecklenburgische Strasse 28, Berlin) nach den dortigen Messprinzipien und -protokollen. Durch die Bestimmung der Kreatinin Konzentration im Urin und im Serum war es möglich die Kreatinin-Clearance zu berechnen und sich somit der glomerulären Filtrationsrate zu nähern. Kreatinin ist eine harnpflichtige Substanz, die nicht tubulär rückresorbiert wird. Das bedeutet, dass jedes Kreatininmolekül welches glomerulär filtriert wurde, auch über den Harn ausgeschieden wird. Kreatinin wird aber zu einem geringen Teil tubulär sezerniert, wodurch die Kreatinin-Clearance falsch hoch erscheinen kann. Die glomeruläre Filtrationsrate gibt die Menge des gesamten von beiden Nieren produzierten Primärurins pro Zeiteinheit und

bezogen auf das Körpergewicht der Tiere an und gibt somit Aufschluss über die Nierenfunktion.

### **5.6 Histologie**

#### **5.6.1 Einbettung und Anfertigung der histologischen Schnitte**

Die gewonnenen Gewebeprobe wurden auf zwei verschiedene Arten fixiert.

Die erste Form der Fixierung war die nach Carnoy. Die Gewebe wurden dafür direkt nach der Gewinnung für 2,5 h in Carnoy-Lösung (60 % Methanol, 30 % Chloroform, 10 % Essigsäure) gegeben. Zur Dehydrierung der Proben folgte ein 12 stündiges Bad in absolutem Alkohol. Danach wurden sie für eine Stunde in Xylol gegeben, welches das Intermedium für das Paraffin darstellt, in welches die Proben nachfolgend für 12 h gegeben wurden. Das Paraffin hatte eine Temperatur von 69 °C. Nachdem die Proben diese Prozedur durchlaufen hatten, wurden sie in frischem Paraffin in Blöcke ausgegossen.

Die andere Form der Fixierung ist die Formalin Fixierung. Hierfür wurden die Proben direkt nach der Gewinnung für 12 h in 4 % iges neutralgepuffertes Formalin gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte ein einstündiges Spülen zur Entfernung überflüssigem Formalins unter fließendem Leitungswasser. Die gesäuberten Proben durchliefen eine aufsteigende Alkoholreihe (1 h 70 % Ethanol, 1 h 96 % Ethanol, 2 x 30 min 100 % Ethanol) und wurden anschließend noch zweimal für 30 min in Xylol inkubiert. Nach 12 stündiger Lagerung der Proben in Paraffin (69°C) wurden diese mit frischem Paraffin in Blöcke ausgegossen. Zur Aushärtung standen sie auf der Kühlplatte der Ausgießstation (TES 4004 pfm. Produkte für die Medizin AG, Köln).

Mit einem Rotationsmikrotom (Rotary 3003, Pfm AG, Köln) wurden 1-3 µm dicke Schnitte von den Blöcken angefertigt, die in einem 25 °C warmen Wasserbecken aufgefangen wurden. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 40 °C im Wärmeschrank fixiert.

Um histochemische Färbungen durchführen zu können, mussten die Schnitte entparaffiniert werden, da die meisten Farbstoffe, die für diese Form der histologischen Färbung verwendet werden, hydrophil sind. Die Entparaffinierung erfolgte durch ein zweimaliges Bad in Xylol für fünf Minuten. Darauf folgt die notwendige Rehydrierung, in dem die Schnitte eine absteigende Alkoholreihe durchliefen (2 x 100 % Ethanol, 2 x 96 % Ethanol, 1 x 70 % Ethanol).

### 5.6.2 PAS-Reaktion

Für die Herstellung Perjodsäure Schiffs (PAS)-gefärbter Gewebsschnitte wurden die nach Carnoy fixierten, entparaffinierten Schnitte als erstes für 10 min in eine Perjodsäurelösung (**Tabelle 5**) gegeben und danach mit warmem, fließendem Leitungswasser gespült. Es folgt eine 20 minütige Inkubation der Schnitte in Schiffs-Reagenz (**Tabelle 5**) mit nachfolgender Spülung in einer alkoholischen Kalium Disulfidlösung (**Tabelle 5**). Darauffolgend wurden die Schnitte für weitere 10 min unter warmem, fließendem Leitungswasser gespült. Es folgte eine Gegenfärbung in Meyers-Haemalaun für 5 min mit anschließendem Bläuen in fließenden, warmen Leitungswasser. Die Schnitte wurden durch das Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 x 70 % Ethanol, 2 x 96 % Ethanol, 2 x 100 % Ethanol und 2 x Xylol) dehydriert und mit Corbitbalsam eingedeckt. Durch die PAS Färbung werden die Zellkerne blau angefärbt und die Matrixproteine erscheinen in einem leuchtenden Magenta.

Lösung	Inhaltsstoffe
Alkoholische Perjodsäurelösung	1 g Perjodsäure / 100 ml 70 % Ethanol
Alkoholische Disulfidlösung	0,5 g K-Disulfid / 100 ml 70 % Ethanol
Schiffsches Reagenz	Merck, auf 40°C erwärmen

**Tabelle 5:** Für die PAS-Reaktion verwendete Reagenzien

Die PAS-Reaktion dient dem Nachweis von sauren Mukopolysacchariden, welche einen Großteil der extrazellulären Matrix bilden. Die Mukopolysaccharide bilden durch eine Reaktion mit der Schiffs-Reagenz rote Komplexe. Die Intensität der dabei entstehenden Färbung ist direkt proportional zur Expression der Matrixproteine. Somit lässt die PAS-Reaktion eine Einschätzung derer in Form des Matrixscores zu (**Tabelle 6**).

Matrixgehalt	Matrixscore
1- 25 %	1
26- 50 %	2
51- 75 %	3
76- 100 %	4

**Tabelle 6:** Skala zur Erteilung des Matrixscores nach prozentalem Gehalt an Matrixproteinen der Schnitte

### 5.6.3 Immunhistologische Färbungen

Durch immunhistologische Färbungen ist es möglich spezifische Antigene in Geweben darzustellen. Es ist eine 2-Stufen-Fäbetechnik, bei der im ersten Schritt ein spezifisches Antigen an einen Schnitt durch einen Primärantikörper gebunden wird. Im zweiten Schritt wird ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt, der spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet ist und der Detektion dessen dient. Nach der Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper wird ein Chromogen hinzugesetzt, welches durch das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym in einen farbigen Komplex umgesetzt wird. Das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym ist das Horseradish Peroxidase (HRP) und das entsprechende Substrat ist das Chromogen ACE (Ready to use, DAKO, Cytomation, Hamburg). Sie bilden einen rotbraunen Komplex. Bereits vor der eigentlichen Färbung werden zwei Tris Buffered Saline (TBS) Stammlösungen angesetzt (**Tabelle 7**).

Lösung	Inhaltsstoffe
Stammlösung A:	60.55g Trist-Base in 1L aqua dest
Stammlösung B:	87.66g NaCl in 1L aqua dest

**Tabelle 7:** Diese Tabelle gibt die einzelnen Komponenten der Stammlösungen an, die für die die immunhistochemischen Färbungen verwendet wurden

Vor Gebrauch wurden die Lösungen im Verhältnis 1:1:8 mit aqua dest. gemischt und mit 5 molarer Salzsäure-Lösung auf einen pH-Wert zwischen 7,4 und 7,6 eingestellt.

Für die Färbung wurden die rehydrierten Schnitte aus dem aqua dest. entnommen und mit einem Fettstift (DAKO Pen™, DAKO Cytomation, Hamburg) eingekreist, so dass keine Flüssigkeit zwischen den Schnitten ausgetauscht werden kann. Es befanden sich immer zwei Schnitte auf einem Objektträger, von denen einer als Negativkontrolle diente. Dieser wurde nicht mit dem Primärantikörper (**Tabelle 8**) behandelt, sondern nur mit einem Verdünnungsmedium überschichtet, um ihn vor Austrocknung zu schützen. Der andere Schnitt wurde mit Peroxidase-Blocking-Reagent (DAKO Cytomation, Hamburg) für 8 min behandelt und anschließend 2 x 5 min in TBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper für eine Stunde.

Antikörper	Verdünnung	Firma
ED1 (CD69), Maus	1/100	Serotec GmbH, Düsseldorf
PCNA, Maus	1/100	DAKO Cytomation, Hamburg
CD3, Ziege	1/25	Santa CruzBiotechnology, Heidelberg
Kollagen I, Ziege	1/10	Southern Biotec, USA

**Tabelle 8:** Für die immunhistochemischen Färbungen verwendete Primärantikörper

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Schnitte mit TBS-Puffer gespült und der Sekundärantikörper (**Tabelle 9**) auf beide Schnitte des Objektträgers aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Antikörper	Verdünnung	Firma
Kaninchen anti-Maus HRP	1/500	DAKO Cytomation, Hamburg
Kaninchen anti-Ziege HRP	1/500	DAKO Cytomation, Hamburg

**Tabelle 9:** Für die immunhistochemischen Färbungen verwendete Sekundärantikörper

Nach zweimaligen Spülen der Schnitte mit TBS folgte die Inkubation mit dem Substrat ACE, welches von dem am Sekundärantikörper gebundenem HRP umgesetzt wird. Das dabei entstehende Farbsignal wird im Mikroskop (Leitz DM RB Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar) kontrolliert und sobald die Hintergrundfärbung auftritt, wird die Reaktion in aqua dest. gestoppt. Zur Darstellung des farblosen Schnittes erfolgte eine Gegenfärbung mit Meyers-Haemalaun für wenige Sekunden mit anschließendem Bläuen unter warmem, fließendem Leitungswasser. Zuletzt wurden die Schnitte mit einem wässrigen Eindeckmedium (Aquatex<sup>TM</sup>, Merck, Darmstadt) eingedeckt.

### 5.6.4 TUNEL-Assay

Zur Detektion apoptotischer Zellen in Geweben wurde ein Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL)-Assay (ApopTag® Fluorescein In situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon® International, USA & Canada) angefertigt. Das Prinzip des Assays beruhte darauf, dass es bei der Apoptose durch aktivierte Endonukleasen zur Fragmentierung und Kondensierung der DNS einer Zelle kommt. Dabei entstanden zwangsläufig freiliegende 3' OH Enden und 5' OH Enden der einzel- oder doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure (DNS). An die freiliegenden 3' OH Enden der DNS-Stränge wurden mittels Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-Digoxigenin-gelabelte Nukleotide gebunden und somit wurden die DNS-Fragmente markiert. Darauffolgend wurde ein Anti-Digoxigeninantikörper eingesetzt, an dem sich wiederum eine alkalische Phosphatase befand. Diese erzeugte zusammen mit dem Fast-Red, welches nachfolgend auf den Schnitt gegeben wurde, eine rote Farbe, so dass apoptotische Zellen rot angefärbt wurden.

Für die Durchführung des TUNEL-Assays wurden die entparaffinierten Schnitte 5-15 min mit Proteinase K behandelt, um die durch die Formalinfixierung entstandenen Antigen-maskierungen zu lösen. Anschließend wurden sie zweimal für 2 min mit PBS gespült, um alle Reste der Proteinase K zu entfernen. Es folgte eine Inkubation mit 75 µl Equilibration Buffer (10 sec.). Nach Ablauf der Zeit wurde der Puffer entfernt und 55 µl des Tdt auf die Schnitte aufgetragen. So mussten die Schnitte für eine Stunde bei 37 °C inkubieren. Anschließend wurden die Proben einmal für 15 sec mit Waschpuffer gespült, und dann 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal für je eine Minute mit PBS gewaschen. Es folgte eine 30 Minuten andauernde Inkubation mit 65 µl des Phosphatase-gelabelten Anti-Digoxigenin-Antikörpers. Um den Überschuss dessen zu entfernen, wurden die Schnitte 4 x 2 Minuten lang mit TBS gewaschen. Als Substratquelle für die alkalische Phosphatase diente Fast Red, welches zu einem roten Farbkomplex umgesetzt wurde. Die Reaktion erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle und wurde durch Spülen mit aqua dest. gestoppt. Abschließend wurden die Schnitte mit Meyers-Haemalaun gegengefärbt und mit Aquatex eingedeckt.

### 5.6.5 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung der Proben erfolgte lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung und mit Hilfe des computergestützten Histomorphometrie-Programms AxioVision™ (AxioVision™ 4.7, Carl Zeiss, Göttingen). Sie wurde verblindet durchgeführt, also ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit.

Zur Berechnung der glomerulären Fläche und des glomerulären Volumens wurden aus jedem Schnitt 10 zufällig ausgewählte Glomeruli, bei denen mindestens der vaskuläre Pol angeschnitten sein musste, fotografiert. Anschließend wurde in jedem Bild die glomeruläre

Fläche mit AxioVision™ gemessen. Dabei konnte entweder die gesamte Fläche des Glomerulums bestimmt, also mit der Bowmannschen Kapsel oder es nur die Fläche des Kapillarknäuls. In diesem Falle wurde nur die Fläche des Kapillarknäuls gemessen. Nachdem dies von allen zehn Bildern eines Schnittes geschehen war, wurde der Mittelwert gebildet, der der glomerulären Fläche entsprach. Das glomeruläre Volumen wurde mit Hilfe einer Formel berechnet:

$$\text{Glomeruläres Volumen} = \beta / k * (\text{glomeruläre Fläche})^{1,5}$$

**Abbildung 7:** Formel zur Berechnung des glomerulären Volumens aus der glomerulären Fläche.  $\beta = 1,38$  = Idealform des Glomerulums,  $k = 1,1$  = Größenstreuungsfaktor

Zur Untersuchung der fibrotischen, inflammatorischen und proliferativen Veränderungen im renalen Gewebe wurden verschiedene immunhistologische Färbungen angefertigt (ED1 (Makrophagen/ Monozyten), CD3 (T-Lymphozyten), Kol I (Fibrose), PCNA). Dazu wurden pro Schnitt zehn zufällig ausgewählte Bilder des Interstitiums aufgenommen und 10 Bilder zufällig ausgewählter Glomeruli, um eine zusätzliche Differenzierung zwischen dem glomerulären und interstitiellen Gehalt zu ermöglichen. In diesen Bildern wurden die für die entsprechenden Parameter positiven Zellen ausgezählt.

## 5.7 Analyse der mRNS

### 5.7.1 Isolierung und Einstellung der mRNS

Zu Beginn der Isolierung der mRNS aus den Gewebeproben wurden diese aus dem  $-80\text{ °C}$  Tiefkühlschrank entnommen und es wurde von jeder Probe mit Hilfe eines Skalpells ein ca. linsengroßes Stück abgespalten. Das Abspalten findet auf einem in Aluminium eingeschlagenen Kühlakku statt, um das Auftauen der Probe weitestgehend auszuschließen. Das abgespaltete Stück musste unmittelbar in ein Faxröhrchen (BD Falcon, 5 ml Polystyrene Round Bottom Tube, BD Heidelberg) überführt werden, welches mit 1 ml Trizol® (TRIZOL® Reagent, Invitrogen, USA) gefüllt war, um auch hier ein Auftauen der Probe zu verhindern. Anschließend wurde jede Probe homogenisiert bis sich eine milchige, rosagefärbte Lösung ergab. Diese Lösung wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und im Anschluss wurden zu jeder Probe 300  $\mu\text{l}$  Chloroform hinzu pipettiert. Da das Chloroform eine geringere Dichte als die homogenisierte Probe aufwies, bildete sich unverzüglich ein zweiphasiges Gemisch. Um die Phasen zu vermischen, werden die Proben kurz auf dem Vortexer (Vortex-2-Genie Scientific Industries (SI), Bohemia, New York, USA) geschüttelt. Nach einer

Inkubationszeit von 2-3 min bei Raumtemperatur während der sich die RNS im Chloroform löste und die DNS durch das Chloroform ausgefällt wurde, wurden die Proben für 15 min bei 8000 rpm und 4 °C in eine Zentrifuge (Zentrifuge 5417R, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) gegeben. Während der Zentrifugation bildete das Gemisch drei Phasen aus. Die erste rosafarbene Phase enthielt die ausgefallten Gewebereste. Darauf befand sich eine schmale gelblichweiße Phase, welche aus der ausgefallten DNS und Proteinen bestand. Die oberste transparente Phase enthielt die gelöste RNS. Es wurden 300 µl von der obersten Phase entnommen und sie wurden in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 500 µl 2-Propanol gegeben, welches nun die gelöste RNS ausfällt. Um eine ordentliche Durchmischung der Lösung zu erreichen, wurde jede Probe 3x geschwenkt und nachfolgend erneut für 10 min bei 8000 rpm bei 4 °C in die Zentrifuge gegeben. Durch die Zentrifugation bildete die ausgefallte mRNS ein Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde vollständig dekantiert und das Pellet mit 1 ml Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde nach dem Waschen wieder dekantiert und für 2-5 min getrocknet. Abschließend wurden die Pellets der Proben mit 10 µl DEPC-Lösung und einer Pipette durch mehrmaliges Aufziehen resuspendiert. Zur Linearisierung der RNS wurde sie 10 min auf 56 °C erhitzt (TRIO-Thermoblock, Biotron GmbH). Die isolierte RNS wurde im Anschluss mittels Gelelektrophorese hinsichtlich ihrer Qualität untersucht. Dazu wurde ein 2 %iges Agarosegel angesetzt, welches mit 4 µl Ethidiumbromid versetzt wurde. Von den Proben wurden je 1 µl entnommen, 9 µl DEPC-Lösung und 2 µl Blaumarker hinzugefügt. Die so vorbereiteten Proben wurden in die Taschen des Gels pipettiert und im elektrischen Feld bei 80 V für 30 min aufgetrennt. Es wurde erfolgreich reine und intakte RNS isoliert, wenn zwei Banden pro Probe unter UV-Licht sichtbar wurden. Die Banden entsprachen der 18S- und 28S-Untereinheit der ribosomalen RNS. Dem Nachweis der intakten RNS folgte die Feststellung und Einstellung des RNS-Gehaltes der Proben. Für die Messung des RNS-Gehaltes wurde ein Spektrometer (Quantikine, Analyzer, Amersham Biosciences UK Limited, Rainham, England) genutzt. Es wurden 1 µl der Probe mit 99 µl DEPC-Wasser gemischt und in das Spektrometer gegeben, welches dann die Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm durchführte. Die Ergebnisse der Messung wurden genutzt, um die Proben unter Zugabe von DEPC-Wasser auf eine einheitliche RNS-Konzentration von 1 OD (optische Dichte, 1 entspricht 40 µg einzelsträngiger RNS) einzustellen. Durch die 260/280 nm-Ratio wurde gleichzeitig der Reinheitsgrad der Proben bestimmt, da das Spektrometer die Probe einmal bei 260 nm maß und einmal bei 280 nm. Reine mRNS hat bei 260/280 nm einen OD-Wert von 2. Je näher also der OD-Wert der Probe an 2 ist, desto reiner ist die darin enthaltene RNS.

Die so eingestellte RNS wurde bei -80 °C für weitere Analysen gelagert.

### 5.7.2 Reverse Transkription

Da für die RT-PCR cDNS benötigt wurde, musste die vorhandene RNS in einem reverse Transskription Schritt (RT-Schritt) umgeschrieben werden. Für den RT-Schritt wurde ein RT-PCR-Core-Kit (GenAmp, Applied Biosystems, Roche; New Jersey, USA) verwendet, in dem alle für den RT-Schritt notwendigen Komponenten enthalten sind.

Der RT-Schritt begann mit der Herstellung des Mastermix (**Tabelle 10**). Dieser enthielt neben den einzelnen Nukleotiden auch Primer (Random Hexamers) und eine reverse Transskriptase. Die Primer legten sich bei der reversen Transskription als erstes an die korrespondierende einzelsträngige mRNA-Sequenz und bildeten so den Startpunkt für die reverse Transskriptase. Es wurde zu 1 µl Probe 19 µl Mastermix gegeben und dieser Ansatz wurde im Thermocycler erst 10 min bei 25 °C, dann 45 min bei 42 °C und zum Schluss noch mal 5 min bei 95 °C (Trio-Thermoblock, Biometra) inkubiert. Danach wurden die Proben entnommen und es wurde jede auf ein Endvolumen von 40 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt.

Komponenten	Konzentration	µl/ Ansatz
MgCl <sub>2</sub>	5mM	4
Puffer	10x	2
H <sub>2</sub> O		2
dATP	1mM	2
dGTP	1mM	2
dTTP	1mM	2
dCTP	1mM	2
Mulv Reverse Transkripase	2,5U/ µl	1
RNase Inhibitor	1U/ µl	1
Random Hexamers	2,5µM	1
RNS	0,05µg/ µl	1

**Tabelle 10:** Für die reverse Transskription verwendete Bestandteile des Mastermix

### 5.7.3 RT-PCR-Analyse

Für die RT-PCR wurde das Master Cycler System von Eppendorf verwendet (Master Cycler ep realplex<sup>2</sup>S, Eppendorf AG, Hamburg), welches neben der RT-PCR auch eine Quantifizierung der DNS ermöglichte, in dem zwischen den einzelnen Zyklen eine Fluoreszenzmessung durchgeführt wurde. Daher wurde in diesem Fall von einer Real-

Time-PCR gesprochen. Das Fluoreszenzsignal war direkt proportional zur Konzentration doppelsträngigen DNS im Reaktionsansatz. Zur Überprüfung, ob es sich bei der DNS um ein spezifisches Produkt und nicht um unspezifische Produkte oder Primerdimere handelte, wurde nach jeder RT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Jedes DNS-Produkt hat seinen spezifischen Schmelzpunkt. Diese Tatsache hatte zur Folge, dass anhand des Schmelzpunktes von DNS-Produkten zwischen Primerdimeren und verschiedenen RT-PCR Produkten differenziert werden konnte.

Das Prinzip der RT-PCR basiert auf der Aktivität einer Taq-Polymerase, welche an die Primer, die ihr den Start- und Endpunkt vorgaben, band und aus einzelnen Basen einen komplementären DNS-Doppelstrang synthetisierte. Damit diesem Enzym alle nötigen Faktoren zur Verfügung standen, wurde für die RT-PCR ein Mastermix (**Tabelle 11**) angesetzt.

Ansatzkomponenten	Endkonzentration	Menge (µl)
Qmix (10x)	1x	5
Primer (Sense)	20 pmol	0,75
Primer (Antisense)	20 pmol	0,75
DEPC-Wasser		1,5
cDNS	0,05 µg/ml	2

**Tabelle 11:** Bestandteile des Mastermix, der für die RT-PCR angesetzt wurde (Qmix, QuantiFast, Qiagen, Hilden, Deutschland)

Wie beschrieben, wurden zu 2 µl Probe 8 µl Mastermix auf einer 96 Well-PCR-Platte (Twin.tec PCR-Platten, Eppendorf AG, Hamburg) im doppelten Ansatz zugesetzt. Die so präparierte Platte wurde im nächsten Schritt in den Master Cycler gegeben und hier begann die RT-PCR. Initial wurde die cDNS bei 95 °C für 5 min denaturiert, dadurch wurde die doppelsträngige cDNS einzelsträngig und gleichzeitig linearisiert. Dieser Denaturierungsschritt fand nachfolgend nach jedem Zyklus statt, jedoch wurden die Proben dabei nur für 10 sec auf 95 °C erhitzt. Im nächsten Schritt kühlten die Proben ab und die Primer legten sich an die komplementäre DNS-Sequenz (Annealing). Dies geschah bei unterschiedlichen Temperaturen, die immer primerspezifisch waren und dementsprechend am Gerät eingestellt werden mussten. Der auf das Annealing folgende Schritt hieß Elongation. Während dieses Schrittes band die Polymerase an die Primer und synthetisierte den komplementären DNS-Strang. Das geschah innerhalb von 10 sec bei 72 °C. Nun folgte erneut der

Denaturierungsschritt, um den neu synthetisierten DNS-Doppelstrang zu trennen. Nach 40 - 50 solchen Zyklen folgte die zur Spezifizierung der RT-PCR-Produkte notwendige Schmelzkurve (**Tabelle 12**).

RT-PCR-Schritt	Temperatur	Zeit in sec.	Fluoreszenzmessung
Initiale Denaturierung	95 °C	300	
Denaturierung	95 °C	10	
Annealing	primerabhängig	10	50 Zyklen
Elongation	72 °C	10	ja
Schmelzkurve	65 °C- 95 °C	1200	ja

**Tabelle 12:** Aufführung der einzelnen bei der RT-PCR ablaufenden Schritte

Durch die RT-PCR wurden spezifische mRNS-Abschnitte qualitativ und quantitativ in den einzelnen Proben nachgewiesen. In diesem Versuch wurde die relative Menge an mRNS für TGF- $\beta$ , Fibronectin, PAI-1, Kol I, AT2-Rezeptoren, TIMP-1,  $\alpha$ -SMA, TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor-alpha), IL 6 (Interleukin 6) und MCP-1 bestimmt. Für die Bestimmung jeden einzelnen Parameters wurden spezifische Primer benötigt, die sich in ihrem Aufbau unterschieden (**Tabelle 13**). Die Primer für TGF- $\beta$ , Fibronectin, PAI-1, Kol I, TIMP-1,  $\alpha$ -SMA und GAPDH lagen bereits vor (Wang-Rosenke et al. 2012, Krämer et al. 2008, Xu et al. 2007). Die Primer für TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor-alpha), IL 6 (Interleukin 6), AT2-R2 und MCP-1 wurden hergestellt. Dafür wurde die exakte Basensequenz für den entsprechenden Genabschnitt einer Datenbank entnommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>; 30.01.2014) und in das Computerprogramm „Primer3“ (Whithead Institute for Biomedical Research) eingelesen. Das Programm charakterisierte in der Folge spezifische Primer unter Berücksichtigung bestimmter Kriterien, wie Schmelztemperatur, mögliche und unbeabsichtigte Erstellung von Primerdimeren, Größe des PCR Produktes, Größe und GC-Gehalt der Oligonukleotide.

Produkt	Sense		Antisense		Annealingtemp.(°C)
	5`	3`	3`	5`	
GAPDH	tgccaactcagaagaactgtgg		ttcagctctgggatgacctt		59
TGF-β	ggtggcaggcgagagcgctga		ggcatggtagcccttgggct		61
PAI-1	cagcatgtggtccaggcctccaaa		tgtgccgctctcgttcacctgatct		61
Fibronectin	catgaagggggtcagtccta		gtccattccccttttcatt		59
IL 6	accaccacaacagaccagt		cagaattgccattgcacaac		60
α-SMA	ttcaatgtccctgcatgta		catctccagagtccagcaca		61
TIMP-1	cctctgtggatatgtccaca		ggcagtgatgtgcaaatttc		60
Kol I	cccaacccccaaaaacg		ctgcgtctggtgatacatattctct		57
MCP-1	attcactggcaagatgatccc		tactacagcttctttgggacacc		62
TNF-α	ccccattactctgaccctt		ttgttgaaattctgagccc		64
AT2-R2	aatcctggcaagcatcttatgt		cggaaataaaatgttggaatg		60

**Tabelle 13:** Bei der RT-PCR verwendete Primer (TIB-Molbiol, Berlin) mit Angabe der Sequenz der Basen im Sense und Antisense Primer und mit der Angabe der Annealingtemperatur in °C (Wang-Rosenke et al. 2012, Krämer et al. 2008, Xu et al. 2007)

#### 5.7.4 Quantifizierung der RT-PCR Analyse

Zur Berechnung der relativen mRNS-Expression wurde die  $\Delta\Delta CT$  Methode genutzt, bei der die Expression des Zielgens immer auf die Expression eines Housekeeping-Gens und auf gesunde unbehandelte Kontrollen bezogen wurde. Dieses Housekeeping-Gen kam ubiquitär in allen Zellen vor und wurde dort auch in gleichem Maß expremiert. In diesem Fall war das Housekeeping-Gen GAPDH. Die Formel zur Berechnung der relativen mRNS-Expression lautet:

$$\begin{aligned} \Delta CT &= \Delta CT \text{ Zielgen} - \Delta CT \text{ Referenzgen} \\ \Delta\Delta CT &= \Delta CT \text{ Behandlung} - \Delta CT \text{ Kontrolle} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta CT} \end{aligned}$$

**Abbildung 8:** Formeln zur Berechnung der relativen mRNS-Expression

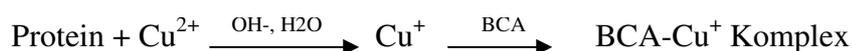
Die Ratio gab die relative Expression eines Gens in einer Probe, bezogen auf gesunde, unbehandelte Kontrollen und normalisiert auf ein Referenzgen an (Pfaffl et al. 2001).

## 5.8 Analyse der Proteine

### 5.8.1 Isolierung und Einstellung der Proteine

Die Proteinisolierung begann mit der Vorbereitung aller bei dieser Technik benötigten Lösungen. Erst danach startete die eigentliche Isolierung der Proteine. Der erste Schritt dazu war die Präparation der zu untersuchenden Gewebe. Von den bei  $-80\text{ °C}$  gelagerten Proben wurde ein ca. linsengroßes Stück mit Hilfe eines Skalpell abgetrennt und umgehend in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser gegeben. In diesem wurde die Probe so lange bearbeitet, bis sich ein feines Pulver gebildet hatte. Dabei war darauf zu achten, dass die Probe zu keinem Zeitpunkt auftaute. Zu dem Pulver wurde im nächsten Schritt  $250\text{ }\mu\text{l}$  Ripa-Puffer (**Tabelle 15**) und  $15\text{ }\mu\text{l}$  Proteaseinhibitor gegeben. Die drei Komponenten wurden solange miteinander vermennt bis eine homogene braune Lösung entstand, die anschließend in ein  $1,5\text{ ml}$  Reaktionsgefäß überführt wurde und auf einem Rotator bei  $4\text{ °C}$  für  $1,5\text{ h}$  geschwenkt wurde. Darauf folgend wurden alle Proben bei  $14000\text{ rpm}$  für  $20\text{ min}$  zentrifugiert, so dass sich ein Pellet am Grund des Reaktionsgefäßes bildete. Die darüber befindliche Lösung wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Zur Feststellung der Proteinkonzentration und zur Einstellung der Proben auf den gleichen Proteingehalt wurde eine Bicinchoninicacid-Messung (BCA) durchgeführt. Für diese Messung wurde ein Kit (BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit; Pierce; Rockford; USA) verwendet, bei dem zunächst nach Protokoll eine Standardreihe mit aufsteigendem Proteingehalt hergestellt wurde (**Tabelle 14**). Von den Proben wurde eine 1:10 Verdünnung mit aqua dest. hergestellt. Von dieser Lösung wurden je Probe  $25\text{ }\mu\text{l}$  in zwei Wells einer 96 Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Der Standard wurde, genauso wie die Proben, im doppelten Ansatz auf eine 96 Well-Mikrotiterplatte pipettiert in einem Volumen von  $25\text{ }\mu\text{l/Well}$ . Zu allen Proben wurden  $200\text{ }\mu\text{l}$  der Reagenz hinzugegeben (Reagenz A + Reagenz B 50:1).

Das Prinzip der BCA-Messung beruht darauf, dass Proteine im alkalischen Milieu Kupfer II zu Kupfer I reduzierten (**Abbildung 9**). Das Kupfer I bildete mit der chromogenen Substanz BCA einen violetten Farbkomplex. Die Intensität der entstehenden Färbung war proportional zum Proteingehalt der Probe und wurde photometrisch bestimmt bei einer Wellenlänge von  $562\text{ nm}$ .



**Abbildung 9:** Reaktionsgleichung der BCA-Methode.  $\text{H}_2\text{O}$  = Wasser; Cu = Kupfer,

OH<sup>-</sup> = Hydroxydion; BCA = Bicinchoninicacid

Nach 15 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Proben bestimmt und die Proteinkonzentration berechnet. Im nächsten Schritt wurde durch die Zugabe von aqua dest. die Proteinkonzentration der Proben auf ein Wert von 500 µg/ml eingestellt. Danach wurden die Proben aliquotiert zu je 20 µl und bei -20 °C gelagert.

Standardansatz	Verdünnungsmedium	Standard Stocklösung	Konzentration
1	0 µl	300 µl	2000 µg/ml
2	375 µl	375 µl	1500 µg/ml
3	325 µl	325 µl	1000 µg/ml
4	175 µl	175 µl von Verd. 2	750 µg/ml
5	325 µl	325 µl von Verd. 3	500 µg/ml
6	325 µl	325 µl von Verd. 5	250 µg/ml
7	325 µl	325 µl von Verd. 6	125 µg/ml
8	400 µl	100 µl von Verd. 7	25 µg/ml
9	400 µl	0 µl	0 µg/ml

**Tabelle 14:** Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung der einzelnen Stufen des Standards bei der BCA-Messung an

### 5.8.2 Western Blot

Die Western Blot-Technik und Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE) diente dem spezifischen Nachweis von Proteinen und ihrer Auftrennung nach dem molekularen Gewicht. Um diese Auftrennung zu erreichen, musste vorab die Eigenladung der Proteine durch anionisches Natriumdodecylsulfat (SDS) überlagert werden und die Proteine mussten linearisiert werden. Das SDS lagerte sich unspezifisch an die Aminosäuren des Proteins und überdeckte durch die eigene anionische Ladung die individuelle Ladung dessen. Außerdem führte das SDS zu einer partiellen Denaturierung des Proteins und unterstützte so die Linearisierung. Die vollständige Denaturierung wurde durch die Zugabe von β-Mercaptoethanol erreicht. Das β-Mercaptoethanol spaltete spezifisch intra- und intermolekulare Disulfidbrücken und im Zusammenhang mit Hitze wurde so die Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine aufgehoben. Bei der Western Blot-Technik wurden verschieden konzentrierte Gele eingesetzt, die sich durch ihren Gehalt an Acrylamid unterschieden (**Tabelle 16**). Das Acrylamid bildete bei seiner Polymerisation Poren im Gel,

durch welche die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden konnten. Dabei galt, je höher die Konzentration des Acrylamids war, desto kleiner waren die Poren im Gel. Dieser Fakt wurde bei den Trenngelen genutzt, denn es wurden bei der Auftrennung von Proteinen unter 30 kDa 15 %ige Gele, wohingegen bei Proteinen über 100 kDa 7 %ige Gele verwendet. Neben den Trenngelen gab es die Sammelgele, welchen keine selektierende Funktion zukam, sondern nur eine deponierende Funktion. Deshalb war der Acrylamidgehalt hier konstant bei 5 %, damit alle Proteine dieses passieren konnten, um ins Trenngel zu gelangen. Die Gele unterschieden sich auch im pH-Wert. Die Sammelgele wiesen einen leicht alkalischen pH-Wert (pH 6,8) auf und die Trenngele einen leicht basischen pH-Wert (pH 8,8). Dadurch wurde eine Schärfung der Zonen in denen eine Proteinspezies wanderte, erreicht.

Für die Western Blot-Analyse, sowie für die Gelherstellung wurde das System von Bio Rad (Bio- Rad Laboratories GmbH, München) genutzt.

## Material und Methoden

Puffer	Inhaltsstoffe	Menge	pH-Wert	Gebrauchslösung
Ripa-Puffer	NaCl	150 mM		
	EDTA	1 mM		
	Igepal	1%		
	Natriumdesoxycholat	0,50%		
	SDS	0,10%		
	Tris-HCl	50 mM	7,4	
Laemmli-Puffer 4 x	1M Tris-HCl	200 mM		
	Glycerol	40%		
	20% SDS	8%		
	β-Mercaptoethanol	10ml	6,8	500 μl/
Trenngelpuffer 100 ml	Tris-Base	18,2 g	8,8	
Sammelgelpuffer	Tris-Base	6,1 g	6,8	
Laufpuffer 10 x	Tris-Base	0,25 M		
	Glycin	1,92 M		
	SDS		8,3	1 x
Transferpuffer 10 x	Tris-Base	30 g		700ml Aqua dest
	Glycin	144 g		100ml Puffer 10x 200 ml Methanol
Ponceou-Rot	Ponceou S	0,5 g		
	Essigsäure	1 ml		
TBS-	NaCl	160 g		
Stammlösung 10x	Tris-Base	48,4 g	7,5	1 x
Waschpuffer	Tween 20	3 ml		
	TBS	2 L 1 x		

**Tabelle 15:** Für den Western Blot verwendete Lösungen

Inhaltsstoffe	Trenngel	Trenngel	Trenngel	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid	7%	10%	12,50%	15%	5%
	1,75 ml	2,5 ml	3,13 ml	3,75 ml	1,25 ml
Trennpuffer	2,50 ml	2,50 ml	2,50 ml	2,50 ml	0 ml
Sammelgelpuffer	0	0	0	0	2,50 ml
aqua dest.	7,65 ml	4,90 ml	4,27 ml	3,65 ml	6,15 ml
SDS 10 %	0,1 ml				
TEMED	0,015 ml				
APS 10 %	0,03 ml				

**Tabelle 16:** Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele, die bei der Western Blot-Technik Verwendung finden

Nachdem die hergestellten Gele ausgegossen wurden und ausgehärtet waren, wurden sie in die Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) eingesetzt, die daraufhin mit 1x Laufpuffer aufgefüllt wurde. Die Elektrophoresekammer musste derart aufgefüllt werden, dass die Taschen des Sammelgels vollständig mit Puffer gefüllt waren. Die Proben wurden zunächst aufgetaut und je mit 6,7 µl des Gemisches aus Laemmli-Puffer (Zusammensetzung siehe **Tabelle 15**) und β-Mercaptoethanol versetzt. Dann wurden sie für 5 min auf 96 °C erhitzt und darauffolgend in die Taschen der Gele pipettiert. In die erste Tasche der Gele wurde immer 10 µl des Full Range Rainbowmarker (Amersham Biosciens Europe, Freiburg) gegeben, durch den später die Größe der aufgetrennten Proteine bestimmt werden konnte. Die Gele liefen bei 120 V und 400 mA für 90 min.

Nachdem die Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt wurden, erfolgte die Transferierung derer auf eine Nitrozellulosemembran. Dies geschah ebenfalls im elektrischen Feld bei 70-90 V und 250 mA für 60 min. Der Erfolg des Transfers wurde mittels Ponceau-Färbung überprüft. Bei erfolgter Übertragung wurden die einzelnen Proteinbanden auf der Membran rot angefärbt. War der Test positiv, wurde der Farbstoff mit Waschpuffer ausgespült und es folgte ein Blockierungsschritt. Dafür wurden die Membranen für 1 h in 5 % Milch-TBS gegeben. Das bewirkte, dass unspezifische Bindungsstellen der Membrane gesättigt wurden. Anschließend wurde der Primärantikörper auf die Membranen aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert (**Tabelle 17**) (Krämer et al. 2009, Krämer et al. 2008). Der Primärantikörper war ein monoklonaler Antikörper der spezifisch gegen das Zielprotein gerichtet war.

Antikörper		Verdünnung	Firma
Kollagen I	Ziege	1/200	Southern Biotec Birmingham; USA
TGF- $\beta$	Maus	1/50	Santa CruzBiotechnology, Heidelberg
$\alpha$ -SMA	Maus	1/100	Sigma Aldrich ST. Louis, USA
GAPDH	Kaninchen	1/1000	Santa CruzBiotechnology, Heidelberg
Fibronektin	Maus	1/200	Abcam Cambridge, USA
$\alpha$ -Tubulin	Maus	1/1000	Sigma Aldrich ST. Louis USA

**Tabelle 17:** Für den Western Blot verwendete Primärantikörper (Krämer et al. 2009, Krämer et al. 2008)

Nach der Inkubation wurden die Membranen mit Waschpuffer (Zusammensetzung siehe **Tabelle 15**) gewaschen, um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers wurde ein enzymatisch markierter (HRP) Sekundärantikörper für 1,5 h bei Raumtemperatur in Milch auf die Membran gegeben (**Tabelle 18**) (Krämer et al. 2009, Krämer et al. 2008).

Antikörper		Verdünnung	Firma
Kaninchen anti-Ziege HRP		1/1000	DAKO Cytomation; Hamburg
Ziege anti-Kaninchen HRP		1/1000	DAKO Cytomation, Hamburg
Kaninchen anti-Maus HRP		1/1000	DAKO Cytomation; Hamburg

**Tabelle 18:** Für den Western Blot verwendete Sekundärantikörper (Krämer et al. 2009, Krämer et al. 2008)

Nach Ablauf der 90 min wurden die Membranen erneut gründlich mit Waschpuffer gespült, um ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen, der bei der Auswertung zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung geführt hätte. Der Nachweis des gebundenen Antikörpers erfolgte, in dem nun die Membranen für 60 sec bei Raumtemperatur mit Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Reagenz (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) überschichtet wurden. Das ECL reagierte mit dem HRP des Sekundärantikörpers. Bei dieser Reaktion wurde eine Chemilumineszenz ausgelöst, deren Intensität direkt proportional war zum Proteingehalt der Probe. Um die Lumineszenz festzuhalten, wurde die Membran auf eine Filmkassette überführt und in der Dunkelkammer wurde für 10-30 min ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt. Der Film wurde durch die Lumineszenz belichtet. Dabei war der Grad der Schwärzung des Films direkt proportional zur Lumineszenz der Membran, die wiederum direkt proportional war zum Proteingehalt der Probe.

Zur Entwicklung des Films wurde dieser zuerst für 30 sec in Entwicklerlösung (Kodak Readymatic, Paris, Frankreich) gelegt, dann mit Wasser gespült und zuletzt für 20 sec in eine Fixierlösung (Kodak Readymatic, Paris, Frankreich) verbracht. Die Auswertung erfolgte mit der Bildverarbeitungssoftware ImageJ™-Software. Zur Standardisierung und Relativierung wurde auf jede Membran auch der GAPDH Antikörper aufgetragen. Dies war das Housekeeping-Protein, welches in jeder Zelle des Organismus in gleicher Menge expremiert wurde.

GAPDH wurde beim Kol I Sekundärantikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin ausgetauscht, da die Banden des GAPDH und des Kol I sich auf der gleichen Höhe der Membran befanden und sich somit verdeckt hätten.

## **5.9 Statistische Auswertung**

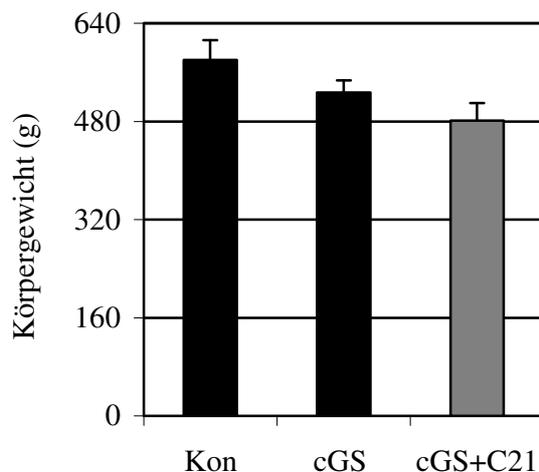
Die Versuchsergebnisse wurden als Gruppenmittelwert  $\pm$  Standardfehler vom arithmetischem Mittel angegeben (Standard Error of the Mean = SEM). In den Graphiken wurden diese als Fehlerbalken dargestellt. Das Statistikprogramm SPSS 11.0 für Microsoft® Windows wurde zur Auswertung des Versuchs genutzt und für die statistische Analyse. Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde als signifikant gewertet nach dem nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Test und dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test. Durch den Kruskal-Wallis-Test wurden die Gesamtgruppen verglichen und durch den Mann-Whitney-U-Test wurden die Gruppen gegeneinander verglichen.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Futteraufnahme und Größenwachstum

Die Futteraufnahme der Tiere erfolgte in den drei Versuchsgruppen (Kon, cGS, cGS+C21) in gleicher Menge, wobei es zu einer dem Wachstum der Tiere entsprechenden Steigerung derer kam. Am Ende des Versuches nahmen die Tiere der Kon-Gruppe durchschnittlich  $28 \pm 3$  g des ad libitum angebotenen Zuchtfutters pro Tag auf, die cGS-Tiere  $28 \pm 2$  g und die Compound 21-behandelten Tiere  $25 \pm 5$  g.

Des Weiteren wiesen die Kon-Tiere zu Beginn des Versuches ein mittleres Körpergewicht von  $185 \pm 11$  g auf. Die cGS-Gruppe wich mit  $183 \pm 11$ g nur minimal davon ab, ebenso wie die Compound 21-behandelte Gruppe mit  $177 \pm 10$  g. Am Tag der Versuchsbeendigung differiert das mittlere Körpergewicht der beiden kranken Versuchsgruppen (cGS  $527 \pm 19$  g; cGS+C21-Gruppe  $481 \pm 29$  g) in Bezug auf die gesunde Kontrollgruppe ( $580 \pm 32$  g) stärker als zu Beginn des Versuches. Die Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen erreichten jedoch keine Signifikanz (**Abbildung 10**).



**Abbildung 10:** Mittleres Körpergewicht der Versuchsgruppen 20 Wochen nach Versuchsbeginn: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. Die Differenzen der durchschnittlichen Körpergewichte sind nicht statistisch signifikant.

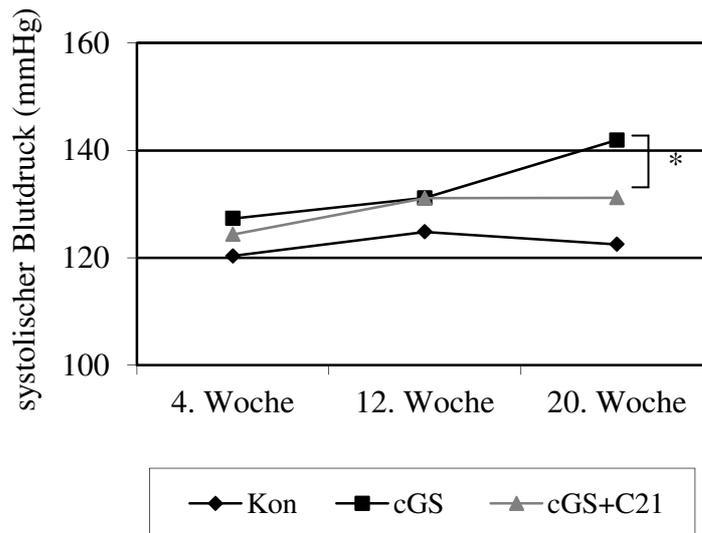
Als Bezugspunkt des ermittelten Organgewichts der Niere wurde die mittlere Länge der rechten Tibia bestimmt. Die rechte Tibia der Ratten der gesunden Kontrollgruppe erreichte zum Zeitpunkt der abschließenden Organentnahme eine durchschnittliche Länge von

$35 \pm 0,5$  mm. Die mittlere Länge der Tibia der cGS-Gruppe ( $35 \pm 0,4$  mm) und der cGS+C21-Gruppe ( $36 \pm 0,6$  mm) wich nur minimal und ohne Signifikanz von diesem Wert ab.

## 6.2 Blutdruck

Die Messung des systolischen Blutdrucks erfolgte plethysmographisch zu drei verschiedenen Zeitpunkten des Versuches (**Abbildung 11**). Die erste Messung, vor Behandlungsbeginn, ergab zwischen den Gruppen keine signifikanten Abweichungen. Die Werte orientierten sich um  $125 \pm 7$  mmHg. Die zweite Messung, 12 Wochen nach Induktion der cGS, ergab bereits signifikante Unterschiede. Die Kon-Gruppe wies einen mittleren systolischen Blutdruck von  $125 \pm 3$  mmHg auf und bei der cGS-Gruppe konnte ein mittlerer systolischer Blutdruck von  $131 \pm 2$  mmHg gemessen werden ( $p < 0,05$  cGS vs. Kon). Die Werte der cGS-Gruppe und der cGS+C21-Gruppe ( $131 \pm 3$  mmHg) zeigten keine signifikante Differenz.

Vierundzwanzig Stunden vor Beendigung des Versuches wurde eine weitere, finale Messung des Blutdruckes durchgeführt. Hier wiesen die Kontrolltiere einen mittleren systolischen Blutdruck von  $123 \pm 4$  mmHg auf. Die unbehandelten cGS Kontrolltiere zeigten in Bezug auf die Kon-Gruppe einen höchst signifikant gesteigerten systolischen Blutdruck von  $142 \pm 3$  mmHg ( $p < 0,001$  cGS vs. Kon) und die Compound 21-behandelten Tiere zeigten im Vergleich zur cGS-Gruppe einen durchschnittlichen, signifikant verminderten, systolischen Blutdruck von  $131 \pm 2$  mmHg ( $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS).

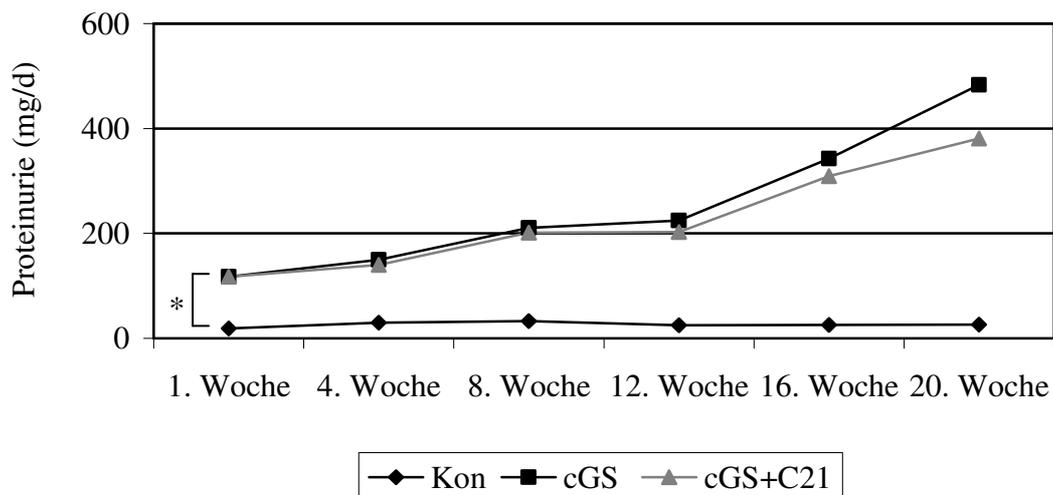


**Abbildung 11:** Mittlerer, plethysmographisch gemessener, systolischer Blutdruck der drei Versuchsgruppen im Zeitverlauf: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt.

Die erste Messung fand zu Beginn des Versuchs statt, die zweite Messung 12 Wochen nach Induktion der Anti-Thy1-induzierten, chronisch-progressiven Glomerulosklerose und die abschließende Messung 24 Stunden vor Beendigung des Versuches. (\* =  $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS)

### 6.3 Proteinurie

Die erste Messung der Proteinurie fand 5 Tage nach Induktion der cGS statt, um die Tiere in die entsprechenden Versuchsgruppen einzuteilen. Die darauf folgenden Messungen wurden im Abstand von vier Wochen durchgeführt (also Woche 4, 8, 12 und 16), um den Verlauf der cGS zu kontrollieren (**Abbildung 12**). Eine abschließende Messung erfolgte in der 20. Versuchswoche 24 h vor der Organ- und Blutentnahme.



**Abbildung 12:** Die Abbildung zeigt die durchschnittliche über den Urin ausgeschiedene Proteinmenge der drei Versuchsgruppen im Zeitverlauf: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt.

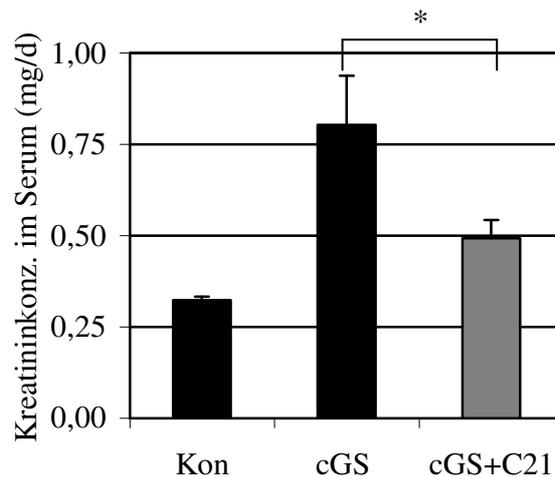
Die erste Messung der Proteinurie erfolgte 5 Tage nach Induktion der cGS. Die Werte zeigen eine signifikante Steigerung der mit dem Urin ausgeschiedenen Proteinmenge bedingt durch den Einsatz des Anti-Thy1-Antikörpers (\* =  $p < 0,001$  cGS und cGS+C21 vs. Kon). Die abschließende Proteinuriemessung erfolgte 24 h vor Beendigung des Versuches und zeigt keine weitere statistische Signifikanz.

Durch die Abbildung 12 wird ersichtlich, dass die Kon-Tiere eine geringe Ausscheidung von Proteinen mit dem Urin über den gesamten Verlauf des Versuches aufwiesen. Zu Beginn des Versuches betrug der Wert  $19 \pm 2$  mg/d und dieser stieg leicht während des 20 wöchigen Versuchablaufes auf  $26 \pm 2$  mg/d an. Die cGS-Tiere und die cGS + C21-Tiere schieden im Gegensatz dazu von Beginn an eine signifikant erhöhte Menge an Eiweißen mit dem Urin aus (cGS:  $118 \pm 8$  mg/d; cGS+C21:  $117 \pm 12$  mg/d) (\* =  $p < 0,001$  cGS und cGS+C21 vs. Kon). Durch den progressiven Verlauf der Erkrankung stieg die Proteinausscheidung über den Urin während des Versuches bei beiden erkrankten Gruppen in Bezug auf die gesunde Kontrollgruppe signifikant an (cGS:  $483 \pm 59$  mg/d; cGS+C21:  $383 \pm 48$  mg/d). Die dauerhafte Compound 21 Gabe führte zu einer messbaren Senkung der Proteinausscheidung im Vergleich zu den cGS-Tieren. Die Senkung erreichte jedoch keine Signifikanz.

## 6.4 Parameter der Nierenfunktion

### 6.4.1 Kreatininkonzentration des Serums

Im Serum der Kon-Gruppe war eine mittlerer Kreatininkonzentration von  $0,32 \pm 0,01$  mg/dl enthalten. Die Kreatininkonzentration im Serum der cGS-Gruppe belief sich im Mittel auf  $0,80 \pm 0,14$  mg/dl und durchschnittlich enthielt das Serum der Compound 21-behandelten Gruppe  $0,49 \pm 0,05$  mg/dl Kreatinin (**Abbildung 13**).

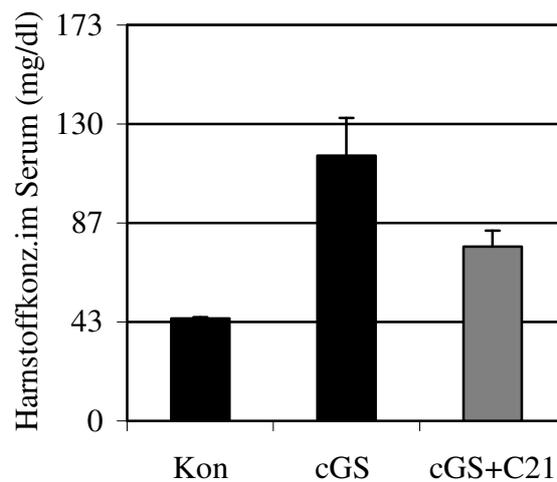


**Abbildung 13:** Mittlere Kreatininkonzentration (Kreatininkonz.) im Serum der drei Versuchsgruppen 20 Wochen nach Induktion der cGS: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. (\* =  $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS)

Die Behandlung mit Compound 21 bedingte eine signifikante Senkung des Kreatiningehaltes im Serum in Bezug auf die unbehandelte, kranke cGS-Gruppe ( $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS).

### 6.4.2 Harnstoffkonzentration des Serums

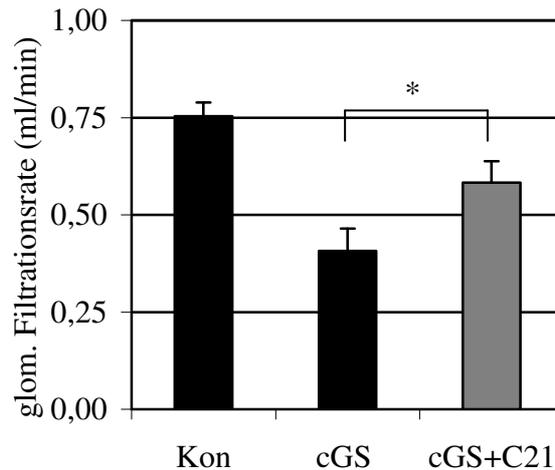
Die Messung der Harnstoffkonzentration im Serum der Tiere ergab für die Kon-Gruppe eine mittlere Konzentration von  $45 \pm 1$  mg/dl. Bedingt durch die cGS wies die cGS-Gruppe eine den Erwartungen entsprechende signifikante Steigerung der Harnstoffkonzentration im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe auf (cGS:  $116 \pm 17$  mg/dl) (\* =  $p < 0,001$  cGS vs. Kon). Die Harnstoffkonzentration im Serum der Compound 21-behandelten Tiere wurde im Bezug auf die cGS-Gruppe um mehr als 30% auf  $76 \pm 7$  mg/dl gesenkt, jedoch ohne eine Signifikanz zu erreichen. (**Abbildung 14**).



**Abbildung 14:** Mittlere Harnstoffkonzentration im Serum der drei Versuchsgruppen bestimmt am Ende des Versuches: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. Differenz zwischen der cGS- und der cGS+C21-Versuchsgruppe ist statistisch nicht signifikant.

#### 6.4.3 Glomeruläre Filtrationsrate

Die glomeruläre Filtrationsrate wurde aus der Kreatininkonzentration des Serums, des Urins, dem Urinvolumen, der Zeiteinheit und dem mittleren Körpergewicht der einzelnen Versuchstiere berechnet. Für die Kon-Gruppe ergab sich am Ende des Versuches ein Wert von  $0,75 \pm 0,04$  ml/min. Zwanzig Wochen nach Induktion der cGS zeigten die Tiere der cGS-Gruppe eine erwartete, signifikant verminderte glomeruläre Filtrationsrate von  $0,41 \pm 0,06$  ml/min ( $p < 0,001$  cGS vs. Kon). Die Compound 21-Behandlung war in der Lage die eingeschränkte glomeruläre Filtrationsrate signifikant zu verbessern auf  $0,58 \pm 0,06$  ml/min ( $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS) (**Abbildung 15**).



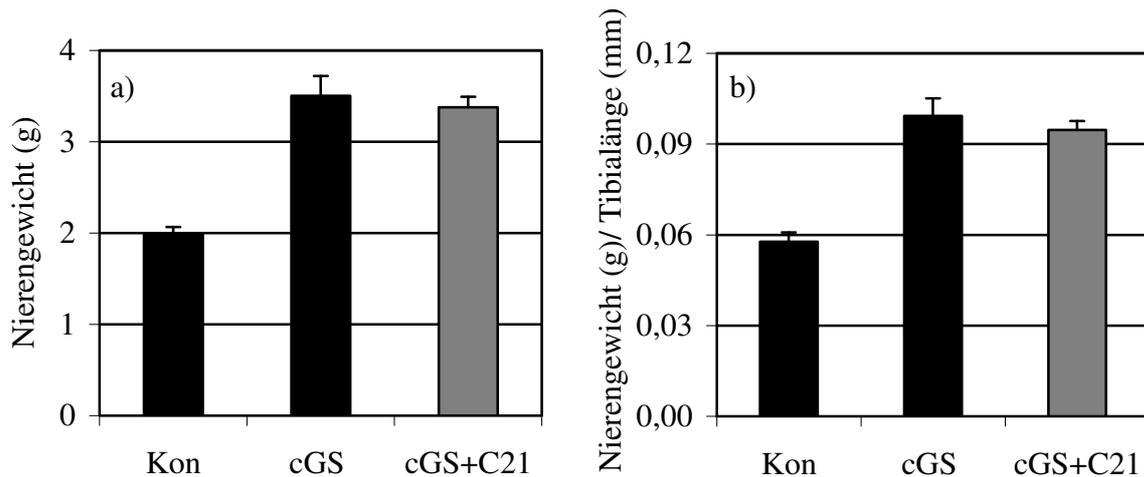
**Abbildung 15:** Durchschnittliche glomeruläre (glom.) Filtrationsrate 20 Wochen nach Induktion der chronischen Glomerulosklerose (cGS): Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. (\* =  $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS)

## 6.5 Parameter der renalen Hypertrophie

### 6.5.1 Organengewichte

Am Ende des Versuches wurde den Tieren die verbliebene rechte Niere für weiterführende Untersuchungen, wie z.B. die Feststellung des Gewichtes entnommen.

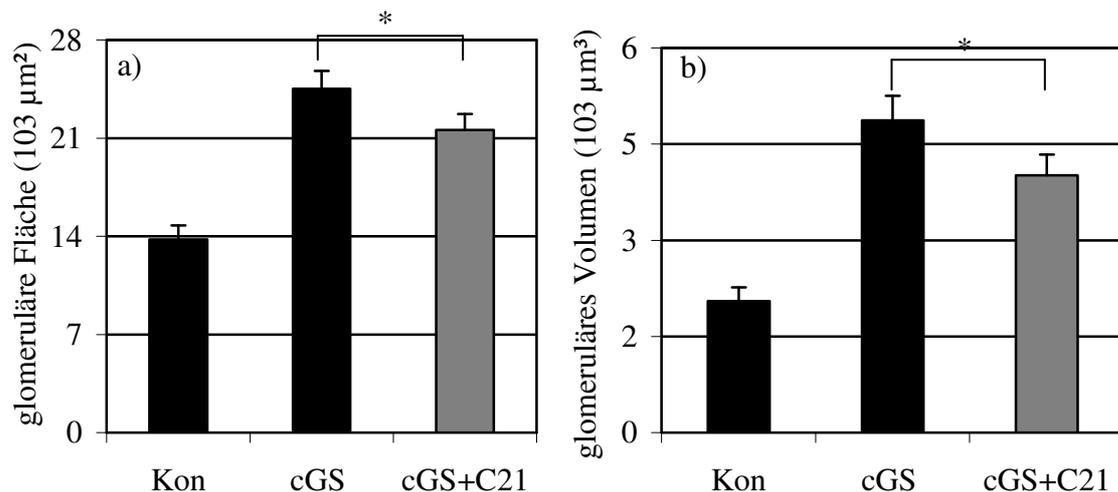
Die Tiere der Kontrollgruppe hatten ein mittleres Nierengewicht von  $1,99 \pm 0,08$  g erreicht. Das durchschnittliche Nierengewicht der cGS-Tiere war mit  $3,50 \pm 0,22$  g signifikant erhöht ( $p < 0,001$  cGS vs. Kon) und wurde durch die Compound 21 Gabe auf  $3,38 \pm 0,12$  g gesenkt, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen. Bezogen auf die TL zeigte sich das gleiche Bild (Kon-Gruppe  $0,058 \pm 0,003$  g/mm TL; cGS-Gruppe  $0,099 \pm 0,006$  g/mm TL ( $p < 0,001$  cGS vs. Kon); cGS+C21-Gruppe  $0,095 \pm 0,003$  g/mm TL) (**Abbildung 16**), wobei die Behandlung der Tiere mit C21 zu keiner signifikanten Veränderung führte.



**Abbildung 16:** Darstellung des absoluten und auf die Tibialänge bezogenen Gewichtes der Niere am Ende des Versuches: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt, (a) Nierengewicht (b) Nierengewicht pro mm Tibia ohne statistische Signifikanz zwischen der cGS und der cGS+C21-Gruppe.

### 6.5.2 Glomeruläre Fläche und glomeruläres Volumen

Die glom. Fläche und das glom. Volumen wurden histologisch an PAS-gefärbten und Carnoy-fixierten Gewebeschnitten bestimmt:



**Abbildung 17:** Mittlere glomeruläre Fläche (a) und mittleres glomeruläres Volumen (b) der verschiedenen Versuchsgruppen: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. (\* =  $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS)

Die mittlere glomeruläre Fläche der Kontrolltiere betrug  $13783 \pm 982 \mu\text{m}^2$ . Die cGS-Gruppe zeigte eine signifikant vergrößerte glom. Fläche mit  $24528 \pm 1260 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0,001$  cGS vs. Kon) in Bezug auf die Kon-Gruppe. Durch die Compound 21-Gabe wurde die glomeruläre Fläche signifikant auf  $21586 \pm 1138 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS) gesenkt (**Abbildung 17**).

Ausgehend von der glomerulären Fläche wurde das glomeruläre Volumen der einzelnen Versuchsgruppen berechnet. Im Mittel wiesen die Glomeruli der Kon-Gruppe ein Volumen von  $2049 \pm 214 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$  auf. Die Glomeruli der cGS-Gruppe hatten mit einem mittleren glo. Volumen von  $4871 \pm 382 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$  ein signifikant größeres Volumen ( $p < 0,001$  cGS vs. Kon). Diese durch die cGS bedingte Volumenzunahme der Glomeruli konnte durch die 20 wöchige Behandlung mit Compound 21 signifikant verringert werden (cGS+C21-Gruppe:  $4012 \pm 325 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$ ) ( $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS) (**Abbildung 17**).

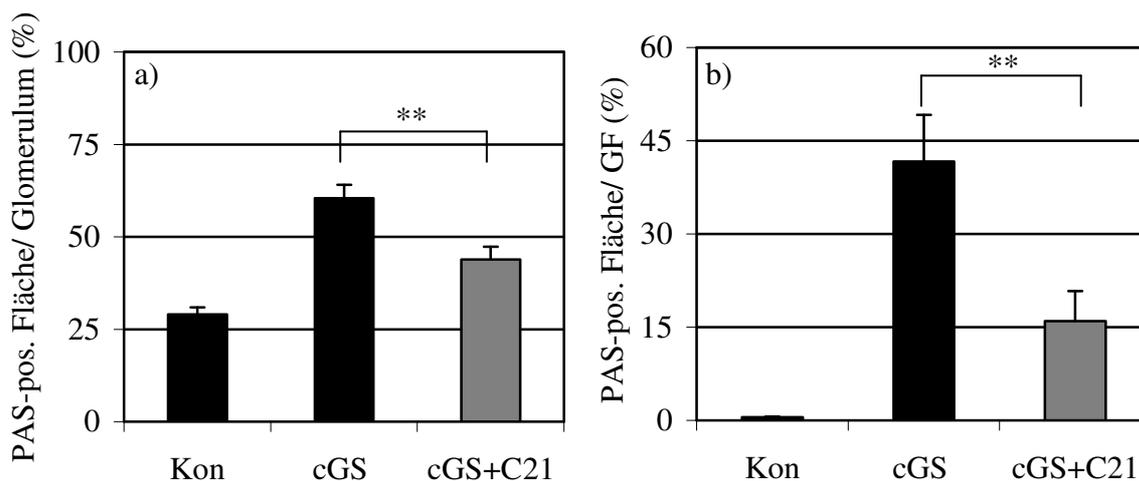
### **6.6 Parameter der renalen Fibrose**

Die Parameter der Fibrose wurden auf drei verschiedenen Ebenen untersucht: auf histologischer Ebene, der Protein-Expressionsebene und auf Ebene der relative mRNS-Expression.

#### **6.6.1 Matrixscore und immunhistologische Darstellung des Kollagen I**

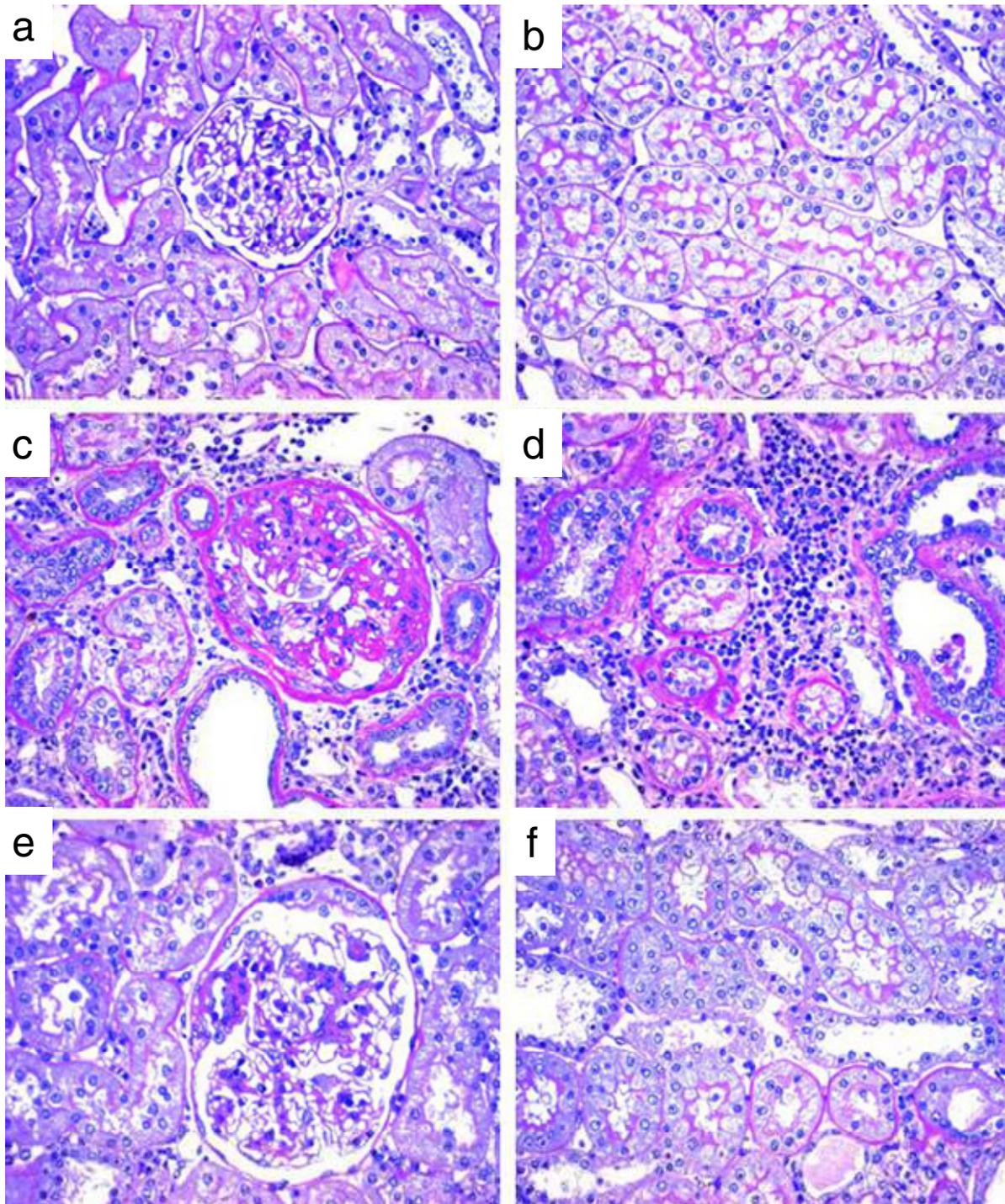
Histologisch untersuchte Fibroseparameter waren der Matrixscore und immunhistologische Kol I-Färbung.

Die Bestimmung des kortikalen Matrixscores ergab für die Kon-Gruppe einen Wert von  $0,5 \pm 0,1 \%$ ,  $42 \pm 8 \%$  für die cGS-Gruppe und  $16 \pm 5 \%$  für die cGS+C21-Gruppe. Die Bestimmung des glomerulären Matrixscores ergab für die Kon-Gruppe einen Wert von  $29 \pm 2 \%$ ;  $60 \pm 4 \%$  für die cGS-Gruppe und  $44 \pm 3 \%$  für die cGS+C21-Gruppe (**Abbildung 18** und **Abbildung 19**).



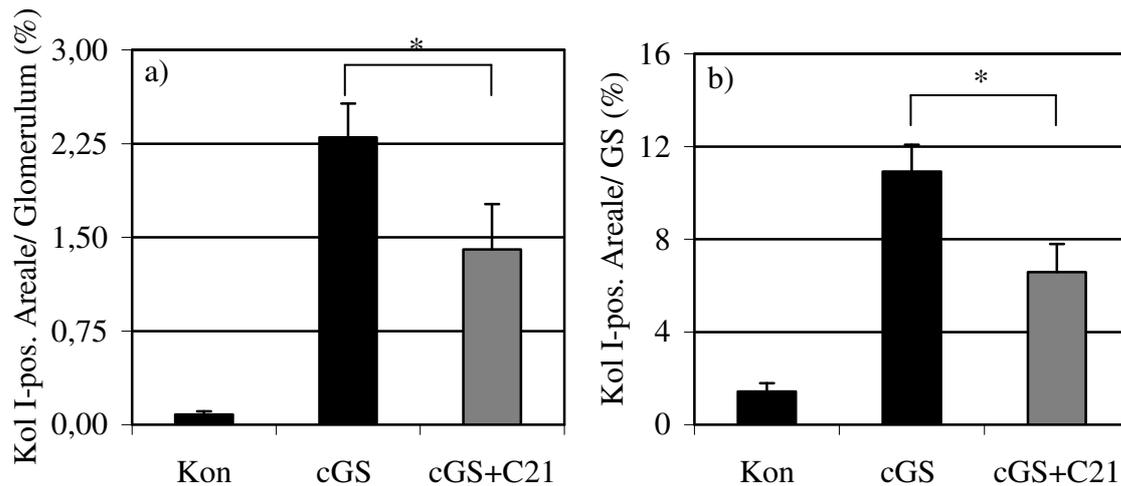
**Abbildung 18:** Glomerulärer Matrixscore (a) ermittelt an Carnoy-fixierten, PAS-gefärbten Gewebsschnitten: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. Der Graph (b) stellt den kortikalen Matrixscore der gleichen Gruppen dar. (\*\* =  $p < 0,01$  cGS+C21 vs. cGS)

Zwanzig Wochen nach Induktion der cGS kam es in den Kortizes und den Glomerula der cGS-Gruppe zu einer signifikanten Akkumulation der sauren Mucopolysaccharide ( $p < 0,001$  cGS vs. Kon). Bedingt durch die Compound 21-Behandlung wurde der Anteil der sauren Mucopolysaccharide glomerulär wie kortikal hoch signifikant vermindert ( $p < 0,01$  cGS+C21 vs. cGS).

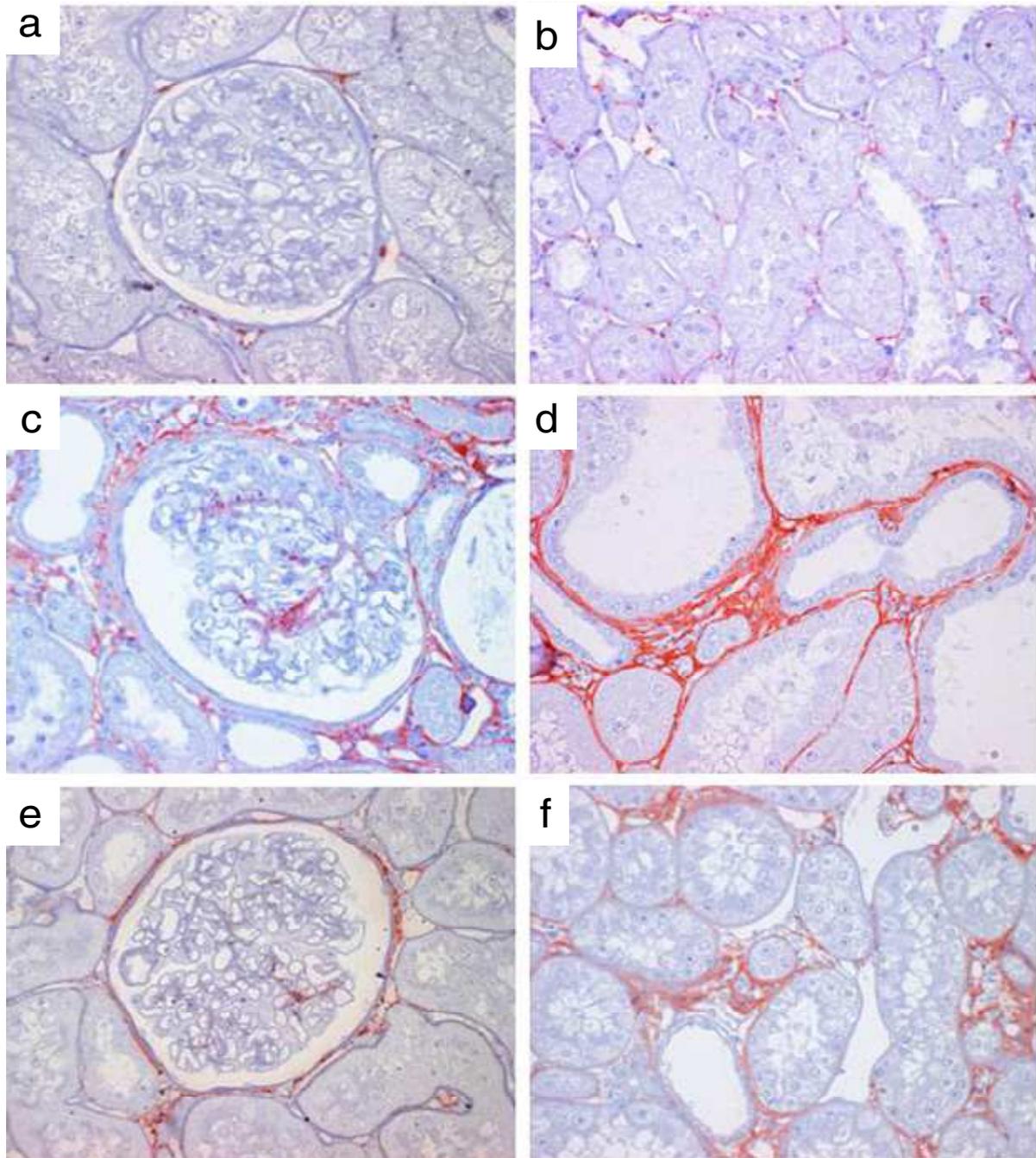


**Abbildung 19:** Abbildung mit repräsentativen Bildern PAS-gefärbter, histologischer Schnitte mit Mayer`s Hämatoxillin als Gegenfärbung der Kon-Gruppe (Kontrolltiere, gesund), (a) glomerulär, (b) kortikal, von der cGS-Gruppe(chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie) (c) glomerulär, (d) kortikal und von der cGS+C21-Gruppe (chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie und Compound 21-behandelt) (e) glomerulär und (f) kortikal). (400fache Vergrößerung)

Die Auswertung der immunhistologischen Färbung des Kol I (**Abbildung 20**, **Abbildung 21**) ergab für die Kon-Gruppe einen Kollagengehalt von  $0,1 \pm 0,1$  % glomerulär und  $1,4 \pm 0,4$  % kortikal. Bei den unbehandelten cGS-Tieren konnte eine signifikante Erhöhung des Anteils an Kol I, sowohl glomerulär ( $2,3 \pm 0,3$  %,  $p < 0,001$  cGS vs. Kon) als auch kortikal ( $10,9 \pm 1,2$  %,  $p < 0,001$  cGS vs. Kon) nachgewiesen werden. Die Steigerung des Anteils an Kol I wurde durch die Gabe von Compound 21 signifikant vermindert (glomerulär  $1,4 \pm 0,4$  %, ( $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS) und kortikal  $6,6 \pm 1,2$  % ( $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS)).



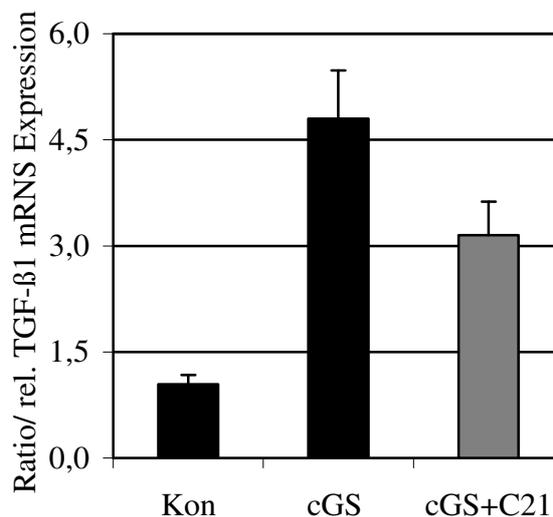
**Abbildung 20:** Mittlerer, glomerulärer Kollagen I-Gehalt (a), welcher computergestützt in immunhistochemisch-gefärbten Gewebsschnitten gemessen wurde: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. Der Graph (b) stellt den mittleren, kortikalen Kollagen I-Gehalt dar. (\* =  $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS)



**Abbildung 21:** Repräsentative Aufnahmen immunhistologischer Färbungen von Kollagen I an Carnoy-fixierten, paraffineingebetteten und mit Mayer`s Hämatoxillin gegengefärbten histologischen Gewebsschnitten in einer 400-fachen Vergrößerung. Alle roten Areale der Bilder stellen immunhistologisch markiertes Kollagen I dar. Aufnahme (a) und (b): Glomerulum und Gesichtsfeld einer Niere der Kon-Gruppe (Kontrolltiere, gesund), Aufnahme (c) und (d): Glomerulum und Gesichtsfeld einer Niere der cGS-Gruppe (chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie), Aufnahme (e) und (f): Glomerulum und Gesichtsfeld einer Niere der cGS+C21-Gruppe (chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie und Compound 21 behandelt).

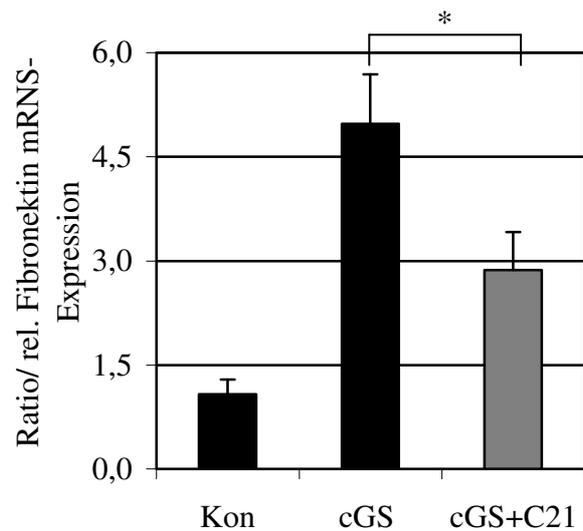
### 6.6.2 Relative TGF- $\beta$ 1, Fibronectin, Kol I, PAI-1 und TIMP-1 mRNA-Expression

Das Ergebnis der relativen mRNA-Expressionsmessung von TGF- $\beta$ 1 (**Abbildung 22**) ergab in der cGS-Gruppe die signifikante Erhöhung um das  $4,8 \pm 0,7$ -fache der Genexpression im Vergleich zur Kon-Gruppe (\* =  $p < 0,001$  cGS vs. Kon). Diese erhöhte Expression wurde durch die Compound 21-Gabe in der cGS+C21-Gruppe auf das  $3,2 \pm 0,5$ -fache abgesenkt ohne Signifikanz zu erreichen.



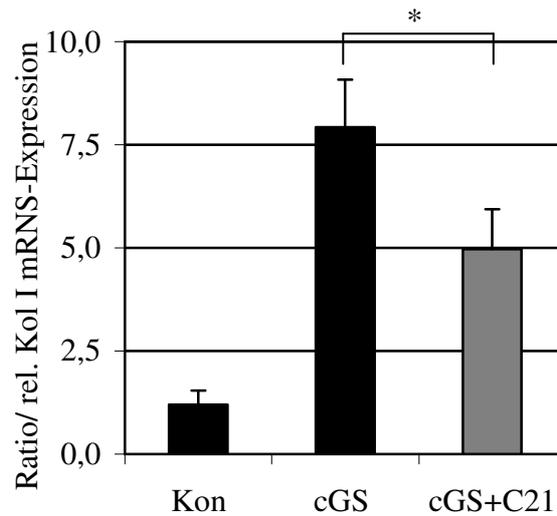
**Abbildung 22:** Mittlere relative mRNA-Expression von TGF- $\beta$ 1 normalisiert auf die GAPDH mRNA-Expression und bezogen auf die gesunden Kontrolltiere der verschiedenen Versuchsgruppen: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. Keine statistische Signifikanz der Differenz zwischen der cGS und der cGS+C21-Versuchsgruppe.

Bei der Messung der relativen mRNA-Expression von Fibronectin (**Abbildung 23**) wurde gezeigt, dass die cGS-Tiere 20 Wochen nach Induktion der Erkrankung ein  $5,0 \pm 0,7$ -fach höheres und signifikantes Expressionslevel als die gesunden Kontrollen aufweisen (\* =  $p < 0,001$  cGS vs. Kon). Durch die Behandlung mit Compound 21 wurde das Expressionslevel signifikant auf das  $2,9 \pm 0,6$ -fache der gesunden Kontrollen gesenkt ( $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS).



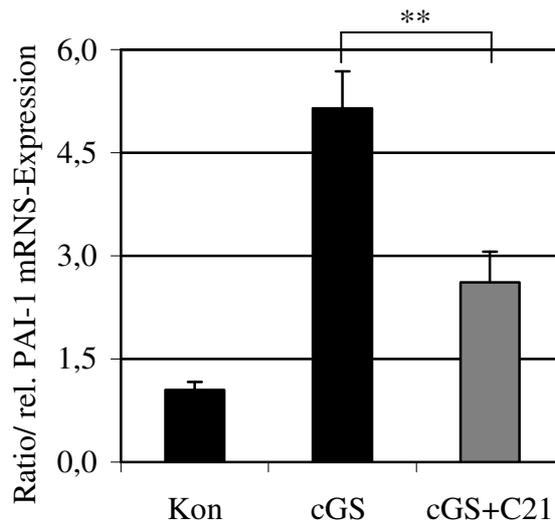
**Abbildung 23:** Graphische Darstellung der mittleren relativen Fibronectin mRNA-Expression in Bezug auf die GAPDH mRNA-Expression der verschiedenen Versuchsgruppen 20 Wochen nach Induktion der Anti-Thy1-induzierten chronisch-progressiven Glomerulosclerose: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. (\* =  $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS)

Ein weiterer Parameter ergab sich aus der Bestimmung der relativen mRNA-Expression von Kol I (**Abbildung 24**). Die Messung führte zu folgenden Ergebnissen: cGS-Gruppe  $7,9 \pm 1,2$ -fache der Genexpression in Bezug auf die gesunden Kon-Tiere; cGS+C21-Gruppe  $5,0 \pm 1,0$ -fache der Genexpression in Bezug auf die Kon-Tiere. Durch die Induktion der cGS kam es in der unbehandelten, kranken Versuchsgruppe (cGS) zu einer höchst signifikanten Steigerung der Kol I mRNA-Expression im Vergleich zur gesunden Kon-Gruppe ( $p < 0,001$  cGS vs. Kon). Diese Genexpression wurde jedoch mittels Compound 21-Behandlung in Bezug auf die cGS-Gruppe signifikant vermindert ( $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS).



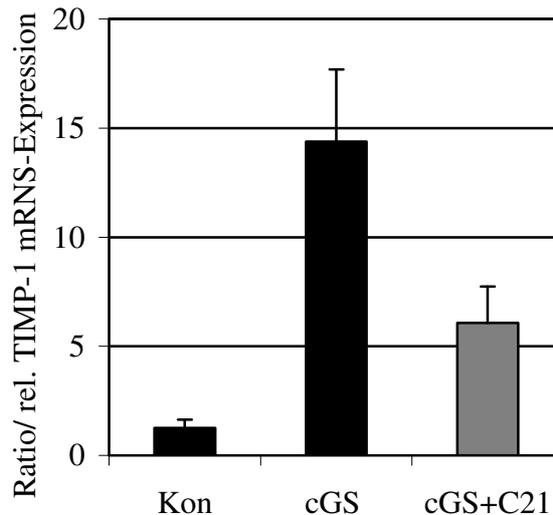
**Abbildung 24:** Ergebnisse der Untersuchung der Versuchsproben auf deren mittlere relative Kollagen I mRNA-Expression normalisiert auf GAPDH und bezogen auf die gesunden Kontrolltiere dar. Die drei zu differenzierenden Versuchsgruppen sind: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. (\* =  $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS)

Die relative PAI-1 mRNA-Expression war bei der cGS-Gruppe um das  $5,1 \pm 0,5$ -fache erhöht, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (**Abbildung 25**). Durch die 20 wöchige Compound 21 Behandlung wurde die relative PAI-1 mRNA-Expression auf das  $3,1 \pm 0,5$ -fache hoch signifikant reduziert ( $p < 0,01$  cGS+C21 vs. cGS).



**Abbildung 25:** Relative PAI-1 mRNA-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen (Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt). (\*\* =  $p < 0,01$  cGS+C21 vs. cGS)

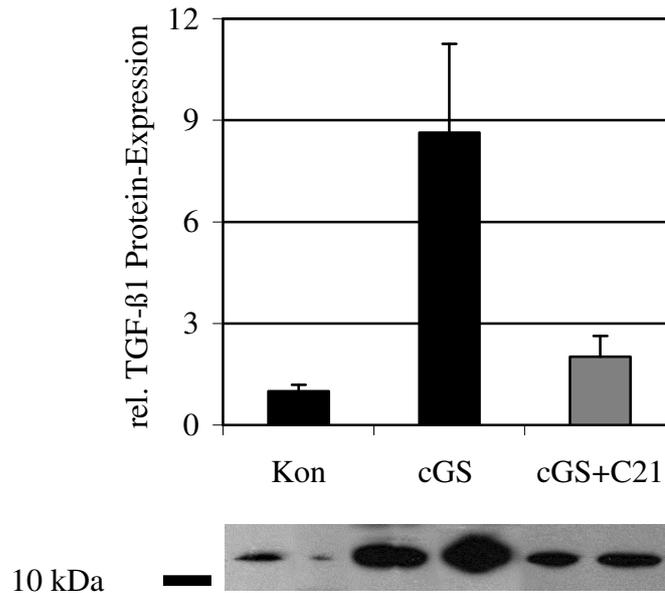
Der letzte untersuchte Parameter auf der Ebene der mRNA-Expression war die relative TIMP-1 mRNA-Expression bezogen auf die GAPDH mRNA-Expression. In der cGS-Gruppe betrug dessen Expression das  $14,4 \pm 3,3$ -fache der Expression in der Kon-Gruppe, erreicht somit eine hohe Signifikanz (\* =  $p < 0,001$  cGS vs. Kon) und in der cGS+C21-Gruppe senkte die Compound 21 Behandlung deutlich, die Expression auf das  $6,1 \pm 1,7$ -fache, aber ohne Signifikanz zu erreichen (**Abbildung 26**).



**Abbildung 26:** Mittlere, relative TIMP-1 mRNA-Expression bezogen auf die GAPDH mRNA-Expression der verschiedenen Versuchsgruppen: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. Ohne statistische Signifikanz der Differenzen zwischen cGS und cGS+C21-Versuchsgruppe.

### 6.6.3 Relative TGF- $\beta$ , Kol I und Fibronectin Protein-Expression

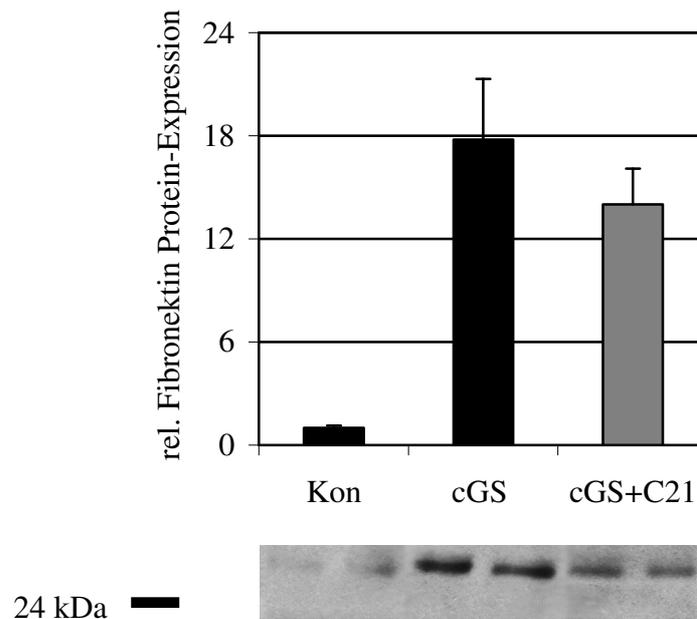
In diesem Versuch wurde als klassischer profibrotischer Parameter die TGF- $\beta$ 1-Protein-Expression im renalen Gewebe bestimmt (**Abbildung 27**). Die cGS-Gruppe zeigte eine signifikant erhöhte, relative TGF- $\beta$ 1 Protein-Expression von  $8,6 \pm 2,6$ -fach in Bezug auf die Protein-Expression der Kon-Gruppe ( $p < 0,05$  cGs vs. Kon). Die Expression wurde durch die 20 wöchige Compound 21-Behandlung deutlich gesenkt ( $2,0 \pm 0,7$ -fache im Vergleich zur Protein-Expression der Kon-Gruppe), jedoch ohne eine Signifikanz zu erreichen.



**Abbildung 27:** Graphische Darstellung des Ergebnisses des TGF-β1-Western Blots. Gezeigt wird die relative TGF-β1 Protein-Expression der drei Versuchsgruppen: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. Eine statistische Differenz zwischen behandelter und unbehandelter Versuchsgruppe konnte nicht nachgewiesen werden.

Die untere Abbildung stellt eine exemplarische Western Blot-Analyse dar, in der zwei Proben von jeder Versuchsgruppe untersucht wurden.

Die relative Fibronectin Protein-Expression wurde als ein weiterer Fibrosemarker mittels SDS-PAGE und Western Blot-Technik bezogen auf GAPDH bestimmt (**Abbildung 28**). Die relative Protein-Expression der cGS-Gruppe wurde signifikant um das  $17,8 \pm 3,5$ -fache in Bezug auf die relative Protein-Expression der Kon-Gruppe gesteigert (\* =  $p < 0,001$  cGS vs. Kon) und durch die lange Compound 21-Behandlung in der cGS+C21-Gruppe auf das  $14,1 \pm 2,1$ -fache gesenkt, ohne Signifikanz zu erreichen.

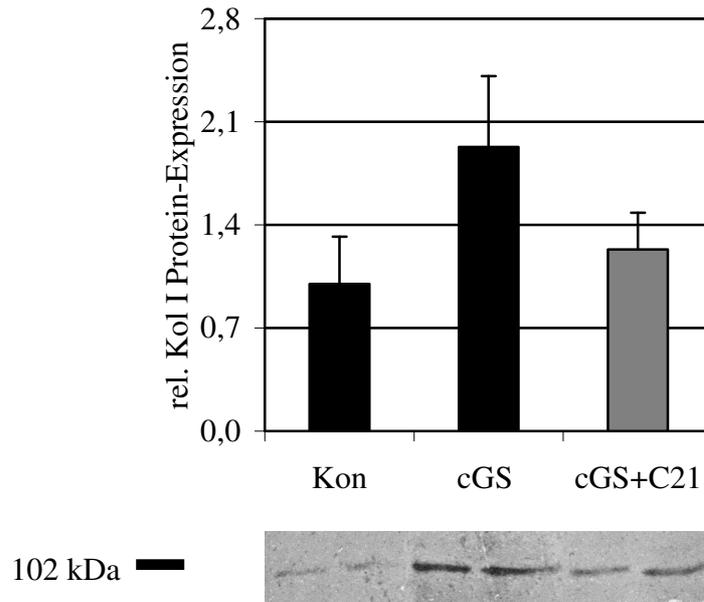


**Abbildung 28:** Darstellung der relativen Fibronectin Protein-Expression bezogen auf GAPDH getrennt nach Versuchsgruppen: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. Keine statistische Differenz zwischen behandelter und un behandelter Kontrollgruppe vorhanden.

Darunter befindet sich die Abbildung einer exemplarischen Western Blot Analyse in je Versuchsgruppe zwei Proben untersucht wurden.

Als letzter Parameter der Fibrose wurde die relative Protein-Expression des Kol I bestimmt (**Abbildung 29**). Hier fand nicht GAPDH als „Housekeeping“ Protein Verwendung, sondern  $\alpha$ -Tubulin. Dies ergab sich, da Kol I und GAPDH ein sehr ähnliches Molekulargewicht haben und sich so die Banden des Western Blot überlagern würden.  $\alpha$ -Tubulin hat ein Molekulargewicht von 50 kDa und verursacht dementsprechend keine Probleme in der Auswertung.

Die cGS-Tiere zeigten eine relative Protein-Expression von Kol I, die um das  $1,9 \pm 0,5$ -fache höher war, als die Protein-Expression der Kon-Gruppe jedoch ohne statistische Signifikanz. Bei den cGS+C21-Tieren wurde die Expression auf das  $1,2 \pm 0,3$ -fache der Protein-Expression der Kon-Gruppe durch die Compound 21-Gabe ohne statistische Signifikanz gesenkt.



**Abbildung 29:** Kollagen I-Protein-Expression der drei Versuchsgruppen (Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt), die mittels SDS-PAGE und Western Blot-Technik untersucht wurde. Kein statistischer Unterschied nachweisbar zwischen behandelter und un behandelter Versuchsgruppe.

Die darunter befindliche Abbildung zeigt eine vergleichende, exemplarischer Western Blot-Analysen von je zwei Proben der einzelnen Versuchsgruppen.

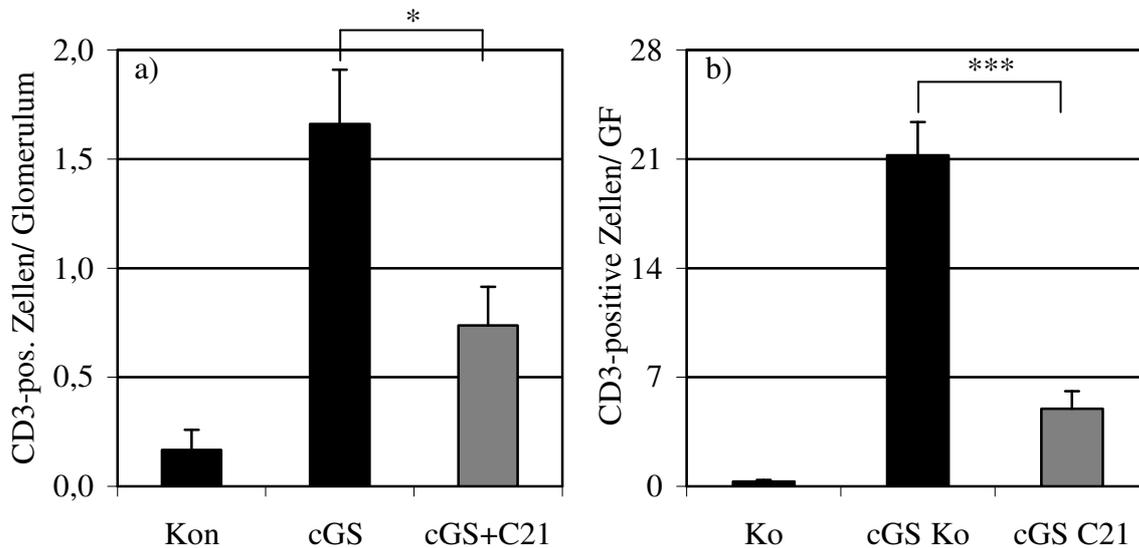
## 6.7 Parameter der renalen Inflammation

Die Entzündungsparameter wurden histologisch und auf Ebene der mRNS-Expression untersucht mit folgenden Ergebnissen.

### 6.7.1 CD3- und ED1-positive Zellen

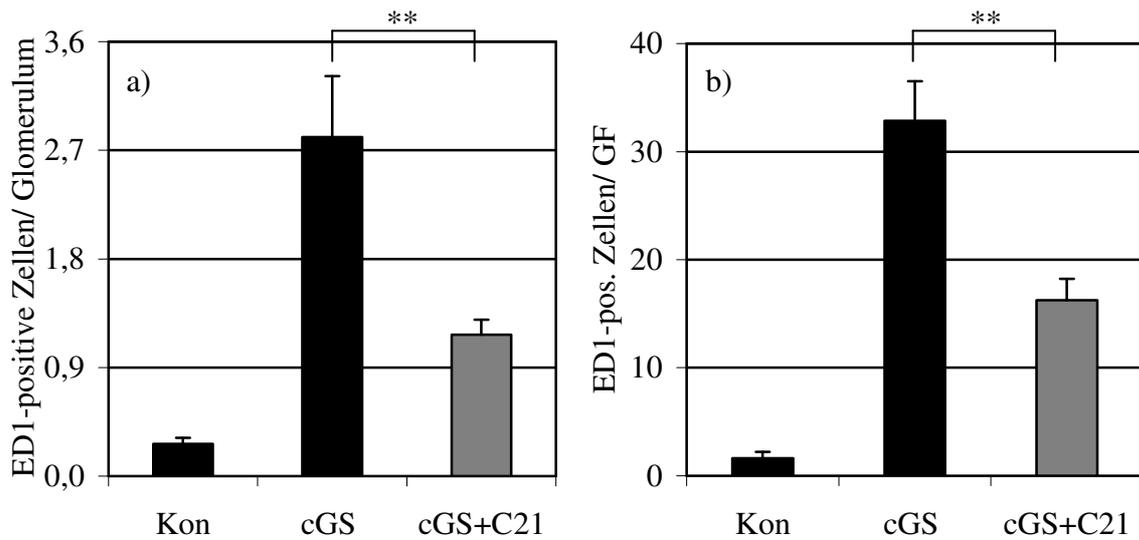
Um die Intensität der entzündlichen Reaktion beurteilen zu können, wurde die Infiltration des Gewebes mit Lymphozyten und Makrophagen untersucht. Die lymphozytären Zellinfiltrate wurden immunhistochemisch dargestellt, in dem alle CD3-positiven Zellen markiert wurden (**Abbildung 30**). Dies ergab in der Kon-Gruppe einen durchschnittlichen Wert von  $0,2 \pm 0,1$  CD3-positive Zellen/ Glomerulum und durchschnittlich  $0,3 \pm 0,1$  CD3-positive Zellen/ Gesichtsfeld im Kortex der Tiere. In Bezug auf diese Tiere zeigte die cGS-Gruppe eine signifikante Steigerung des Auftretens von CD3-positiven Zellen, sowohl glomerulär mit  $1,7 \pm 0,3$  CD3-positive Zellen/ Glomerulum ( $p < 0.001$  cGS vs. Kon) als auch kortikal mit

$21,2 \pm 2,1$  CD3-positive Zellen/ Gesichtsfeld ( $p < 0,001$  cGS vs. Kon). Die 20 wöchige Behandlung mit Compound 21 führte zu einer statistisch signifikanten Senkung des Auftretens von CD3-positiven Zellinfiltraten auf einen Wert von  $0,7 \pm 0,2$  CD3-positiven Zellen/ Glomerulum ( $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS) und kortikal auf  $5,0 \pm 1,1$  CD3-positiven Zellen/ Gesichtsfeld ( $p < 0,001$  cGS+C21 vs. cGS).

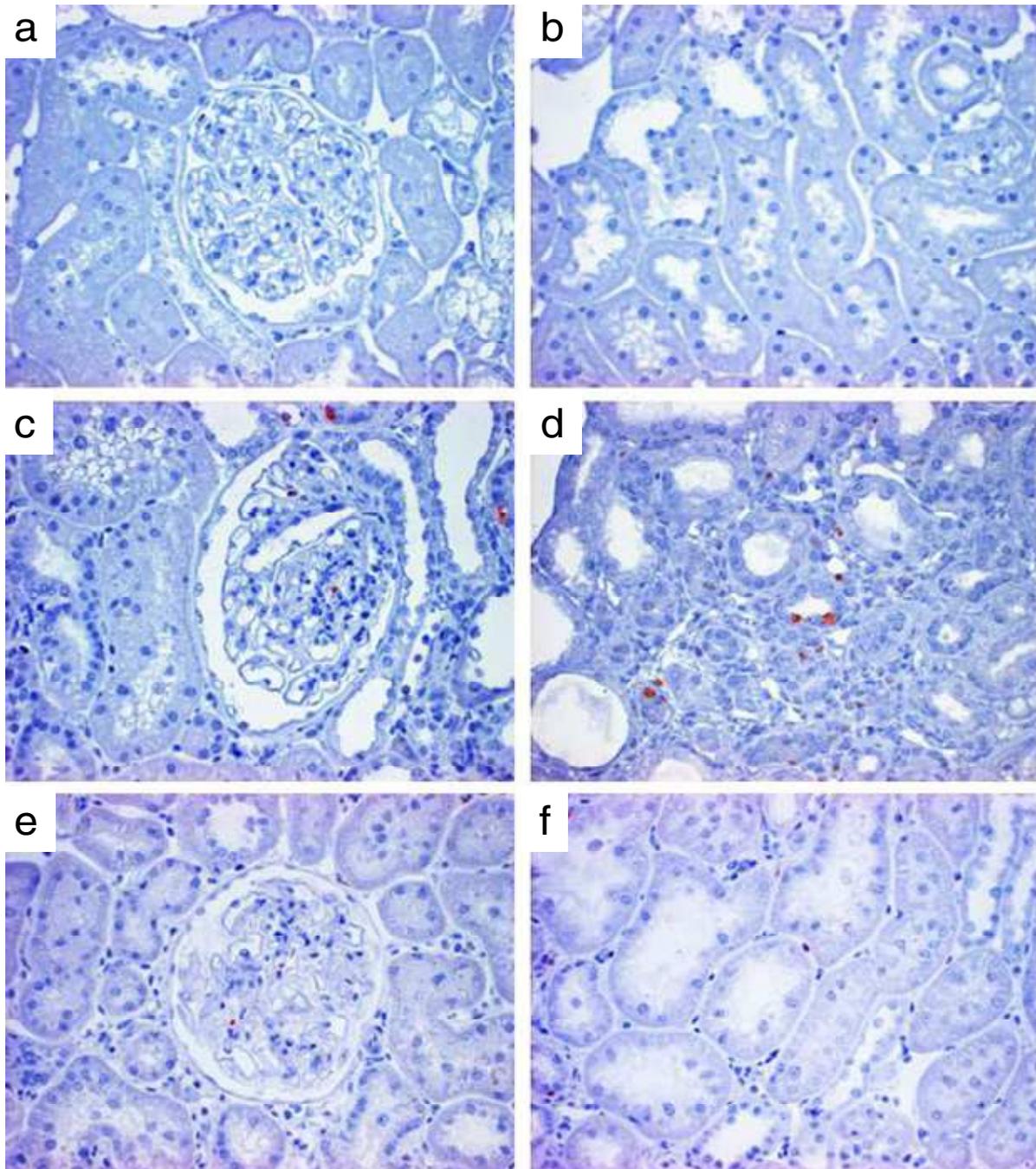


**Abbildung 30:** Mittlere Anzahl der CD3-positiven (CD3 pos.) Zellen pro Glomerulum (a), eingeteilt in die einzelnen Versuchsgruppen: (Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. Graphik (b) verdeutlicht die durchschnittliche Anzahl der CD3-positiven Zellen pro Gesichtsfeld ebenfalls aufgeführt nach den Versuchsgruppen. (\*\*\*) =  $p < 0,001$  cGS+C21 vs. cGS; \* =  $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS)

Ähnliche Resultate ergaben die Untersuchung der Schnitte auf makrophagozytäre Zellinfiltrate. Hier wurden alle ED1-positiven Zellen markiert (**Abbildung 31** und **Abbildung 32**). In der Kon-Gruppe ergab das durchschnittlich  $0,3 \pm 0,1$  ED1-positive Zellen pro Glomerulum und  $1,6 \pm 0,6$  ED1-positive Zellen pro Gesichtsfeld des Kortex. In der cGS-Gruppe waren die Werte signifikant erhöht mit  $2,8 \pm 0,5$  ED1-positive Zellen pro Glomerulum und  $32,8 \pm 3,7$  ED1-positive Zellen pro Gesichtsfeld des Kortex ( $p < 0,001$  cGS vs. Kon). Die Behandlung mit Compound 21 bewirkte auch hier eine signifikante Senkung der Zellinfiltrate glomerulär auf  $1,2 \pm 0,1$  ED1-positive Zellen pro Glomerulum und kortikal auf  $16,3 \pm 2,0$  ED1-positive Zellen pro Gesichtsfeld ( $p < 0,01$  cGS+C21 vs. cGS).



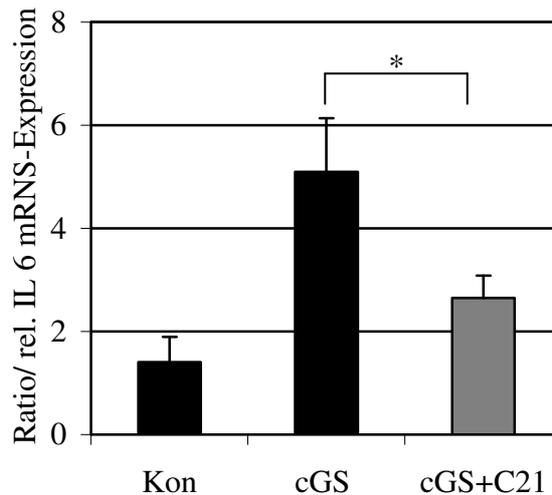
**Abbildung 31:** Durchschnittliche Infiltration der Glomeruli (a) und des Kortex (b) mit ED1-positiven Zellen: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. (\*\* =  $p < 0,01$  cGS+C21 vs. cGS)



**Abbildung 32:** Immunhistologische Aufnahmen ED1-positiver Zellen in einer 400-fachen Vergrößerung und mit Mayer`s Hämaoxillin gefärbt. Die rot angefärbten Zellen stellen immunhistochemisch markierte ED 1-positive Zellen dar. Die Bilder (a), (c) und (e) stellen repräsentative Aufnahmen von Glomeruli der verschiedenen Versuchsgruppen dar (a) = Kon-Gruppe (Kontrolltiere, gesund); (c) = cGS-Gruppe (chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie); (e) = cGS+C21-Gruppe (chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt). Die Bilder (b), (d) und (f) zeigen die dazu korrelierenden, beispielhaften Gesichtsfelder der Kortizes.

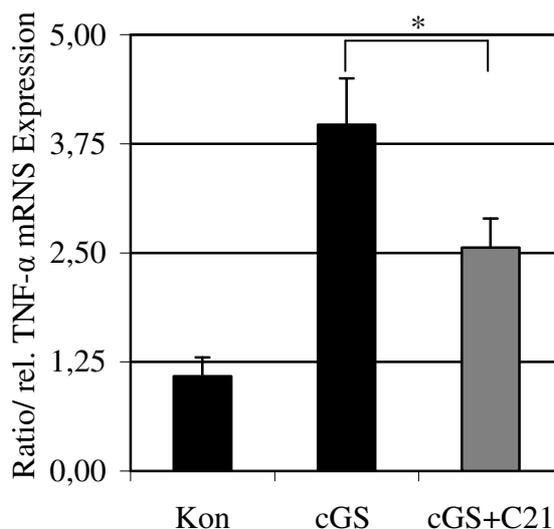
### 6.7.2 Relative IL 6, TNF- $\alpha$ und MCP-1 mRNA-Expression

Ein mittels RT-PCR bestimmter Parameter der Inflammation stellte die Expression des Zytokins IL 6 dar (**Abbildung 33**). Die cGS-Gruppe expremierte die  $5,1 \pm 1,0$ -fache Menge der IL 6 mRNA-Expression im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren (\* =  $p < 0,001$  cGS vs. Kon). In der cGS+C21-Gruppe konnte durch die Compound 21-Behandlung die relative IL 6 mRNA-Expression auf das  $2,7 \pm 0,4$ -fache in Bezug auf die Kon-Gruppe signifikant gesenkt werden. ( $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS).



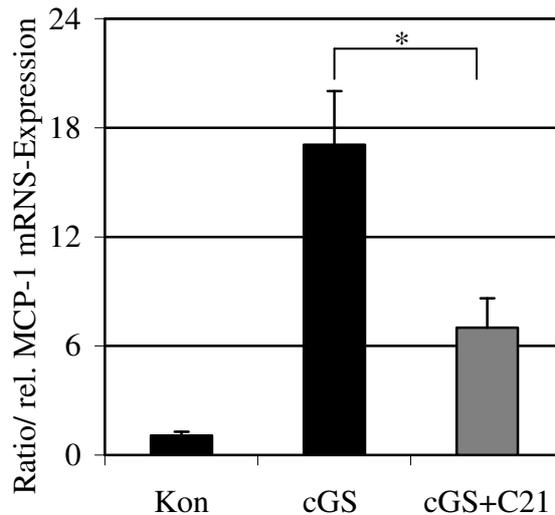
**Abbildung 33:** Relative (rel.) IL 6 mRNA-Expression vs. GAPDH in den drei Versuchsgruppen: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. (\* =  $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS)

Das Ergebnis der Bestimmung der relativen TNF- $\alpha$  mRNA-Expression, ein weiterer inflammatorischer Parameter, korrelierte mit dem Wert des IL 6 (**Abbildung 34**). Die cGS-Gruppe wies eine im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe um das  $4,0 \pm 0,5$ -fache erhöhte TNF- $\alpha$  mRNA-Expression auf (\* =  $p < 0,001$  cGS vs. Kon), die durch die Compound 21-Gabe auf das  $2,8 \pm 0,3$ -fache signifikant gesenkt wurde ( $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS).



**Abbildung 34:** Differenz der relativen TNF- $\alpha$  mRNA-Expression in den drei Versuchsgruppen: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. (\* =  $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS)

Des Weiteren wurde die relative MCP-1 mRNA-Expression in Bezug auf die GAPDH mRNA-Expression untersucht. Im Vergleich zur Kon-Gruppe wurde bei der cGS-Gruppe die MCP-1 mRNA-Expression auf das  $17,1 \pm 3,0$ -fache signifikant erhöht (\* =  $p < 0,01$  cGS vs. Kon). Durch die Compound 21-Gabe konnte die MCP-1 mRNA-Expression signifikant auf das  $7,0 \pm 1,6$ -fache der gesunden Kontrolltiere gesenkt werden (\* =  $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS) (**Abbildung 35**).



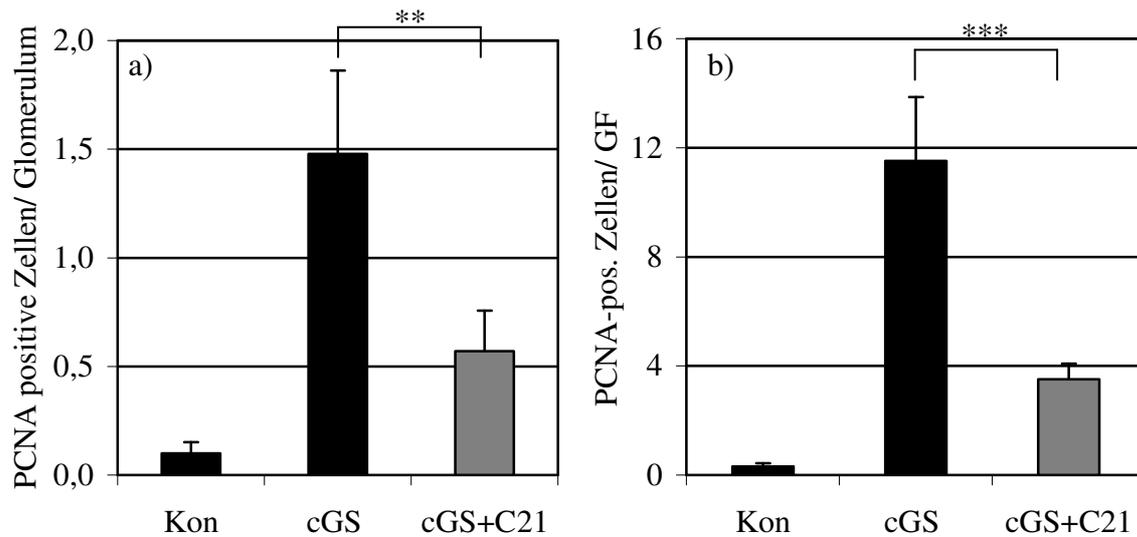
**Abbildung 35:** Relative MCP-1 mRNA-Expression in drei Versuchsgruppen: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. (\* =  $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS)

## 6.8 Parameter der renalen Proliferation und Apoptose

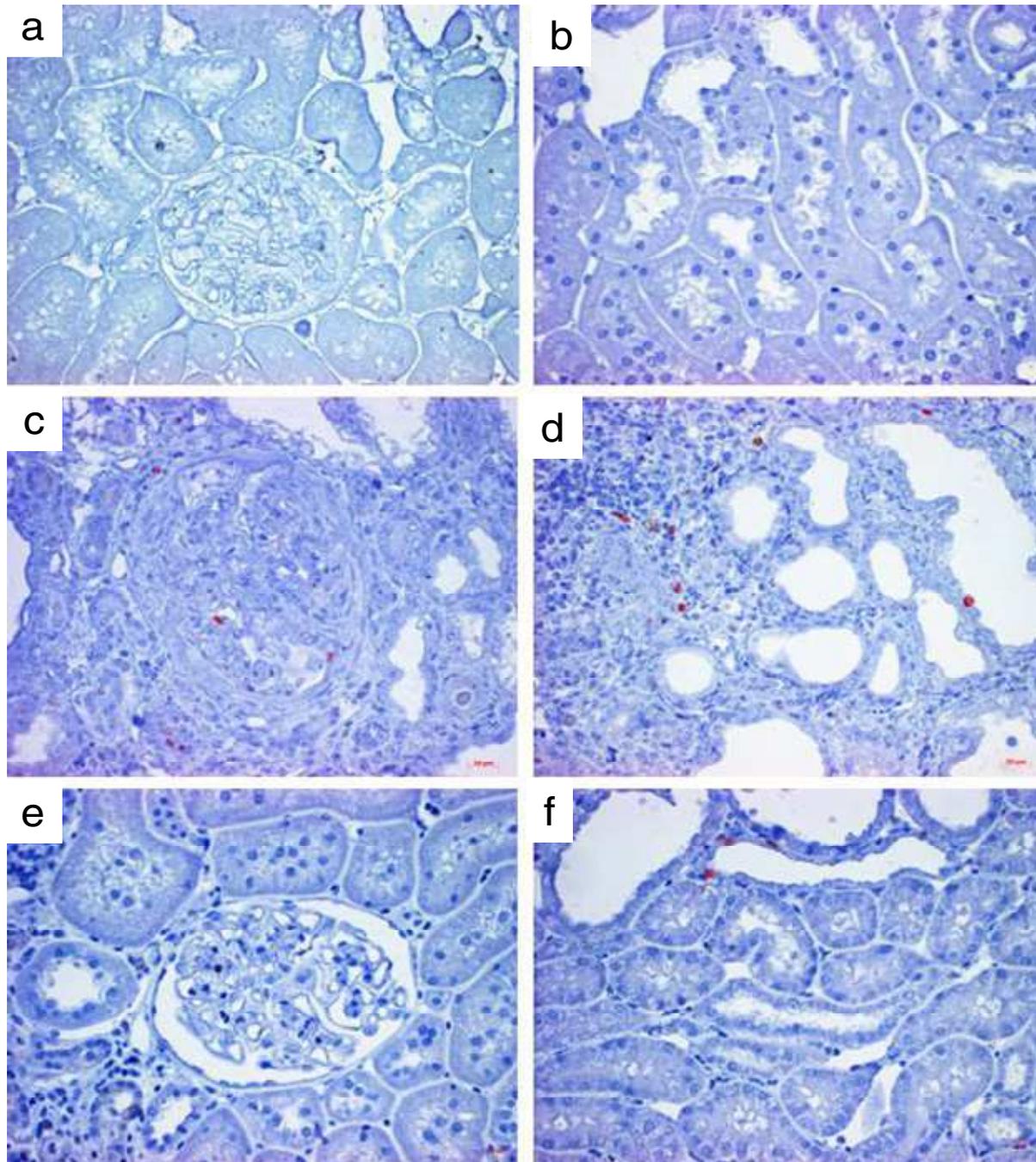
Als Parameter der Proliferation wurde auf Ebene der mRNA und Protein-Expression  $\alpha$ -SMA bestimmt. Zusätzlich wurde die Proliferation durch einen immunhistochemischen Nachweis von PCNA untersucht. Zur Apoptoseanalyse wurde ein TUNEL-Assay durchgeführt.

### 6.8.1 PCNA- und TUNEL-positive Zellen

Für den Nachweis proliferierender Zellen wurde PCNA als Marker ausgewählt. Dabei wurden PCNA-positive Zellen sowohl glomerulär als auch kortikal bestimmt (**Abbildung 36** und **Abbildung 37**). Die Kon-Gruppe enthielt glomerulär durchschnittlich  $0,1 \pm 0,1$  PCNA-positive Zellen/ Glomerulum und kortikal  $0,3 \pm 0,1$  PCNA-positive Zellen/ Gesichtsfeld. Im Gegensatz dazu wiesen die cGS-Tiere glomerulär  $1,5 \pm 0,4$  PCNA-positive Zellen/ Glomerulum und  $11,5 \pm 2,3$  PCNA-positive Zellen/ Gesichtsfeld auf. Beide Parameter waren in Bezug auf die Kon-Gruppe signifikant erhöht ( $p < 0,001$  cGS vs. Kon). Die Compound 21-behandelte Gruppe hatte mit durchschnittlich  $0,6 \pm 0,2$  PCNA-positive Zellen/ Glomerulum und  $3,5 \pm 0,6$  PCNA-positive Zellen/ Gesichtsfeld signifikant weniger proliferierende Zellen im renalen Gewebe ( $p < 0,01$  cGS+C21 vs. cGS;  $p < 0,001$  cGS+C21 vs. cGS) als die cGS-Gruppe.

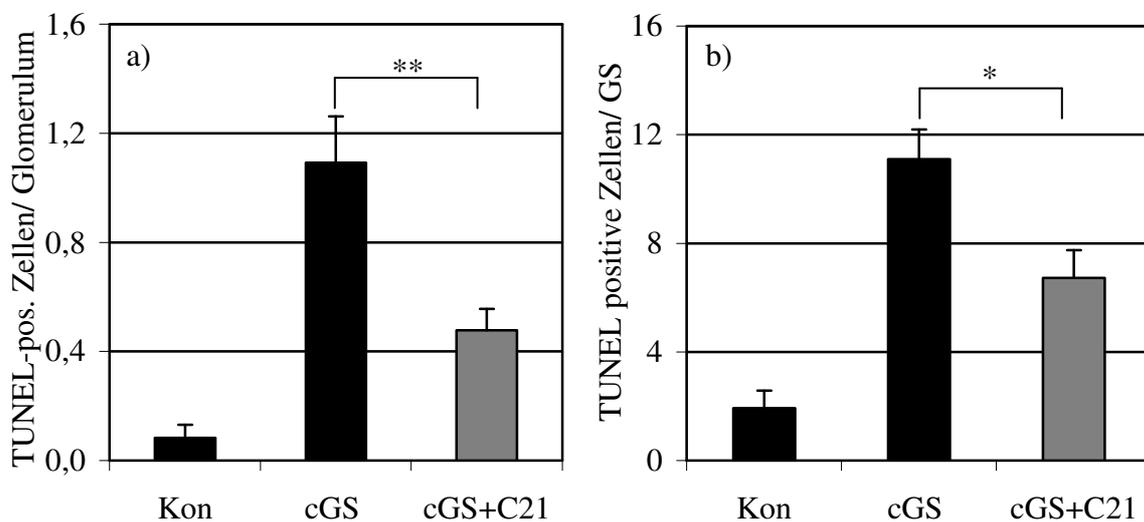


**Abbildung 36:** Mittlerer glomerulärer (a) und kortikaler (b) Gehalt an PCNA-positiven Zellen der immunhistochemisch-angefärbten Gewebsschnitte der drei Versuchsgruppen: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. (\*\* =  $p < 0,01$  cGS+C21 vs. cGS; \*\*\* =  $p < 0,001$  cGS+C21 vs. cGS)

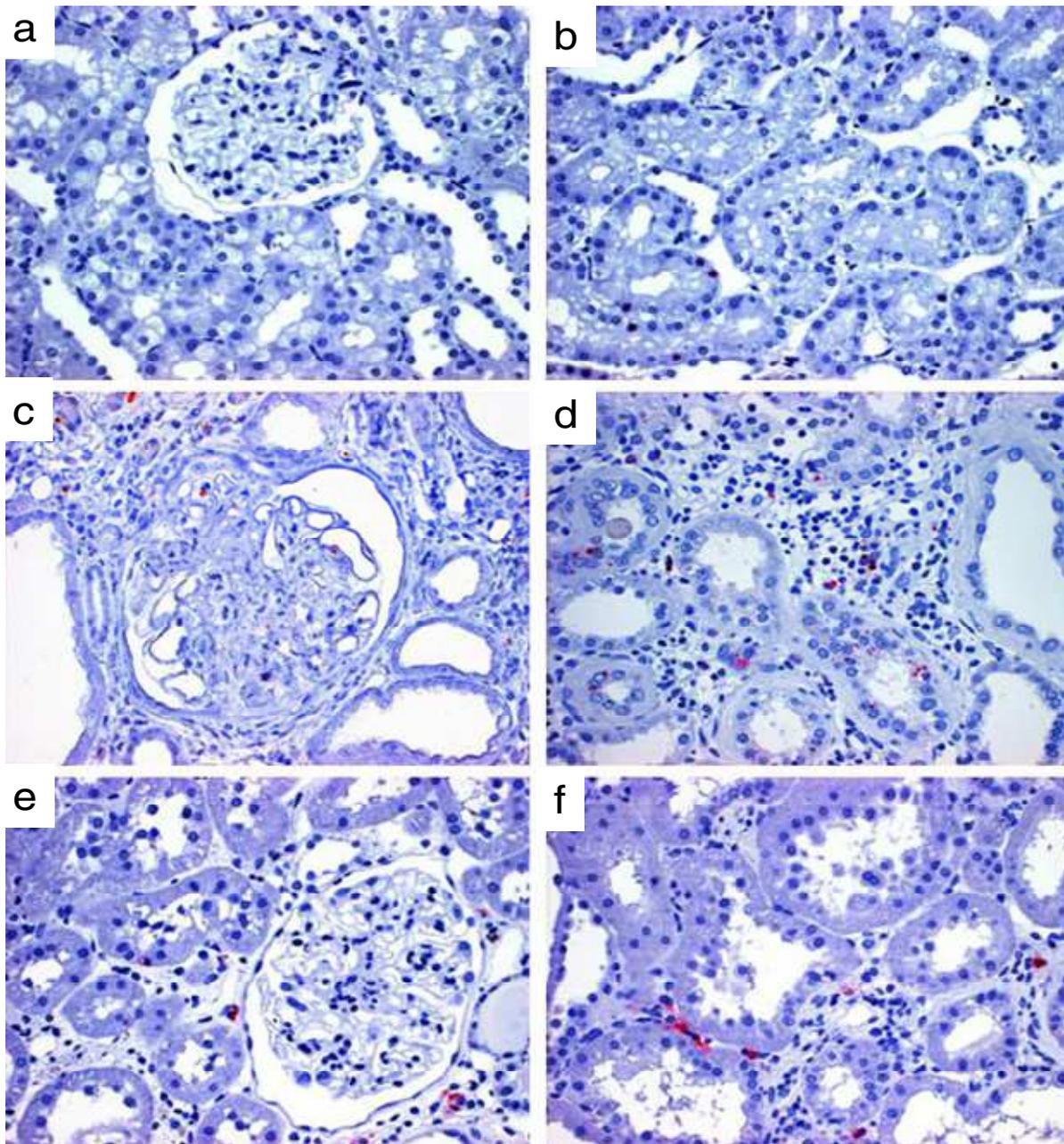


**Abbildung 37:** Aufnahmen histologischer Schnitte bei 400-facher Vergrößerung, in denen PCNA-positive Zellen immunhistochemisch markiert und mit Mayer`s Hämatoxillin gegengefärbt wurden . Diese Zellen sind durch ihre rote Färbung zu erkennen. Die Bilder (a) und (b) zeigen ein Glomerulum und ein Gesichtsfeld eines Schnittes der Kon-Gruppe (Kontrolltiere, gesund). Bilder (c) und (d) stammen aus einem Schnitt der cGS-Gruppe (chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie) und die Aufnahmen (e) und (f) aus der cGS+C21-Gruppe (chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt) und zeigen je eine Glomerulum und ein Gesichtsfeld des Kortex.

Zur Untersuchung der Apoptose wurde ein TUNEL-Assay angefertigt (**Abbildung 39**), durch welches die apoptotischen Zellen eines Gewebsschnittes nachgewiesen wurden. Die Auswertung der angefärbten Schnitte ergab für die Kon-Gruppe einen mittleren, glomerulären Anteil an apoptotischen Zellen von  $0,1 \pm 0,1$  TUNEL-positive Zellen/ Glomerulum. Kortikal war der Anteil mit  $1,9 \pm 0,6$  TUNEL-positive Zellen/ GS im Mittel etwas höher. Die cGS-Gruppe zeigte sowohl glomerulär mit  $1,1 \pm 0,1$  TUNEL-positive Zellen/ Glomerulum als auch kortikal mit  $11,1 \pm 1,1$  TUNEL-positive Zellen/ Gesichtsfeld eine signifikante Steigerung (jeweils  $p < 0,001$  cGS vs. Kon), die durch die Compound 21-Gabe signifikant gesenkt wurde auf glomerulär  $0,5 \pm 0,1$  TUNEL-positive Zellen/ Glomerulum ( $p < 0,01$  cGS+C21 vs. cGS) und kortikal auf  $6,7 \pm 1,0$  TUNEL-positive Zellen/ Gesichtsfeld ( $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS) (**Abbildung 38**).



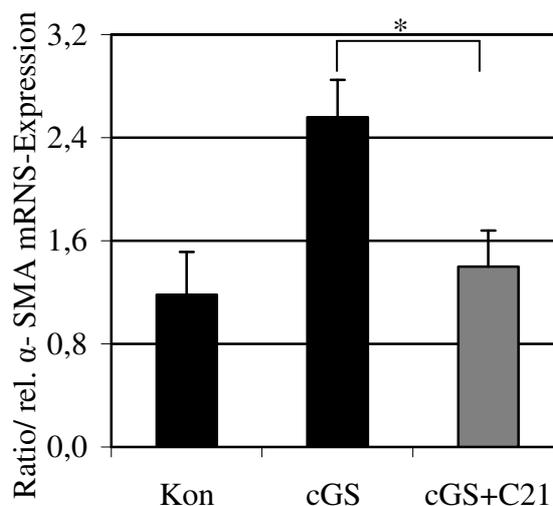
**Abbildung 38:** Anzahl TUNEL-positiver Zellen. Die Graphik (a) stellt den mittleren Gehalt apoptotischer (TUNEL-positiver) Zellen in den Glomeruli der Versuchstiere dar. Die Tiere sind in drei Versuchsgruppen eingeteilt: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. Die Graphik (b) zeigt die durchschnittliche kortikale Anzahl an apoptotischen Zellen der drei Versuchsgruppen. (\*\* =  $p < 0,01$  cGS+C21 vs. cGS; \* =  $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS)



**Abbildung 39:** Histologische Aufnahmen eines TUNEL-Assays bei 400-facher Vergrößerung und gegengefärbt mit Mayer`s Hämatoxyllin. In den Aufnahmen sind durch die rote Markierung alle apoptotischen Zellen sichtbar. Die oberen beiden Bilder zeigen ein Glomerulum (a) und ein Gesichtsfeld des Kortex (b) der Kon-Gruppe (Kontrolltiere, gesund). Die mittleren Bilder stellen die gleiche Situation (c = Glomerulum; d = Gesichtsfeld des Kortex) in der cGS-Gruppe (chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie) dar. Die unteren beiden Aufnahmen stammen von Schnitten der cGS+C21-Gruppe (chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt) und auch hier ist ein Glomerulum (e) und ein Gesichtsfeld des Kortex (f) zu sehen jedoch nach Compound 21-Gabe.

### 6.8.2 Relative $\alpha$ -SMA mRNA-Expression

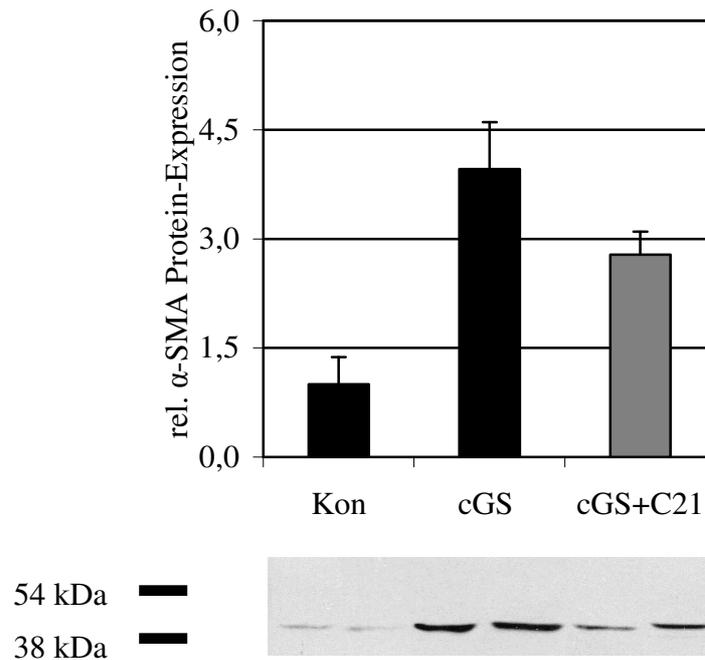
Zur weiteren Untersuchung der Proliferation wurde auf mRNA-Ebene die relative  $\alpha$ -SMA mRNA-Expression bestimmt. Die Ergebnisse der RT-PCR wurden auf die mRNA-Expression des „Housekeeping“-Gens GAPDH bezogen. Die Analyse zeigte, dass die cGS-Gruppe eine  $2,6 \pm 0,3$ -fach statistisch signifikant höhere relative  $\alpha$ -SMA mRNA-Expression aufwies als die Kon-Tiere ( $p < 0,05$  cGS vs. cGS) und dass die cGS+C21-Gruppe einen im Vergleich zur cGS-Gruppe signifikant verminderten Wert vorwies mit einer  $1,4 \pm 0,3$ -fachen relativen mRNA-Expression in Bezug auf die Kon-Gruppe ( $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS) (**Abbildung 40**).



**Abbildung 40:** Mittlere relative  $\alpha$ -SMA mRNA-Expression der drei Versuchsgruppen: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. (\* =  $p < 0,05$  cGS+C21 vs. cGS)

### 6.8.3 Relative $\alpha$ -SMA Protein-Expression

Um Unterschiede in der proliferativen Aktivität zwischen den Versuchsgruppen aufzuzeigen, wurde unter Verwendung des „Housekeeping“-Proteins GAPDH die relative  $\alpha$ -SMA Protein-Expression bestimmt (**Abbildung 41**). Die Ergebnisse zeigten, dass die cGS-Gruppe eine  $4,0 \pm 0,6$ -fach erhöhte relative Protein-Expression im Vergleich zu den gesunden Kon-Tieren aufwies ( $p < 0,05$  cGS vs. Kon) und dass diese durch den Einsatz von Compound 21 auf das  $2,8 \pm 0,3$ -fache gesenkt wurde ohne statistische Signifikanz aufzuweisen.

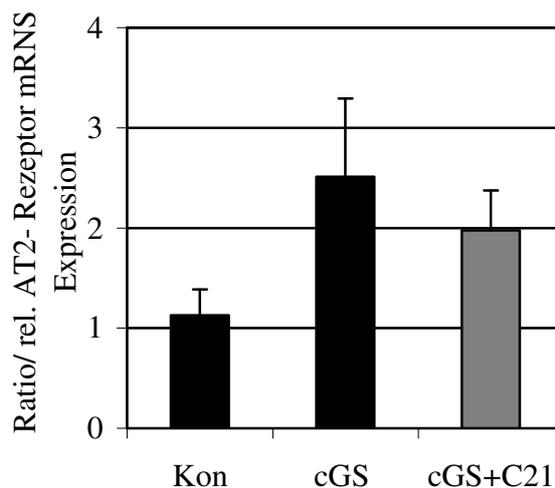


**Abbildung 41:** Graphische Darstellung der relativen  $\alpha$ -SMA Protein-Expression geordnet nach Versuchsgruppen: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. Die Differenzen der behandelten und unbehandelten Versuchsgruppen sind statistisch nicht signifikant.

Darunter befindet sich die Abbildung einer exemplarischen Western Blot-Analyse, die mit zwei Proben pro Gruppe durchgeführt wurde. Keine statistische Signifikanz nachweisbar.

### 6.9 AT2-Rezeptor-Expression

Die renale Expression der relativen AT2-Rezeptor mRNA-Expression wurde mittels RT-PCR bestimmt (**Abbildung 42**). Das Ergebnis zeigte eine Steigerung der relativen mRNA-Expression in der cGS-Gruppe auf das  $2,5 \pm 0,8$ -fache der relativen mRNA-Expression der gesunden Kontrollgruppe. Diese Steigerung der mRNA-Expression wurde in der Compound 21 behandelten Gruppe deutlich, jedoch ohne statistische Signifikanz gesenkt ( $2,0 \pm 0,4$ -fache der relativen AT2-Rezeptor mRNA-Expression der Kon-Gruppe).



**Abbildung 42:** Relative AT2-Rezeptor mRNA-Expression normalisiert auf die gesunden Kontrolltiere und bezogen auf deren GAPDH mRNA-Expression in den drei Versuchsgruppen: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt. Keine statistisch signifikanten Unterschiede vorhanden.

## 7 Diskussion

Chronische Nierenerkrankungen sind durch ihren progressiv voranschreitenden Krankheitsverlauf charakterisiert, der im totalen Versagen des Organs, bedingt durch eine massive Fibrosierung, endet. Eckpfeiler des Verlaufs dieser Erkrankung sind die tubulointerstitielle Inflammation, die Proliferation renaler Zellen und die Expansion extrazellulärer Matrix, die die Fibrosierung des Organs zur Folge haben. Eine Schlüsselrolle bei dieser Erkrankung, die selbst nach Beseitigung der Grunderkrankung einen autonom voranschreitenden Verlauf zeigen kann, nimmt das RAS ein, dessen wichtigster Mediator das AngII ist (Stünzi et al. 1990).

Ziel dieser Arbeit ist es die positiven Effekte des AT2-Rezeptors auf den progressiven Krankheitsverlauf der Anti-Thy1 induzierten chronisch-progressiven Glomerulosklerose der Ratte näher zu definieren. Zur Stimulation des Rezeptors wurde der selektive, nicht-peptidische AT2-Rezeptor Agonist Compound 21 verwendet.

AngII ist ein Oktapeptid, welches in einer Proform (Angiotensinogen) in der Leber synthetisiert wird. Angiotensinogen wird im weiteren Verlauf in der Niere durch Renin zu AngiotensinI und später in den Endothelien der Lunge durch das Angiotensin-Konvertierende-Enzym zu AngII umgewandelt. AngiotensinII ist die biologisch aktive Form, welche mit hoher Affinität an seine zwei wichtigsten Rezeptoren bindet, den AT1-Rezeptor und den AT2-Rezeptor. Bei Nagetieren existieren derweil zwei Subtypen des AT1-Rezeptors, die als AT1a- und AT1b-Rezeptor bezeichnet werden (Kim and Iwao et al. 2000). Die nach der Bindung des AT1-Rezeptors durch AngII vermittelten Wirkungen sind profibrotisch, proliferativ und proinflammatorisch (Dinh et al. 2001, Wenzel et al. 2010). Es wird vermutet, dass aus der Stimulation der AT2-Rezeptoren mittels AngII-Wirkungen resultieren, die denen der AT1-Rezeptoren entgegengestellt sind, also antifibrotisch, antiinflammatorisch und antiproliferativ wirken (Siragy et al. 2009, Steckelings et al. 2009). Der AT2-Rezeptor ist, ähnliche dem AT1-Rezeptor, ein Glykoprotein, welches aus sieben transmembranen Domänen besteht. Er erfährt durch die Bindung des AngII eine Konformationsänderung, die die Abspaltung einer aktiven Untereinheit des an den Rezeptor gekoppelten G-Proteins bedingt. Die aktive Untereinheit beginnt mit der Aktivierung von Phosphatasen, welche über Dephosphorylierungsprozesse die zellulären Effekte vermitteln. Ebenso wird, unabhängig vom G-Protein, das NO/ cGMP System, die Phospholipase A2 und die Synthese von Ceramiden aktiviert, welche bei der Vermittlung der AngII Effekte eine ebenso wichtige Funktion übernehmen (Blume A. et al. 2001, Dinh et al. 2001).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass aus der selektiven Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors im Tiermodell der chronisch-progressiven Glomerulosklerose der Ratte antifibrotische, antiinflammatorische und antiproliferative Effekte resultieren.

Bis jetzt bestand bei der Untersuchung der Angiotensinrezeptoren und dessen vermittelten Effekten keine Möglichkeit den AT<sub>2</sub>-Rezeptor direkt und selektiv zu stimulieren. Für Untersuchung wurden Zellen und Tieren mit genetisch veränderter AT-Rezeptorexpression genutzt oder es wurde mit Antagonisten des AT<sub>1</sub>-Rezeptors gearbeitet. Es existierte lediglich ein peptidischer Agonist des AT<sub>2</sub>-Rezeptors, CGP42112A, dessen Probleme in einer kurzen Halbwertszeit im Organismus bestehen, da der Agonist als Peptid schnell vom Körper abgebaut wird. Ein weiteres Problem dessen ist, dass CGP42112A am Rezeptor sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkungen entfaltet (Steckelings et al. 2009).

Erst durch die Entwicklung von Compound 21 hat sich die Situation geändert. Compound 21 wurde von L-162,313, einem Agonisten des AT<sub>1</sub>- und des AT<sub>2</sub>-Rezeptors, abgeleitet und bindet mit hoher Affinität und selektiv die extrazellulären Anteile der AT<sub>2</sub>-Rezeptoren (Wan et al. 2004). Zur Untersuchung der Effekte des Compound 21 bzw. der selektiven Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors auf den Krankheitsverlauf der cGS wurden drei Versuchstiergruppen gebildet: Kon-Gruppe = Kontrolltiere, gesund; cGS-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie; cGS+C21-Gruppe = chronische Glomerulosklerose, Uninephrektomie, Compound 21-behandelt.

Da noch keine Erfahrungen über die orale Applikation des Compound 21 vorliegen, wurde in dieser Arbeit, eine Dosis gewählt, die sich an der effektivsten Dosierung aus dem Projekt von Kaschina et al orientiert. Zudem wurde in Anlehnung an die Arbeit von Kaschina et al für das Design dieser Arbeit auf eine Versuchsgruppe mit einer kombinierten Therapie aus Compound 21 und einem AT<sub>1</sub>-Rezeptor Blocker verzichtet, da schon während dieser Untersuchungen in Bezug auf die Wirkung des Compound 21 auf myokardiale Infarkte bei normotensiven Wistar Ratten keine additiven Effekte dieser Therapieform nachweisbar waren. Begründet wird die fehlende Additivität der Kombinationstherapie durch eine maximale Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors durch Compound 21, die selbst durch die Blockade der AT<sub>1</sub>-Rezeptoren nicht weiter gesteigert werden kann. Zudem kommt es, wie in der Literaturübersicht bereits erwähnt, nach Gewebsverletzungen zu einer gesteigerten Reexpression der AT<sub>2</sub>-Rezeptoren.

Um direkte Effekte der Behandlung (d.h. selektive Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors) auf die Progression der CNI zu ermitteln, wurden Parameter der drei klassischen Eckpfeiler (Fibrose, Inflammation und Proliferation) untersucht. Zur Überprüfung der Progression der Nierenerkrankung wurden zusätzlich Nierenfunktionsparameter im Urin und Serum bestimmt. Durch die Gesamtheit der umfassenden Analysen ist eine Aussage über Funktion und

Morphologie der Niere nach der Behandlung mit Compound 21 und die Bedeutung des AT2-Rezeptors im Verlauf der CNI möglich.

Die Grundlage dieser Arbeit bildet das Tiermodell der Anti-Thy1-induzierten, chronisch-progressiven Glomerulosklerose der Ratte. Dieses Modell basiert auf dem Einsatz des mAb 1-22-3-Antikörpers in Kombination mit einer linksseitigen Uninephrektomie. Der Antikörper ist gegen ein Thy1-ähnliches Epitop auf Mesangialzellen gerichtet und führt zu deren komplementvermittelten Lyse. Die Applikation des Antikörpers geschieht über die Schwanzvene, wobei auf eine streng intravenöse Verabreichung geachtet werden muss, da sonst die gewünschte Reaktion ausbleiben kann (Martini et al. 2006, Peters et al. 2004). Die Mesangialzelllyse stellt einen einmaligen Insult der Niere dar, welcher zu einem autonomen, progressiven Verlauf führt, der im terminalen Nierenschaden endet. Das Modell gilt als Blutdruck unabhängig, da die Niere keinen extrarenalen Mechanismen ausgesetzt ist und somit der Verlauf der Erkrankung vom Blutdruck unbeeinflusst bleibt. Durch den massiven Untergang von Glomeruli kommt es zu einer starken Aktivierung des RAS, da die verminderte Anzahl an Nephronen eine kompensatorische Mehrbelastung der verblieben Glomeruli zur Folge hat, die im renalen Gewebe zur RAS aktivierenden Hypoxie führt. Der Vorteil an der parallelen Aktivität des RAS und der Gabe von Compound 21 besteht darin, dass deren Zusammenwirken in vivo beobachtet werden kann, was der Situation des späteren klinischen Einsatzes des Wirkstoffs entspricht.

In histologischen Schnitten der Nieren dieses Modells sind alle drei Phasen der Nierenschädigung parallel zu beobachten, Entzündungsprozesse, Proliferation von Zellen und fibrotischer Umbau des Organs. Diese Ereignisse gehen vom Glomerulum aus und ziehen von dort in das interstitielle Gewebe. Sie sind typisch für das Krankheitsbild der CNI und unabhängig von der auslösenden Noxe. Diese Tatsache und der Fakt, dass die Behandlung erst begonnen wird, nach dem eine Proteinurie nachweisbar ist, entsprechen der klinischen Situation, da die meisten Patienten in den Kliniken und Praxen erst vorstellig werden, wenn Symptome dokumentierbar sind, was in der Tiermedizin einen Zeitpunkt der Erkrankung voraussetzt der weiter fortgeschritten ist als in der Humanmedizin.

Kritikpunkte dieses Modells bestehen in der individuellen Reaktion der Tiere auf den Antikörper und in der Applikationsweise. Die Reaktionen der Tiere auf den Antikörper reichen von massiven Pannephrtiden mit sich entwickelnder starken fibrotischen Endstage-Kidney, über mittelgradige Entzündungs- und Fibroseerscheinungen bis hin zu minimalen Reaktion gefolgt von Ausheilung. Um Nonresponder (Tiere, die minimal oder nicht auf die Antikörperinjektion reagieren) vom Versuch auszuschließen, werden die Tiere

vor Beginn der Behandlung bezüglich ihrer Proteinurie untersucht, Nonresponder aussortiert und die verbliebenen Tiere in homogene Gruppen eingeteilt.

Die zentrale Frage der Arbeit beschäftigt sich mit der Beeinflussung des Krankheitsverlaufes der CNI durch die selektive AT<sub>2</sub>-Rezeptor Stimulation mittels Compound 21. Entsprechend den Ergebnissen wird der Verlauf der CNI durch Compound 21 positiv beeinflusst, da alle klinischen Parameter der therapierten Gruppe im Vergleich mit der nicht-therapierten Gruppe durch Compound 21 verbessert wurden.

Eine weitere zentrale Frage beschäftigte sich mit den über die AT<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelten Wirkungen, welche vermutlich antiproliferativ, antifibrotisch und antiinflammatorisch sein sollen. Die Ergebnisse der Untersuchungen bestätigen diese Annahmen. Die Compound 21 behandelte Gruppe weist in allen die Fibrose betreffenden Untersuchungen deutliche Senkungen in Bezug auf die unbehandelte Kontrollgruppe auf. Das gleiche Bild ergibt sich bei den Parametern der Inflammation und der Proliferation.

Ein kontrovers diskutierter Punkt ist die Beeinflussung des systolischen Blutdrucks durch die Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors. Die plesmythographische Messung des systolischen Blutdrucks ergibt eine signifikante Senkung in der Compound 21-behandelten Gruppe im Vergleich zur cGS-Gruppe. Diese ist nicht bedingt durch eine direkte vasodilatative Wirkung des AT<sub>2</sub>-Rezeptors, sondern durch die Verbesserung der Nierenfunktion. Die Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors führt in den renalen Endothelzellen zur Synthese und Ausschüttung von NO und somit zur Vasodilatation. Diese Dilatation ist in einer fibrotischen Endstage-Kidney aufgrund der akkumulierten extrazellulären Matrix nur begrenzt möglich. In einer Niere in der durch eine dauerhafte AT<sub>2</sub>-Rezeptorstimulation die morphologische Umstrukturierung des funktionellen Gewebes im Vergleich zur Endstage-Kidney in geringerem Maße statt gefunden hat und in der signifikant weniger extrazelluläre Matrix kummulierte, besteht für die Gefäße die Möglichkeit der besseren Versorgung des Organs und der Vasodilatation. Zudem ist in einer solchen Niere das RAS weniger aktiv und daher wird der, die Vasokonstriktion erzeugende AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermindert stimuliert. Wan et al. berichteten von einer Senkung des Blutdruckes bei spontan hypertensiven Wistar Ratten (Wan et al. 2004). Dort wurde die Bestimmung des Blutdrucks an anästhesierten Tieren durchgeführt. Die Anästhesie per se kann zu einer Aktivierung des RAS führen und das Tier ist dadurch anfälliger gegenüber einer pharmakologischen Interferenz des RAS als unter gewöhnlichen Bedingungen. Demgegenüber zeigten die Untersuchungen von Steckelings et al., die mit normotensiven Wistar Ratten arbeiteten, wie in diesem Projekt, und die den systolischen Blutdruck durch Milliarkatheter, welche in der Aorta der Tiere platziert wurden, maßen keinerlei Beeinflussung des systolischen Blutdruckes durch Compound 21 (Steckelings et al. 2009).

Auch die Steigerung der Proteinurie in den Versuchsgruppen ist abhängig vom fibrotischen Umbau der Niere, der sich im Verlauf der cGS entwickelt, in Verbindung mit der Atrophie und der Dilatation der Tubuli. Das Tubulusepithel nimmt unter physiologischen Umständen die gesamte mit dem Primärurin ausgeschiedene Menge an Proteinen mittels Endozytose auf, so dass Proteine nur in geringen Konzentrationen im Urin nachweisbar sind, wobei männliche Ratten physiologischer Weise mehr Proteine über den Urin ausscheiden als weibliche (Remuzzi et al. 1988, Vogt et al. 1965). Wird das Tubulusepithel aber geschädigt, ist es nicht mehr in der Lage, Proteine aufzunehmen. Des Weiteren kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einer Aktivierung der Podozyten, wodurch es zur Auflösung der für die Filtration notwendigen Schlitzmembranen kommt, so dass vermehrt und größere Proteine mit dem Primärurin in das Tubulussystem gelangen (Wenzel et al. 2010). Die über den Urin ausgeschiedenen Proteine induzieren eine verstärkte Infiltration des Gewebes durch Leukozyten, die einmal in das renale Gewebe gelangt mit der Synthese profibrotischer und proinflammatorischer Cytokine beginnen, die in das Tubulussystem gelangen und die Tubulusepithelien zerstören, so dass die Proteinurie weiter verstärkt wird. Dieses Phänomen ist in der cGS-Gruppe deutlich ausgeprägter als in der Compound 21-behandelten Gruppe. Die verminderte Ausscheidung von Proteinen über den Urin in der cGS+C21-Versuchsgruppe ist somit Folge der verminderten Fibrose, Inflammation und Proliferation verursacht durch die selektive Stimulation des AT2-Rezeptors.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Nierenfunktion, also des Serumharnstoff-, Serumkreatininspiegels, der glomerulären Filtrationsrate und der glomerulären Fläche/Volumens unterstreichen die Werte der Proteinurie und sind mit den Resultaten der molekularen Untersuchungen vereinbar. Da das massiv fibrotische, renale Gewebe der cGS-Versuchsgruppe im Vergleich zum gesunden, renalen Gewebe der unbehandelten Kontrollgruppe nicht mehr in der Lage ist urinpflichtige Substanzen, wie Kreatinin und Harnstoff, über das glomeruläre Ultrafiltrat oder über spätere, tubuläre Sekretionsprozesse auszuschleiden, kumulieren diese. Die Compound 21-behandelte Gruppe erreicht im Vergleich zur cGS-Gruppe einen signifikant niedrigeren Serumkreatininspiegel und einen deutlich, wenn auch nicht signifikant, verminderten Serumharnstoffspiegel. Die Differenzen in den Serumkreatinin- und Harnstoffwerten haben eine direkte Wirkung auf die glomeruläre Filtrationsrate, die in der Compound 21-behandelten Gruppe entsprechend höher ist als in der cGS-Gruppe. Benndorf et al zeigte an AT1-Rezeptor Knockout-Mäusen den gleichen Effekt. Bei diesen stieg nach renaler Ablation im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen der Harnstoff- und Kreatininspiegel in Serum und Urin signifikant an, die GFR nahm ab und die Proteinurie zu. Die verringerte morphologische Umstrukturierung bedingt durch Compound 21 zeigt sich in der vergleichenden histologischen Betrachtung der Glomeruli. Im Vergleich zur gesunden,

unbehandelten Kontrollgruppe haben die Tiere der cGS-Gruppe höchst signifikant vergrößerte Glomeruli, bedingt durch die entzündlich-fibrotische Gewebsreaktion und die gesteigerte glomeruläre Filtrationsrate in Kombination mit haemodynamischen Veränderungen, als kompensatorische Antwort des Organismus auf die reduzierte Anzahl der Nephrone. Die Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors durch die Behandlung mit Compound 21 und die daraus resultierende antifibrotischen, antiinflammatorischen und antiproliferativen Effekte führten in der cGS+C21-Versuchsgruppe in Bezug auf die cGS-Gruppe zu einer signifikanten Reduzierung der glomerulären Fläche und des glomerulären Volumens. Damit sind die Glomeruli der Compound 21-behandelten Gruppe geringeren strukturellen Umwandlungen unterlegen und sind dadurch in der Lage die Produktion des physiologischen Ultrafiltrates aufrecht zu erhalten.

#### Fibrose:

Ein wichtiger Parameter zur Beschreibung der renalen Fibrose ist der Matrixscore. Durch die Bestimmung dessen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die 20 Wochen andauernde Behandlung mit Compound 21 zu einer hoch signifikanten Senkung des Gehaltes mit Matrix-positiver Substanz in Bezug auf die nicht therapierte cGS-Gruppe führte. Die sauren Mucopolysaccharide bilden nur einen Teil der extrazellulären Matrixproteine, zu denen unter anderem noch Proteoglycane, Faserproteine und Adhäsionsproteine gehören. In den weiteren Untersuchungen wurde auf Proteinebene und/oder mRNA-Ebene der Gehalt an TGF- $\beta$ , Fibronectin, Kol I, PAI-1 und TIMP-1 bestimmt.

Das wichtigste profibrotische Zytokin ist TGF- $\beta$ . Es ist ein multifunktionales Zytokin, das aus einem 25 kDa großem Homodimer und einem 75 kDa großem Latency-Associated-Peptide (LAP) besteht. Das TGF- $\beta$  hat durch seine Fibroblasten rekrutierende und aktivierende Wirkung direkten Einfluss auf die Intensität der Fibronectinsynthese und ist eines der wichtigsten profibrotischen Zytokine. In der Niere wird es vor allem in den Glomeruli befindlichen Leukozyten und von den distalen Tubuluszellen gebildet und es führt zu einer gesteigerten Synthese von Matrixproteinen bei gleichzeitiger Inhibition des Abbaus derer. TGF- $\beta$  stoppt den Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase, es stimuliert die Angiogenese, die Wundheilung und Proliferation mesangialer Zellen. Seine Synthese wird bei chronischen Erkrankungen der Niere durch die Aktivierung des RAS stark gesteigert. Seine Wirkungen werden über spezifische Oberflächenrezeptoren mediiert, welche nach der Bindung von TGF- $\beta$  die TGF- $\beta$  Signaltransduktionsmoleküle (Smad) phosphorylieren, die in den Kern der Zelle eindringen und dort über Smad bindende Elemente TGF- $\beta$  spezifische Gene aktivieren. In dieser Arbeit wurde in der cGS-Gruppe die stärkste Expression des TGF- $\beta$  sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene bestimmt. Durch die Compound 21-Behandlung über

20 Wochen konnte die Expression des TGF- $\beta$  jedoch auf mRNA- und Proteinebene gesenkt werden. Eine Signifikanz wurde nur auf Proteinebene erreicht. Bereits Kim et al. haben in Tierversuchen zeigen können, dass der Einsatz von AT1-Rezeptor Antagonisten eine deutliche Minderung der TGF- $\beta$ -Expression zur Folge hat und, dass daraus resultierend die Expression extrazellulärer Matrix reduziert wurde (Kim et al. 1997). Die Senkung der TGF- $\beta$ -Expression beeinflusst nicht nur die Expression von Fibronectin und Kol I, sondern auch alle anderen Parameter der Fibrose und zum Teil auch der Inflammation und Proliferation.

Fibronectin und Kol I gehören zu den Faserproteinen und bilden die Struktur der extrazellulären Matrix (Van Vliet et al. 2001). Fibronectin tritt in verschiedenen Isoformen auf, die unterschiedliche Funktionen während der fetalen Entwicklung oder bei fibrotischen Erkrankungen übernehmen können und wird von verschiedenen Zelltypen wie z.B. den Myofibroblasten und Fibroblasten synthetisiert. Die wichtigsten Isoformen des Fibronectins, welche bei jeder chronischen Nierenerkrankung expremiert werden, sind ED-A-positives Fibronectin, welches bei tubulointerstitiellen fibrotischen Läsionen auftritt und das ED-B-positive Fibronectin, das vorwiegend in sklerotischen Glomeruli zu finden ist. Fibronectin ist ein Dimer mit einem molekularen Gewicht von ca. 440 kDa und jedes Monomer setzt sich aus drei verschiedenen Modulen zusammen (Mosaikprotein). An den Modulen befinden sich unterschiedliche Bindungsdomänen, durch welche das Fibronectin in der Lage ist extrazelluläre Matrixproteine, wie Kol I oder Thrombospondin, Rezeptoren der Zelloberfläche, wie Integrine, im Blut zirkulierende Proteine, wie Fibrin, und Glycosaminglycane, wie Heparin und Chondroitinsulfate zu binden (Forst et al. 2009, Potts and Campbell et al. 1994). Dadurch kann Fibronectin mit Komponenten verschiedenster Systeme, wie dem Komplementsystem, der Gerinnungskaskade, des fibrinolytischen Systems, den Akute-Phase-Proteinen, des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix interagieren und Bindungen mit Fibroblasten, Neuronen, Phagozyten und Bakterien eingehen. Die Funktionen reichen von der Adhäsion bestimmter Zellen über die Proliferation von Zellen bis hin zur Regulation des Aufbaus der extrazellulären Matrix. Die Adhäsion von Zellen an Fibronectin ist durch die bereits erwähnten Integrine möglich, die auch auf der Oberfläche von z.B. Lymphozyten oder Thrombozyten expremiert werden (Blum et al. 2005, McCarty et al. 2004, Van Vliet et al. 2001). Hier fungieren sie als Rezeptoren (Johansson et al. 1997, Sharma et al. 1999). Des Weiteren besitzt Fibronectin eine spezifische Bindungsstelle für Kollagen, welche für die Vernetzung der extrazellulären Matrix wichtig ist (Engvall and Ruoslahti et al. 1977). In den Nieren der nicht behandelten cGS-Tiere kommt es zur Akkumulation von Fibronectin. Dieses Ergebnis wurde auf mRNA- und auf Proteinebene verifiziert und entspricht dem ermittelten Matrixscore. Die relative Fibronectin mRNA-Expression der Compound 21-behandelten Gruppe ist in Bezug auf die cGS-Gruppe signifikant vermindert. Dies bestätigt

auch die Bestimmung der relativen Fibronectin Proteinexpression, welche die gleiche, deutliche Tendenz erkennen lässt, jedoch ohne Signifikanz. Ähnliche Beobachtungen machten auch Benndorf et al an AT1-Rezeptor Knockout Mäusen. Hier zeigten die Knockout-Tiere nach renaler Ablation eine signifikant stärkere Expression von Fibronectin auf mRNA-Ebene als die Wildtyp Mäuse (Benndorf et al. 2009). Die Senkung des exprimierten Fibronectins kann der verminderten Synthese und Ausschüttung verschiedener Zytokine und Chemokine zugeschrieben werden.

Die Verminderung der Fibronectinexpression kann nicht nur den fehlenden, direkten Wirkungen des TGF- $\beta$  zugeschrieben werden (Okuda et al. 1992). TGF- $\beta$  steigert auch die Produktion von Proteaseinhibitoren, die den Abbau der Matrixproteine durch die Störung des fibrinolytischen Systems verlangsamen. Typische Inhibitoren sind PAI-1 und TIMP-1, die im Falle der Fibrose zur Akkumulation der Matrixproteine beitragen.

Ein weiterer Parameter der Fibrose und Bestandteil der extrazellulären Matrix ist das Kol I (Makino et al. 1992). Auch dieses wird im Falle einer fibrotischen Erkrankung vermehrt von Fibroblasten, welche durch TGF- $\beta$  rekrutiert und aktiviert wurden, synthetisiert und im Regelfall durch Proteasen wieder abgebaut. Der Kol I-Gehalt wurde auf histologischer Ebene, auf mRNA-Ebene und auf Proteinebene bestimmt. In der cGS-Gruppe ist der Gehalt an Kol I auf Ebene der mRNA-Expression und auf histologischer Ebene in Bezug auf die gesunden Kontrolltiere signifikant erhöht. Der Proteinnachweis mittels Western Blot zeigt die gleiche Tendenz. In der cGS+C21-Gruppe konnte der Gehalt an Kol I in Bezug auf die cGS-Gruppe auf mRNA- und histologischer Ebene signifikant gesenkt werden und das Ergebnis des Western Blot unterstreicht diesen Effekt. Der pathophysiologische Mechanismus entspricht dem des Fibronectins, da auch der Abbau des Kol I abhängig ist von der Expression des TGF- $\beta$  und durch die Proteaseinhibitoren vermindert wird. Da aber Compound 21 die Synthese von TGF- $\beta$  reduziert, werden so weniger Proteaseinhibitoren synthetisiert und somit können die Matrixproteine, wie Kol I und Fibronectin schneller abgebaut werden und die Fibrosierung des Organs wird verlangsamt.

Die wichtigsten Proteaseinhibitoren sind PAI-1 und TIMP-1. PAI-1 ist ein einzelsträngiges Glycoprotein, welches aus 379 Aminosäuren besteht. Es gehört zu der Familie der Serin-Protease-Inhibitoren (SERPIN) und ist der wirkungsvollste Inhibitor des Gewebs-Plasminogen-Aktivators und des Urokinase-Plasminogen-Aktivators (Loskutoff et al. 1987). Diese beiden Aktivatoren des Plasminogens sind wichtige Bestandteile der Fibrinolyse, tragen intensiv zum Abbau der extrazellulären Matrix bei. PAI-1 hemmt die Plasminogen-Aktivatoren, in dem es die Struktur ihrer Substrate imitiert und so ihre Bindung verhindert. Neben der Fibrinolyse/Proteolyse beeinflusst PAI-1 auch die Zellmigration bei Entzündungsreaktionen und fibrotischen Erkrankungen. Die Synthese von PAI-1 findet in

vielen verschiedenen Zellen statt, wie z.B. Hepatozyten, Adipozyten, glatte Muskelzellen, Thrombozyten, Endothelzellen und Tumorzellen und wird durch Zytokine, wie IL 6, TNF- $\alpha$ , Lipoproteine und TGF- $\beta$  stimuliert. Bei fibrotischen Erkrankungen wird die Synthese von PAI-1 vor allem durch TGF- $\beta$  aktiviert, jedoch regen auch Renin, AngiotensinII und Aldosteron die Synthese an. Während der Inflammation kann die Synthese von PAI-1 unter Anderem von IL 6 und TNF- $\alpha$  stimuliert werden (Pihusch et al. 2005).

TIMP-1 ist einer der vier Vertreter der TIMP Familie und spielt durch die Hemmung aller bekannter Matrix-Metalloproteinasen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen der Deposition und Degradation der extrazellulären Matrix, zu dem bei der Zellproliferation und Apoptose, Inflammation, chronisch degenerative Erkrankungen (CNI) und der Metastasierung von Tumoren. Die Synthese von TIMP-1 wird über verschiedene Zytokine, wie z.B. TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  reguliert (Fassina et al. 2000, Gomez et al. 1997).

Die Expression des PAI-1 und des TIMP-1 wurden im Nierengewebe der Versuchsgruppen auf mRNS-Ebene bestimmt. Die cGS-Gruppe zeigt signifikant erhöhte Werte in Bezug auf die Kon-Gruppe und in der cGS+C21-Gruppe konnte eine signifikante Senkung der Expression in Bezug auf die cGS-Gruppe nachgewiesen werden. Die Steigerung der Expression des PAI-1 und des TIMP-1 in der cGS-Gruppe resultiert zum Großteil aus der stark erhöhten TGF- $\beta$ -Expression. Da diese in der cGS+C21-Gruppe signifikant gesenkt wurde, kommt es zu einer direkten Beeinflussung der Expression der beiden Proteinaseinhibitoren in Form der nachgewiesenen, signifikanten Verminderung.

Die Gesamtheit der Ergebnisse dieser Arbeit, die aus den Untersuchungen der fibrotischen Parameter stammen, zeigt eine deutliche antifibrotische Wirkung auf, die durch die selektive Stimulation des AT2-Rezeptors mittels Compound 21 hervorgerufen wurde. Über die antifibrotischen Wirkungen des AT2-Rezeptors gibt es kontroverse Ergebnisse und Meinungen. So wiesen Mifune et al. profibrotische Effekte des AT2-Rezeptors an glatten Gefäßmuskelzellen nach, die nach der Stimulation des AT2-Rezeptors vermehrt Kollagen synthetisierten. In der selben Arbeit wird aber auch gezeigt, dass die Stimulation der AT2-Rezeptoren auf Fibroblasten zu einer Verminderung der Kollagensynthese führt (Mifune et al. 2000). So kann davon ausgegangen werden, dass die Stimulation des AT2-Rezeptors an verschiedenen Zelltypen zu heterogenen Effekten führt. Die Resultate der meisten in vivo Untersuchungen zeigen jedoch eine antifibrotische Wirkung des stimulierten AT2-Rezeptors auf.

So konnten Wu et al. die Reduzierung des fibrotischen Organumbaus bereits in Versuchen mit AT2-Rezeptor Null Mäusen und Wildtyp-Mäusen feststellen, denn hier führte die Blockade

des AT1-Rezeptors durch Valsartan nach partieller Ligation der Aorta zu einer geringeren perivaskulären Fibrosierung mit signifikant verminderter Kol I-Expression bei Wildtyp Mäusen im Vergleich zu den AT2-Rezeptor Null Mäusen (Wu et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse zeigten Untersuchungen von Kaschina et al, die eine Reduktion des fibrotischen Gewebsumbaus in der Randzone von myokardialen Infarkten beobachten konnte. Naito et al konnte an Ratten, die einer 5/6 Nephrektomie unterzogen wurden, zeigen, dass eine Behandlung solcher Tiere mit einem AT1-Rezeptorblocker im Vergleich zur Behandlung mit einem AT2-Rezeptorblocker und einer Kombinationstherapie zu einer signifikant verminderten Expression von TGF- $\beta$ , PAI-1 und Kol I führt (Naito et al. 2009).

Die molekularen Mechanismen hinter der antifibrotischen Wirkung begründen sich vor allem in der durch AngII induzierten TGF- $\beta$ -Expression. Die verstärkte Synthese von TGF- $\beta$  hat bewirkt in seinen Zielzellen über die Aktivierung von Smad2 und Smad3 eine verstärkte Expression von PAI-1 und TIMP-1 (Flanders et al. 2004). Die rekrutierten Fibroblasten/ Myofibroblasten beginnen im Interstitium und in den Glomeruli mit der exzessiven Synthese extrazellulärer Matrix, die sich unter anderem aus Fibronectin und Kol I zusammensetzt. PAI-1 und TIMP-1 hemmen die Fibrinolyse und bedingen so die Akkumulation der extrazellulären Matrixproteine in den Kompartimenten der Niere. Durch den Einsatz des Compound 21 wird direkt in diese Regelkreise eingegriffen, denn die Stimulation des AT2-Rezeptors führt zu einer Senkung der TGF- $\beta$ -Expression. Dementsprechend wandern weniger Fibroblasten/ Myofibroblasten in das renale Gewebe ein und es werden weniger Effektorzellen zur Synthese von PAI-1 und TIMP-1 angeregt. Daraus resultiert eine verminderte Synthese der extrazellulären Matrix und eine beschleunigte Degradation dieser, da weniger Inhibitoren der Fibrinolyse exprimiert werden.

#### Inflammation:

Die Wirkung der AT2-Rezeptor Stimulation auf die inflammatorischen Prozesse, die sich während der CNI im renalen Gewebe abspielen, wurden auf den gleichen Ebenen wie die der Fibrose untersucht.

Zur Untersuchung der antiinflammatorischen Effekte des Compound 21 bzw. der selektiven Stimulation des AT2-Rezeptors wurden in Gewebsschnitten der Nieren spezifische, inflammatorische Zelltypen (CD3- und ED1-positive Zellen) angefärbt. Während in den Nieren der cGS-Gruppe höchst signifikant mehr CD3-positive Zellen, also Lymphozyten, und ED1-positive Zellen, also Makrophagen, sowohl glomerulär als auch kortikal nachgewiesen werden konnten, konnte dieser Gehalt an Entzündungszellen durch die Compound 21-Behandlung hoch signifikant vermindert werden. Ein ähnliches Ergebnis stammt aus einem Versuch, in dem Wildtyp-Mäuse und AT2-Rezeptor-Null-Mäusen verwendet wurden. An

diesen Tieren wurden die Effekte des AT1-Rezeptor Blockers Valsartan in Bezug auf das vaskuläre Remodeling nach Cuff-induzierter Gefäßverletzung der Femoralarterie untersucht (Wu et al. 2001). Hier konnte gezeigt werden, dass eine Intimaverletzung bei AT2-Rezeptor-Null-Mäusen zu einer deutlich stärkeren Infiltration des Gewebes durch Makrophagen und Lymphozyten führte, als sie bei den Wildtyp-Mäusen zu beobachten war. Durch eine AT1-Rezeptor Blockade mittels Valsartan konnte an den gleichen Tieren eine verminderte Infiltration des renalen Gewebes durch die Entzündungszellen nachgewiesen werden. Dieser Effekt war bei den Wildtyp-Mäusen wesentlich stärker ausgeprägt, als bei den AT2-Rezeptor-Null-Mäusen. Auch Wenzel et al. beschreiben diesen Effekt an AT2-Rezeptor Knockout-Mäusen (Wenzel et al. 2010). Hier kommt es nach renaler Ablation bei den Knockout-Tieren zu einer verstärkten Infiltration des renalen Gewebes durch Monozyten und Makrophagen und zur massiveren Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Wenzel et al. 2010).

Auf mRNA-Ebene wurde die relative Expression von drei Zytokinen in den verschiedenen Versuchsgruppen bestimmt (IL-6, TNF $\alpha$  und MCP-1). Einer der wichtigsten proinflammatorischen Mediatoren ist das Interleukin 6. Dieses pleiotrope Zytokin ist neben TNF- $\alpha$  und Interleukin 1 einer der potentesten Induktoren der Akut-Phasen-Antwort und kann durch verschiedene Zellen im Organismus synthetisiert werden. Im Falle einer Entzündung wird es vor allem durch Makrophagen/ Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen produziert und ausgeschüttet. Es hat ein Molekulargewicht von 26 kDa und besteht aus 184 Aminosäuren. Die Akute-Phase-Antwort wird ausgelöst durch die Störung der Homeostase, wie z.B. durch Infektionen, durch Gewebsverletzung, Neoplasien und immunologische Störungen. Dadurch bedingt werden Makrophagen/ Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen aktiviert, die mit der Synthese von IL 6, TNF- $\alpha$ , IL 1 und Interferonen beginnen. Diese üben dann verschiedene systemische Effekte aus. Das wichtigste Effektororgan des IL 6 ist die Leber. In den Hepatozyten führt die Bindung von IL 6 an dessen Rezeptoren zu einer massiven Synthese von Akut-Phase-Proteinen führt. Des Weiteren stimuliert IL 6 die Antikörperproduktion von aktivierten B-Zellen und unterstützt entscheidend die Aktivierung von T-Zellen. Es beeinflusst den Hypothalamus und führt so zur Ausbildung von Fieber, es stimuliert die Ausschüttung von Cortisol und die Haematopoese wodurch es zur Leukozytose kommt. Das Ziel der Akut-Phasen-Antwort ist die Behebung der Störung in der Homeostase (Heinrich et al. 1990). Zudem hat IL 6 eine chemotaktische Wirkung vor allem auf Monozyten, auf denen es eine verstärkte Expression von Integrinen bewirkt, wodurch diese fähig sind zur Adhäsion auf Endothelzellen (Clahsen et al. 2009, Clahsen and Schaper et al. 2008, Weissenbach et al. 2004). In dieser Arbeit wurde die relative IL 6 mRNA-Expression im renalen Gewebe der Versuchstiere bestimmt und das Ergebnis zeigt

eine signifikante Erhöhung der IL 6 mRNA-Expression in der cGS-Gruppe bezogen auf die gesunde Kontrollgruppe. Die Compound 21-Behandlung und somit die dauerhafte Stimulation der AT2-Rezeptoren führt zu einer deutlichen Senkung der IL 6 mRNA-Expression und daraus resultierend zu einer geringeren Aktivierung der Akute-Phase-Antwort. Dieser antiinflammatorische Effekt des Compound 21 konnte auch schon durch Kaschina et al. beobachtet werden (Kaschina et al.2008). Dort wurde an TNF- $\alpha$  stimulierten fetalen Kardiomyocyten der Zelllinie H9C2 eine signifikante Reduzierung des IL 6-mRNA-Levels auf das Niveau unbehandelter Zellen durch eine Behandlung mit Compound 21 erreicht.

Ein ähnlich wichtiges proinflammatorisches Zytokin ist TNF- $\alpha$ . Dies ist ein Polypeptidhormon mit einem Molekulargewicht von 17 kDa. Es wird vorwiegend durch Makrophagen synthetisiert und die durch TNF- $\alpha$  bedingten Effekte sind stark dosisabhängig und treten in den verschiedensten Geweben, wie Leber, Muskulatur, Niere, Magen-Darmtrakt und dem Fettgewebe auf. Das Zytokin mediiert diverse Wirkungen, die in drei große Gruppen eingeteilt werden können. Es hat eine antitumor Wirkung, eine metabolische Wirkung und es beeinflusst die Immunantwort, z.B. durch die Stimulation der IL 6-Synthese. Im Falle einer Infektion bzw. Entzündung wird seine Synthese durch die Anwesenheit von Antigenen viralen, bakteriellen und parasitären Ursprungs stimuliert. Es vermittelt seine Effekte durch spezifische Oberflächerezeptoren der Zielzellen, entweder durch die direkte Stimulation der Zelle oder durch die Ausschüttung weiterer Mediatoren. Zu den Effekten gehört die Steigerung der Leukozyten-Chemotaxis, der Phagozytose, der Superoxid, die Kollagenase Produktion und der Stimulation des Fibroblastenwachstums (Figari et al. 1987, Mencoboni et al. 1992). Die relative mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  wurde in den Proben der Versuchstiere bestimmt und die cGS-Gruppe zeigt einen höchst signifikanten Anstieg. Diese Zunahme konnte durch die Compound 21-Gabe deutlich, jedoch nicht signifikant, gesenkt werden. Die Senkung der relativen TNF- $\alpha$  mRNA-Expression unterstreicht das Ergebnis der IL 6-Untersuchung und die durch Kaschina et al. bekannten antiinflammatorischen Effekte des Compound 21 (Kaschina et al. 2008).

Das letzte in dieser Arbeit bestimmte inflammatorische Chemokin ist MCP-1. Dieses wird beispielsweise durch Mesangialzellen, Endothelzellen, gewebseinfiltrierende Monozyten und Tubulusepithelzellen synthetisiert und ausgeschüttet. Seine wichtigste Funktion ist es als chemotaktischer Faktor für Monozyten zu fungieren (Deshmane et al. 2009). Dabei wirkt MCP-1 nicht nur auf diesen Zelltyp, sondern fördert auch die Gewebseinfiltration durch basophile Granulozyten (Bischoff et al. 1992, Taub et al. 1995).

Zu dem steigert es die IL 6-Synthese durch Tubulusepithelzellen, wodurch es eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen spielt. Des Weiteren beeinflusst MCP-1 im Falle einer

Nephritis die Progression der Erkrankung, da es zur Hyperproliferation der Mesangialzellen und zur tubulären Atrophie führt. Außerdem weist es eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten und Makrophagen auf. Zusätzlich wird MCP-1 eine wichtige direkte Rolle bei der Inflammation und Progression chronischer Nierenerkrankungen zugesprochen. In Versuchen mit MCP-1-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass es bei einer Serum-induzierten Nephritis zur geringeren Ausbildung tubulointerstitiellen Läsionen kommt und sich eine geringere Proteinurie und Glomerulosklerose entwickelt (Viedt and Orth et al. 2002). Die Bestimmung des MCP-1 geschah in dieser Arbeit auf mRNA-Ebene und zeigt in der cGS-Gruppe eine hoch signifikante Steigerung der Expression 20 Wochen nach Induktion der Erkrankung, die durch die Compound 21-Behandlung signifikant gesenkt werden kann.

Die reduzierte Synthese der proinflammatorischen Cytokine TNF- $\alpha$  und IL 6, die in der Compound 21-behandelten Gruppe nachgewiesen wurde, führt auf der Zelloberfläche der Makrophagen/ Monozyten zu einer verminderten Expression von Integrinen, wodurch diese Zellen nicht mehr in der gleichen Intensität dazu fähig sind an den Endothelzellen der Gefäße zu haften und in das renale Gewebe einzudringen, wie es in der cGS-Gruppe der Fall ist. TNF- $\alpha$  und IL 6 sind zu dem in der Lage die Fibrosierung eines Organs zu beeinflussen, da sie die Synthese von PAI-1 und TIMP-1 beeinflussen, welche eine physiologische Degradation der extrazellulären Matrix verhindern, wodurch es zu ihrer Akkumulation kommt.

Die Verminderung der MCP-1 Expression hat direkten Einfluss auf die inflammatorischen Prozesse, die im renalen Gewebe ablaufen. Wird die Expression des MCP-1 gesenkt, so wird der chemotaktische Effekt auf Makrophagen/ Monozyten reduziert und die Infiltration des renalen Gewebes durch diese Zelltypen wird vermindert. Dadurch wird die Expression des IL 6 direkt negativ beeinflusst, dessen Hauptquelle die, in das Gewebe infiltrierte Makrophagen/ Monozyten sind. Kaschina et al. war es ebenfalls möglich eine signifikante Senkung des MCP-1 und des IL 6-mRNA-Levelns bedingt durch die Compound 21 Gabe in der Infarktzone des Herzens bei normotensiven Wistar Ratten nachzuweisen (Kaschina et al. 2008). Diese antiinflammatorische Wirkung des AT2-Rezeptors wurde auch durch Benndorf et al. aufgezeigt. Hier wurde mit AT1-Rezeptor Knockout Mäusen gearbeitet, welche nach renaler Ablation einen signifikant stärkeren Anstieg der MCP-1 mRNA-Expression im Vergleich zu Wildtypmäusen aufwiesen. Zudem kam es bei den Knockout Mäusen zu einer signifikant stärkeren Infiltration des renalen Gewebes durch Monozyten/ Makrophagen als sie bei den Wildtyp Mäusen zu beobachten war (Benndorf et al. 2009). Die entzündungshemmende Wirkung des AT2-Rezeptors wird stark kontrovers diskutiert. Esteban et al. konnte proinflammatorische Effekte bedingt durch den AT2-Rezeptor nachweisen. Das dort verwendete AT1-Rezeptor Knockout Mausmodell zeigt nach Obstruktion der Harnleiter

eine massive Infiltration des Gewebes durch Monozyten, die durch den Einsatz eines AT2-Rezeptor Antagonisten signifikant vermindert wurde (Esteban et al. 2004). Diese widersprüchlichen Ergebnisse werden von Wenzel et al durch die mangelnde Spezifität des AT2-Rezeptor Antagonisten PD123.319 begründet, die immer zu beobachten ist, wenn PD123.319 in zu hohen Dosen und vor allem in vivo verwendet wird (Wenzel et al. 2010). Auch Unger et al und Rompe et al proklamieren für den AT2-Rezeptor eine antiinflammatorische Wirkung, wodurch die Resultate dieser Arbeit bestätigt werden (Rompe et al. 2010, Unger and Dahlof et al.).

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen eine antiinflammatorische Wirkung des Compound 21, die bei der Behandlung der Anti-Thy1-induzierten, chronisch-progressiven Glomerulosklerose zu beobachten ist. Ob dieser Effekt allein durch die Stimulation des AT2-Rezeptors hervorgerufen wird, kann mittels der Resultate dieser Arbeit nicht endgültig beantwortet werden, da das physiologischer Weise im Organismus vorhandene AngII in diesem Modell weiterhin die noch in der Niere auftretenden AT1-Rezeptoren und andere Rezeptoren stimuliert. Um Effekte, die durch den AT1-Rezeptor vermittelt werden, vollständig auszuschließen müssen weitere Untersuchungen folgen, in denen im gleichen Tiermodell zusätzlich mit AT1- und AT2-Rezeptorblockern gearbeitet wird.

#### Proliferation:

Die Effekte des Compound 21 auf die proliferative/ apoptotische Aktivität der renalen Zellen während des Krankheitsverlaufes der CNI wurde auf histologischer Ebene, auf Ebene der mRNA-Expression und der Protein-Expression untersucht.

In dieser Arbeit wurden zur Charakterisierung der Proliferation des renalen Gewebes verschiedene Parameter bestimmt. Beim PCNA handelt es sich um einen allgemeinen Marker proliferierender Zellen (Gabbiani et al. 1992). PCNA ist ein ringförmiges Protein, das aus 780 Aminosäuren besteht und welches eine wichtige Rolle bei der Zellteilung einnimmt. Während des Zellzyklus ist PCNA in den letzten 5 % der G1-Phase und den ersten 35 % der S-Phase in hohen Konzentrationen in der Zelle vorhanden. Seine Wirkungen sind abhängig von der An- und Abwesenheit des p53. Liegt PCNA in der Zelle in hohen Konzentrationen vor und ist p53 anwesend, so erfolgt die Replikation der DNS. Fehlt p53 aber, so kommt es zur Reparatur von eventuellen Schäden der DNS. Der dritte mögliche Effekt von PCNA kann nur in Abwesenheit von p53 erfolgen. Genau in dieser Situation ist PCNA in der Lage die Apoptose einer Zelle auszulösen und zwar, wenn es in hoher Konzentration in der Zelle vorliegt in Abwesenheit von p53 und eine Reparatur der DNS nicht möglich ist. Dieser Effekt kann auch

dann vermittelt werden, wenn PCNA in zu geringer Konzentration in der Zelle vorliegt oder es vollständig abwesend ist (Paunesku et al. 2001).

Für diese Arbeit wurden mittels markierter Antikörper in histologischen Schnitten die PCNA-positiven Zellen im renalen Gewebe angefärbt. Die Ergebnisse dieser Färbung zeigen höchst signifikante Differenzen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. So weist die cGS-Gruppe höchst signifikant mehr PCNA-positive und somit proliferierende Zellen in den Glomeruli und im Interstitium auf, als die gesunde Kontrollgruppe. Durch die andauernde Compound 21-Gabe konnte der Anteil PCNA-positiver Zellen im Vergleich zur cGS-Gruppe in beiden Kompartimenten höchst signifikant vermindert werden. Dieses Ergebnis zeigt eine deutliche antiproliferative Tendenz der Behandlung der Ratten mit Compound 21. Wu et al. zeigten an AT2-Rezeptor Null Mäusen und Wildtyp-Mäusen nach partieller Aortenligation und AT1-Rezeptorblockade ähnliche Ergebnisse. Es wurden unbehandelte AT2-Rezeptor-Null-Mäuse mit unbehandelten Wildtyp-Mäusen und Valsartan-behandelten Wildtyp-Mäusen 6 Wochen nach der Aortenligation verglichen. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Verminderung PCNA-positiver Zellen im Vergleich zu der Gruppe der AT2-Rezeptor-Null-Mäuse. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Durchmesser der Gefäßwand der AT2-Rezeptor-Null-Mäusen signifikant höher war, als bei den mit Valsartan behandelten Wildtyp-Mäusen (Wu et al. 2002).

In Zellkulturversuchen an Oligodendrogliazellen konnte zudem nachgewiesen werden, dass das proinflammatorische Cytokin TNF- $\alpha$  und das profibrotische Cytokin TGF- $\beta$  direkten Einfluss haben auf die Expression des PCNA. TNF- $\alpha$  führt zu einer Reduzierung der PCNA-Expression und TGF- $\beta$  steigert diese (Yu et al. 2000).

Neben der Bestimmung der proliferativen Parameter wurde ein TUNEL-Assay angefertigt, um einen Überblick über die apoptotische Aktivität des renalen Gewebes zu erhalten. Das Ziel der Proliferation besteht in der strukturellen und funktionellen Wiederherstellung des Gewebes, die nur erreicht werden kann, wenn überschüssiges Gewebe durch den geplanten Zelltod untergeht. Ein Problem des TUNEL-Assays liegt in seiner geringen Spezifität, da nicht nur apoptotische Zellen, sondern auch nekroptotische Zellen angefärbt werden. Unter Nekroptose wird die koordinierte Nekrose verstanden und in Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass an diesem Prozess 432 Gene beteiligt sind (Hitomi et al. 2008). Die nekroptotischen Zellen sind aber in Hinblick auf die Proliferation nicht von Interesse und können die Ergebnisse des TUNEL-Assays verfälschen. Somit wurde der TUNEL-Assay zur Unterstreichung der PCNA und  $\alpha$ -SMA Ergebnisse durchgeführt.

Das Ergebnis des TUNEL-Assays bestätigt die Resultate der proliferativen Parameter (PCNA,  $\alpha$ -SMA). In der cGS-Gruppe ist eine höchst signifikante Steigerung der Anzahl TUNEL-positiver Zellen sowohl im Interstitium als auch in den Glomeruli zu verzeichnen. Die hohe

Anzahl an TUNEL-positiven Zellen konnte in der Compound 21 behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zur cGS-Gruppe hoch signifikant gesenkt werden. Kaschina et al. haben ebenfalls verschiedene Apoptosemarker in der Infarktzone von Rattenherzen bestimmt. Dort konnte via Immunblotting gezeigt werden, dass die Expression von Caspase-3 und Fas Ligand im Vergleich zur unbehandelten kranken Kontrollgruppe durch die Compound 21 Behandlung signifikant vermindert wurden (Kaschina et al. 2008).

Zellkulturversuche an PC12W Zellen, die den AT2-Rezeptor übermäßig und den AT1-Rezeptor nicht exprimieren, haben gezeigt das eine Stimulation der Rezeptoren zu morphologischen Veränderungen der Zellen führen, die typisch für die Apoptose sind (Yamada et al. 1996).

Die Proben der Versuchstiere wurden des Weiteren zur Bestimmung der  $\alpha$ -SMA mRNA-Expression genutzt.  $\alpha$ -SMA ist ein Marker für Myofibroblasten. Diese Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Wundkontraktion und Wundheilung, da sie neben ihrer Fähigkeit zur Kontraktion auch in der Lage sind extrazelluläre Matrix zu produzieren. Durch diese Fähigkeit übernehmen sie wichtige Funktionen während der Fibrosierung verschiedener Organe, unter Anderem in der Niere, in der sie in Zusammenhang mit der Progression der Erkrankung stehen (Gabbiani et al. 1992). In der Niere sind Myofibroblasten unter physiologischen Umständen nicht nachweisbar. Im Geschehen der CNI korreliert die Häufigkeit der Myofibroblasten mit dem Fortschreiten der tubulointerstitiellen Fibrose (Chebotareva et al. 2006). Myofibroblasten könne auf drei Wegen in das renale Gewebe gelangen: Sie können als Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in das Interstitium der Niere einwandern, sie können sich aus lokalen Fibroblasten entwickeln, oder sie entwickeln sich aus Tubuluszellen durch den Einfluss bestimmter Cytokine, wie z.B. TGF- $\beta$  (Picard et al. 2008). Die für die Transformation notwendigen Cytokine stammen in erster Linie von aktivierten Makrophagen, welche zu den wichtigsten Produzenten des TGF- $\beta$  zählen. Auch andere inflammatorische Zellen, vaskuläre Zellen und sogar Fibroblasten selbst sind in der Lage diese Cytokine zu synthetisieren (Gabbiani et al. 1992, Ide et al. 2001).

Die Bestimmung der  $\alpha$ -SMA mRNA-Expression in dieser Arbeit zeigte eine signifikant höhere Expression von  $\alpha$ -SMA in der cGS-Gruppe, als sie im Vergleich zur den gesunden Kontrolltieren nachzuweisen war. Durch die Compound 21-Gabe konnte die  $\alpha$ -SMA mRNA-Expression signifikant vermindert werden. Dieses Ergebnis konnte durch die Bestimmung der  $\alpha$ -SMA Protein-Expression mittels Western Blot bestätigt werden, obwohl hier nur eine deutliche Tendenz ohne Signifikanz erkennbar ist. Zudem korreliert das Ergebnis mit den Untersuchungen der inflammatorischen Parameter, denn es sind in der cGS-Gruppe interstitiell wie glomerulär hoch signifikant mehr ED1- und CD3-positive Zellen vorhanden, als in der Kon-Gruppe und durch die Compound 21-Gabe konnte die Anzahl der

ED1- und CD3-positiven Zellen in beiden renalen Kompartimenten signifikant gesenkt werden. Somit sind im Interstitium, wie auch glomerulär weniger Makrophagen und Lymphozyten vorhanden, die dementsprechend weniger proinflammatorische und profibrotische Cytokine produzieren (siehe Ergebnisse des TGF- $\beta$ , des IL 6, des MCP-1 und des TNF- $\alpha$ ). Daraus resultierend wandern weniger Progenitorzellen aus dem Knochenmark in das renale Gewebe ein und es transformieren weniger Fibroblasten und Tubuluszellen zu Myofibroblasten. Diese Tatsache spiegelt sich in den untersuchten Parametern der Fibrose wieder, da die relative Fibronectinexpression und die relative Kol I-Expression, als Bestandteile der extrazellulären Matrix, signifikant in der Compound 21-behandelten Versuchsgruppe gesenkt wurden.

Fazit dieser Ergebnisse ist, dass eine gesteigerte Proliferation mit einer gesteigerten apoptotischen Aktivität einhergeht und dass Compound 21 bzw. die selektive Stimulation des AT2-Rezeptors antiproliferative Wirkungen vermittelt. Die Verminderung der proinflammatorischen Cytokine bewirkt eine deutliche Reduktion der Gewebsinfiltration durch Makrophagen/ Lymphozyten und daraus resultierend von Myofibroblasten und anderen beteiligten Zellen mit einer hohen proliferativen Aktivität. Daraus ergibt sich, dass die antiproliferativen Effekte nur zu einem geringen Anteil aus einer direkten AT2-Rezeptor Wirkung resultieren können, sondern, dass sie sich zum Großteil aus den antiinflammatorischen und antifibrotischen Effekten der AT2-Rezeptorstimulation ergeben. Wenzel et al. führte Untersuchungen an Ratten, die an einer mesangioproliferativen Glomerulonephritis litten durch. Hier konnte nachgewiesen werden, dass eine Behandlung der Tiere mit einem AT1-Rezeptor Blocker eine signifikante Verminderung der Anzahl PCNA-positiver Zellen im renalen Gewebe zur Folge hat. Im Gegenteil dazu rief die Behandlung dieser Tiere mit einem AT2-Rezeptorblocker keinerlei Effekte bezogen auf die Anzahl PCNA-positiven Zellen hervor (Wenzel et al. 2002).

Die Gesamtheit der Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die selektive Stimulation des AT2-Rezeptors durch die Gabe von Compound 21 im Tiermodell der Anti-Thy1-induzierten chronisch-progressiven Glomerulosklerose antifibrotische, antiinflammatorische und antiproliferative Effekte bedingt. Dadurch wird die Progression der Erkrankung erfolgreich verlangsamt, aber nicht vollständig gestoppt.

Einige der Ergebnisse zeigen eine große Differenz zwischen der unbehandelten Versuchsgruppe (cGS-Gruppe) und der behandelten Versuchsgruppe (cGS+C21-Gruppe) ohne jedoch eine statistische Signifikanz zu erreichen. Dies geschieht durch eine starke Streuung der Ergebnisse der Einzeltiere, wodurch sowohl die Standardabweichung als auch

der Standardfehler, welcher in den Diagrammen als „Fehlerbalken“ dargestellt wurde, zu groß wurden, so dass eine statistische Signifikanz nicht erreicht werden konnte. Die entsprechenden Ergebnisse sind Teil dieser Arbeit, da sie trotz fehlender Signifikanz eine Tendenz aufzeigen.

In der Zusammenfassung zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die selektive Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors durch die Gabe von Compound 21 im Tiermodell der Anti-Thy1-induzierten, chronisch-progressiven Glomerulosklerose die Progression der Erkrankung erfolgreich verlangsamt, wenn auch nicht vollständig verhindert. Die protektiven Wirkungen der AT<sub>2</sub>-Rezeptor Stimulation wurden durch antifibrotische, antiinflammatorische und antiproliferative Effekte vermittelt.

## 8 Zusammenfassung

### **Nephroprotektive Effekte des Angiotensin II Rezeptor Agonisten Compound 21 im Modell der Anti-Thy1-induzierten chronisch-progressiven Glomerulosklerose der Ratte. Daniel Brand**

Häufigste Ursache des terminalen Nierenversagens stellen chronisch-progressive Glomerulonephritiden dar, die durch einen progressiven Funktionsverlust bis hin zum totalen Versagen des Organs mit Ausprägung eines nephrotischen Syndroms gekennzeichnet sind. Histologisch lassen sich in derart betroffenen Nieren zur gleichen Zeit Merkmale der Fibrose, der Inflammation, und der Proliferation vorfinden.

Ziel dieser Arbeit war es, erstmals durch die selektive Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors mittels Compound 21 den progressiven Funktionsverlust im Tiermodell der Anti-Thy1-induzierten, chronisch-progressiven Glomerulosklerose der Ratte zu verhindern. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die AT<sub>2</sub>-Rezeptor Stimulation in vivo tatsächlich mit aktuell intensiv und kontrovers diskutierten antifibrotischen, antiinflammatorischen und antiproliferativen Effekten einhergeht. Im Tiermodell der Anti-Thy1-induzierten, chronisch-progressiven Glomerulosklerose wurde männliche Wistar-Ratten nach einer Uninephrektomie der monoklonale Antikörper mAb 1-22-3 intravenös appliziert. Dieser Antikörper ist spezifisch gegen Thy1-ähnliche Epitope der Mesangialzellen gerichtet und führt zu dessen Komplement-vermittelter Lyse. Dieser initiale Insult geht in einen auto-progressiven, renalen Schädigungsprozess über, die schließlich im totalen Versagen des Organs mündet. Da dieses Modell unabhängig von extrarenalen Reizen ist, eignet es sich besonders zur Untersuchung chronisch-progressiver Nierenerkrankungen, deren Krankheitsverlauf durch rein intrarenale Prozesse gesteuert wird. Es wurden 30 männliche Wistar-Ratten in folgender Gruppeneinteilung verwendet: Kon = gesunde zweinierige Tiere (n=6); cGS = cGS, Uni nx, keine Therapie (n=12); cGS+C21 = cGS, Uni nx, Compound 21 Behandlung (n=12).

Zwanzig Wochen nach Induktion der cGS wurde den Tieren Blut, Urin und die verbliebene Niere nach Perfusion entnommen, um darin repräsentative Parameter der Nierenfunktion, Fibrose, Inflammation und Proliferation zu bestimmen. Dazu gehört die Proteinurie, der syst. Blutdruck, die Plasma- und Urinkreatinin- und -harnstoffwerte und die glomeruläre Filtrationsrate. Des Weiteren wurde histologisch der Matrixscore, die Kol I-Expression, die Infiltration durch Makrophagen und Lymphozyten, der Anteil proliferierender Zellen und apoptotischer Zellen jeweils im glomerulären und tubulointerstitiellen Kompartiment bestimmt. Zusätzlich wurde die renale Expression von TGF- $\beta$ 1, Fibronectin, Kol I und  $\alpha$ -

SMA auf mRNA- und Proteinebene und die renale Expression von PAI-1, TIMP-1, MCP-1, IL 6, TNF- $\alpha$  und des AT2-Rezeptors auf mRNA-Ebene untersucht.

Die Resultate der aufgeführten Untersuchungen zeigen zusammenfassend, dass Compound 21 als Agonist des AT2-Rezeptors in einer Langzeittherapie effektiv die Progression der cGS verlangsamt und dabei sowohl antifibrotische und antiinflammatorische, als auch antiproliferative Effekte vermittelt. Im Einzelnen führte die Behandlung der chronischen Glomerulosklerose mit Compound 21 zu einer erheblichen Verminderung der Fibroseparameter, sowohl auf histologischer Ebene: glomerulärer (-27% ( $p < 0,01$ )), tubulointerstitieller (-61% ( $p < 0,01$ )) Matrixscore, glomeruläre (-39% ( $p < 0,05$ )) und tubulointerstitielle (-40% ( $p < 0,05$ )) Kol I Deposition; auf Ebene der mRNA-Expression: TGF- $\beta$  -39%, Fibronectin -42% ( $p < 0,05$ ), Kol I -37% ( $p < 0,05$ ), PAI-1 -49% ( $p < 0,01$ ) und TIMP-1 -58%; als auch auf Ebene der Protein-Expression: TGF- $\beta$  -77%, Fibronectin -21% und Kol I -36%. Zudem kommt es durch die selektive Stimulation des AT2-Rezeptors zu einer deutlichen Reduktion der inflammatorischen Parameter auf den unterschiedlichen Untersuchungsebenen: Histologie: Anteil CD3-positiver Zellen glomerulär -55% ( $p < 0,05$ ), tubulointerstitiell -77% ( $p < 0,001$ ) und Anteil ED1-positiver Zellen glomerulär -58% ( $p < 0,01$ ) und tubulointerstitiell -50% ( $p < 0,01$ ); mRNA-Expression: IL6 -48% ( $p < 0,05$ ), TNF- $\alpha$  -35% ( $p < 0,05$ ) und MCP-1 -59% ( $p < 0,05$ ). Zudem wird die proliferative und apoptotische Aktivität der renalen Zellen durch die Compound 21 Behandlungen der Versuchstiere stark vermindert (Anteil PCNA-positiver Zellen glomerulär -61% ( $p < 0,01$ ), tubulointerstitielle -69% ( $p < 0,001$ ), Anteil TUNEL-positiver Zellen glomerulär -55% ( $p < 0,01$ ) und tubulointerstitielle -39% ( $p < 0,05$ ),  $\alpha$ -SMA mRNA-Expression -45% ( $p < 0,05$ ) und  $\alpha$ -SMA Protein-Expression -30%). Die Gesamtheit dieser Ergebnisse führen zu einer verzögerten Progression der Erkrankung und dementsprechend weisen die Tiere eine verbesserte renale Funktion auf: Blutdruck -8% ( $p < 0,05$ ), Proteinurie -21%, Kreatininkonzentration im Serum -39% ( $p < 0,05$ ), Harnstoffkonzentration im Serum -34% und GFR +42% ( $p < 0,05$ ).

Nebenwirkungen des Compound 21 konnten an den behandelten Tieren der cGS+C21 Gruppe über den gesamten Verlauf des Versuches nicht nachgewiesen werden, trotz der täglichen Kontrollen des Allgemeinbefindens der Tiere und den regelmäßigen Messungen des Körpergewichtes, des Blutdruckes und der Urinanalyse. Durch die orale Applikation konnten keine Affektionen des Gastrointestinaltraktes in Form von Inappetenz, Erbrechen oder veränderter Kotkonsistenz beobachtet werden.

In der Zusammenschau aller Ergebnisse liefert diese Arbeit einen Beitrag zum Verständnis und der pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten bei chronisch-progressiven Nierenerkrankungen in der Veterinärmedizin und eventuell in der Humanmedizin durch ihren Modellcharakter. Die tierexperimentell ermittelten Ergebnisse lassen zudem vermuten, dass eine Therapie chronisch-progressiver Nierenerkrankungen mit Compound 21, als einem Agonisten des AT<sub>2</sub>-Rezeptors, auch im humanmedizinischen Bereich zu vergleichbaren positiven Effekten führt und so die Progression der Erkrankung verlangsamt wird. Zukünftige Arbeiten sollten sich mit der Kombination dieses Wirkstoffes mit den heute etablierten Wirkstoffen und Therapiekonzepten der chronisch-progressiven Nierenerkrankungen auseinandersetzen, um diese weiter zu optimieren und um gegebenen Falls neue Therapiekonzepte zu entwickeln.

## 9 Summary

### **Nephroprotective effects of the angiotensin II type2-receptor agonist Compound 21 in the animal model of the anti -thy1-induced, chronic-progressive glomerulosclerosis of the rat by Daniel Brand**

Chronic-progressive glomerular disease represents one of the most common causes of end-stage renal failure worldwide. The disease course is generally characterized by a progressive loss of renal function up to terminal organ failure and often of nephrotic proteinuria. In affected kidneys, histology is characterised typically by fibrosis, inflammation and proliferation.

This study was designed to explore the preventive potential of selective AT<sub>2</sub>-receptor stimulation by Compound 21 on the progressive loss of function in the animal model of the anti-thy1-induced, chronic-progressive glomerulosclerosis of the rat. Furthermore it was analyzed, whether beneficial actions of AT<sub>2</sub>-receptor stimulation is associated with the antifibrotic, anti-inflammatory and antiproliferative effects, all of which are under controversial discussion. The animal model of the anti-thy1-induced, chronic-progressive glomerulosclerosis is based on male Wistar-rats, which undergo uninephrectomy and subsequent intravenous injection of mAb 1-22-3 antibody. This antibody is specifically directed against thy1-like epitopes of mesangial cells and leads to a complement-dependent cell lysis. In the course of the disease, this initial iatrogenic insult develops into an auto-progressive process of renal damage that ends in terminal uremia. This animal model is independent from extrarenal injurious stimuli and so it is especially suitable for investigations of chronic–progressive kidney diseases, which course is primarily controlled by intrarenal processes. Thirty male Wistar-rats were arranged in three experimental groups: con = normal control animals (n=6); cGS = animals with uninephrectomy and injection of mAb 1-22-3 antibody, but without Compound 21 treatment (n=12); cGS+C21 = animals with uninephrectomy, antibody injection and Compound 21 treatment (n=12).

Twenty weeks after the induction of the cGS, blood, urine and the remaining kidney were collected from the rats in order to measure representative parameters of renal function, fibrosis, inflammation and proliferation. The representative parameters of renal function were proteinuria, systolic blood pressure, plasma concentration of urea and creatinine and glomerular filtration rate. Furthermore, analysis involved histological matrix score, deposition of collagen I, renal infiltration by macrophages and lymphocytes and number of proliferative and apoptotic renal cells. In addition to these parameters, renal expression of TGF- $\beta$ 1,

fibronectin, col I and  $\alpha$ -SMA were measured on level of mRNA and proteins. Expression of PAI-1, TIMP-1, MCP-1, IL6, TNF- $\alpha$  and the AT2-receptor was determined at the level of mRNA-expression.

In summary, the results of this investigation show that treatment with Compound 21 as a selective agonist of the AT2-receptor leads to an effective slow down of progression in rats with cGS. Thereby, protective actions of Compound 21 involved antifibrotic, anti-inflammatory and antiproliferative effects.

In particular, treatment of cGS with Compound 21 led to a significant decrease of fibrotic parameters. At histological level: glomerular (-27% ( $p < 0.01$ )), tubulointerstitial (-61% ( $p < 0.001$ )) matrix score; glomerular (-39% ( $p < 0.005$ )), tubulointerstitial (-40% ( $p < 0.005$ )) col I deposition. At the level of mRNA-expression: TGF- $\beta$ 1 -39%, fibronectin -42% ( $p < 0.005$ ), col I -37% ( $p < 0.005$ ), PAI-1 -49% ( $p < 0.01$ ) and TIMP-1 -58%. And at the level of protein-expression: TGF- $\beta$ 1 -77%, fibronectin -21% and col I -36%. Selective stimulation of the AT2-receptor led to a decreases of the inflammatory parameters at the different investigation levels, too: histology: glomerular (-55% ( $p < 0.05$ )), tubulointerstitial (-77% ( $p < 0.001$ )) number of CD3-positive cells and glomerular (-58% ( $p < 0.01$ )), tubulointerstitial (-50% ( $p < 0.01$ )) number of ED1-positive cells; mRNA-Expression: IL6 -48% ( $p < 0.05$ ), TNF- $\alpha$  -35% ( $p < 0.05$ ) and MCP-1 -59% ( $p < 0.05$ ). Furthermore the proliferative and apoptotic activity of renal cells was significantly reduced by Compound 21 treatment at the different levels: histology: glomerular (-61% ( $p < 0.01$ )), tubulointerstitial (-69% ( $p < 0.001$ )) number of PCNA- positive cells and glomerular (-55% ( $p < 0.01$ )), tubulointerstitial (-39% ( $p < 0.05$ )) number of TUNEL-positive cells. mRNA-expression:  $\alpha$ -SMA -45% ( $p < 0.05$ ). Protein-expression:  $\alpha$ -SMA -30%. Via these pathways, AT2-receptor stimulation led to a substantial decrease of diseases progression and accordingly the animals showed improved renal function: plasma concentration of creatinine -39% ( $p < 0.05$ ) and urea -34% and glomerular filtration rate -42% ( $p < 0.05$ ). Systolic blood pressure was decreased by -8% ( $p < 0.05$ ) and proteinuria by -21%, respectively.

The results of this work provide an important contribution in the understanding in the progression of glomerular renal disease in veterinary medicine. Furthermore, they establish AT2 receptor stimulation as novel and effective treatment opportunity. These findings suggest that that AT2-receptor stimulation may be beneficial in human chronic-progressive glomerular disease as well. In future investigations the combination of Compound 21 with the

established agents and therapy concepts of the chronic-progressive kidney diseases should be examined in order to optimize those and potentially even to develop new ones.

## 10 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Die Abbildung zeigt zwei Perjodsäure Schiffsreagenz (PAS) gefärbte Gewebsschnitte.....	20
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung der Reaktionskaskade des RAS.....	23
<b>Abbildung 3:</b> Die Abbildung zeigt die molekulare Struktur des Angiotensin II. ....	24
<b>Abbildung 4:</b> G-Protein-gekoppelter Angiotensin II Typ2-Rezeptor.....	27
<b>Abbildung 5:</b> Molekulare Struktur des Compound 21.....	29
<b>Abbildung 6:</b> Formel zur Berechnung des Proteingehaltes des Urins aus der gemessenen Extinktion der Proben. ....	37
<b>Abbildung 7:</b> Formel zur Berechnung des glomerulären Volumens aus der glomerulären Fläche.....	43
<b>Abbildung 8:</b> Formeln zur Berechnung der relativen mRNS-Expression. ....	48
<b>Abbildung 9:</b> Reaktionsgleichung der BCA-Methode.....	49
<b>Abbildung 10:</b> Mittleres Körpergewicht der Versuchsgruppen.....	56
<b>Abbildung 11:</b> Mittlerer, plethysmographisch gemessener, systolischer Blutdruck ....	58
<b>Abbildung 12:</b> Die Abbildung zeigt die durchschnittliche über den Urin ausgeschiedene Proteinmenge.....	59
<b>Abbildung 13:</b> Mittlere Kreatininkonzentration im Serum.....	60
<b>Abbildung 14:</b> Mittlere Harnstoffkonzentration im Serum .....	61
<b>Abbildung 15:</b> Durchschnittliche glomeruläre Filtrationsrate .....	62
<b>Abbildung 16:</b> Darstellung des absoluten und auf die Tibialänge bezogenen Gewichtes der Niere .....	63
<b>Abbildung 17:</b> Mittlere glomeruläre Fläche (a) und mittleres glomeruläres Volumen .63	
<b>Abbildung 18:</b> Glomerulärer Matrixscore (a) an Carnoy-fixierten, PAS-gefärbten Gewebsschnitten.....	66
<b>Abbildung 20:</b> Mittlerer, glomerulärer Kollagen I-Gehalt .....	67
<b>Abbildung 21:</b> Repräsentative Aufnahmen immunhistologischer Färbungen von Kollagen I.....	68
<b>Abbildung 22:</b> Mittlere relative mRNS-Expression von TGF-β1.....	69
<b>Abbildung 23:</b> Graphische Darstellung der mittleren relativen Fibronectin mRNS-Expression in Bezug auf die GAPDH .....	70
<b>Abbildung 24:</b> Ergebnisse der Untersuchung der Versuchsproben auf deren mittlere relative Kollagen I mRNS-Expression.....	72
<b>Abbildung 26:</b> Mittlere, relative TIMP-1 mRNS-Expression.....	73

---

<b>Abbildung 27:</b> Graphische Darstellung des Ergebnisses des TGF- $\beta$ 1-Western Blots...	74
<b>Abbildung 28:</b> Darstellung der relativen Fibronektin Protein-Expression .....	75
<b>Abbildung 29:</b> Kollagen I-Protein-Expression der drei Versuchsgruppen .....	76
<b>Abbildung 30:</b> Mittlere Anzahl der CD3-positiven Zellen pro Glomerulum (a), eingeteilt in die einzelnen Versuchsgruppen.....	77
<b>Abbildung 31:</b> Durchschnittliche Infiltration der Glomeruli (a) und des Kortex (b) mit ED1-positiven Zellen .....	78
<b>Abbildung 32:</b> Immunhistologische Aufnahmen ED1-positiver Zellen.....	79
<b>Abbildung 33:</b> Relative IL 6 mRNS-Expression vs. GAPDH.....	80
<b>Abbildung 34:</b> Differenz der relativen TNF- $\alpha$ mRNS-Expression.....	81
<b>Abbildung 35:</b> Relative MCP-1 mRNS-Expression in drei Versuchsgruppen.....	82
<b>Abbildung 36:</b> Mittlerer glomerulärer und kortikaler Gehalt an PCNA-positiven Zellen der immunhistochemisch-angefärbten Gewebsschnitte.....	83
<b>Abbildung 37:</b> Aufnahmen histologischer Schnitte bei 400-facher Vergrößerung, in denen PCNA-positive Zellen immunhistochemisch-markiert wurden. .	84
<b>Abbildung 38:</b> Anzahl TUNEL-positiver Zellen. ....	85
<b>Abbildung 39:</b> Histologische Aufnahmen eines TUNEL-Assays .....	86
<b>Abbildung 40:</b> Mittlere relative $\alpha$ -SMA mRNS-Expression der .....	87
<b>Abbildung 41:</b> Graphische Darstellung der relativen $\alpha$ -SMA Protein-Expression.....	88
<b>Abbildung 42:</b> Relative AT2-Rezeptor mRNS-Expression.....	89

## 11 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Prävalenz der chronischen Niereninsuffizienz bei Hunden und Katzen in verschiedenen Alterssegmenten.....	12
<b>Tabelle 2:</b> Kraft und Dürr 1996 Stadien der chronischen Niereninsuffizienz.....	13
<b>Tabelle 3:</b> Liste der Inhaltsstoffe und Zusatzstoffe des Zuchtfutters für Ratten von Altromin (#1314).....	31
<b>Tabelle 4:</b> Einteilung der Versuchstiere in die unterschiedlichen Versuchsgruppen mit Angabe der an ihnen durchgeführten Eingriffe. ....	33
<b>Tabelle 5:</b> Für die PAS Färbung verwendete Reagenzien.....	39
<b>Tabelle 6:</b> Skala zur Erteilung des Matrixscores nach prozentuaem Gehalt an Matrixproteinen der Schnitte.....	39
<b>Tabelle 7:</b> Diese Tabelle gibt die einzelnen Komponenten der Stammlösungen an, die für die die immunhistochemischen Färbungen verwendet wurden.....	40
<b>Tabelle 8:</b> Für die immunhistochemischen Färbungen verwendete Primärantikörper...	41
<b>Tabelle 9:</b> Für die immunhistochemischen Färbungen verwendete Sekundärantik.....	41
<b>Tabelle 10:</b> Für die reverse Transskription verwendete Bestandteile des Mastermix....	45
<b>Tabelle 11:</b> Bestandteile des Mastermix, der für die RT-PCR angesetzt .....	46
<b>Tabelle 12:</b> Aufführung der einzelnen bei der RT-PCR ablaufenden Schritte.....	47
<b>Tabelle 13:</b> Bei der RT-PCR verwendete Primer mit .....	48
<b>Tabelle 14:</b> Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung der einzelnen Stufen des Standards bei der BCA-Messung an. ....	50
<b>Tabelle 15:</b> Für den Western Blot verwendete Lösungen. ....	52
<b>Tabelle 16:</b> Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele, die bei der Western Blot-Technik Verwendung finden.....	53
<b>Tabelle 17:</b> Für den Western Blot verwendete Primärantikörper.....	54
<b>Tabelle 18:</b> Für den Western Blot verwendete Sekundärantikörper. ....	54

## 12 Literaturverzeichnis

- 1 Amiel G.E., Atala A. (1999) Current and future modalities for functional renal replacement. *Urol Clin North Am* 26(1):235-246
- 2 Annes J.P., Munger J.S., Rifkin D.B. (2003) Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.* 2003 Jan 15;116(Pt 2):217-224
- 3 Benigni A., Cassis P., Remuzzi G. (2010) Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med.*;2(7) :247-57
- 4 Benndorf RA., Krebs C., Hirsch-Hoffmann B., Schwedhelm E., Cieslar G., Schmidt-Haupt R., Steinmetz OM., Meyer-Schwesinger C., Thaiss F., Haddad M., Fehr S., Heilmann A., Helmchen U., Hein L., Ehmke H., Stahl RA., Boger RH., Wenzel UO. (2009) Angiotensin II type 2 receptor deficiency aggravates renal injury and reduces survival in chronic kidney disease in mice. *Kidney Int.*;75(10):1039-49
- 5 Berg M.J., Tymoczko JL., Stryer L., Häcker B., Held A., Lange C., Mahlke K., Maxam G., Seidler L., Zellerhoff N. (2003) *Biochemie*. Heidelberg - Berlin, Spektrum akademischer Verlag GmbH
- 6 Bischoff SC., Krieger M., Brunner T., Dahinden CA. (1992) Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J Exp Med* 1;175(5):1271-5
- 7 Blum S., Hug F., Hänsch GM., Wagner C. (2005) Fibronectin on activated T lymphocytes is bound to gangliosides and is present in detergent insoluble microdomains. *Immunol Cell Biol.*; 83(2):167-174.
- 8 Blume A., Kaschina E., Unger T. (2001) Angiotensin II type 2 receptors: signalling and pathophysiological role. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*;10(2):239-46. Review.
- 9 Boulay G., Servant G., Luong TT., Escher E., Guillemette G. (1992) Modulation of angiotensin II binding affinity by allosteric interaction of polyvinyl sulfate with an intracellular domain of the DuP-753-sensitive angiotensin II receptor of bovine adrenal glomerulosa. *Mol Pharmacol.*; 41(4):809-15.

- 10 Branton MH., Kopp JB. (1999) TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect.* 1999 Dec;1(15):1349-65
- 11 Brown SA., Navar LG. (1990) Single-nephron responses to systemic administration of amino acids in dogs. *Am J Physiol* 259:F739-746
- 12 Burrell ML., Johnston CL., Tikellis C., Cooper ME. (2004) ACE2, a new regulator of the renin–angiotensin system. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15:166-9
- 13 Burns KD., Homma T., Harris RC. (1993) The intrarenal renin-angiotensin system. *Semin Nephrol* 13:13-30
- 14 Cagigi A., Nilsson A., Levitsky V., Sabri F. (2010) Cytotoxic T-lymphocytes secrete soluble factors that induce caspase-mediated apoptosis in glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol* 225:34-42
- 15 Castro-Chaves P., Leite-Moreira AF. (2004) Renin-angiotensin system and its role in cardiovascular physiopathology and therapy. *Rev Port Cardiol* 23 Suppl 2:II61-77
- 16 Chebotareva NV., Bobkova IN., Varshavskii VA., Golitsyna EP., Kozlovskaja LV. (2006) The role of smooth muscle alpha-actin in development of renal fibrosis in patients with chronic glomerulonephritis. *Ter Arkh* 78:17-21
- 17 Chung O., Unger T. (2006) Das Renin-Angiotensin-System. *European Journal of Clinical Research*, ISSN 0947-8736
- 18 Clahsen T. (2009) Chemokinaktivität induziert durch Interleukin-6, Dissertation urn:nbn:de:hbz:82-opus-27980
- 19 Clahsen T., Schaper F. (2008) Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration. *J Leukoc Biol* 84:1521-1529
- 20 Dahme E., Weiß E. (1999) Glomerulonephritis, *Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. Stuttgart, Enke Verlag, 258

- 21 Danser AH., van Kats JP., Admiraal PJ., Derkx FH., Lamers JM., Verdouw PD., Saxena PR., Schalekamp MA. (1994) Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension* 24:37-48
- 22 Davis JO. (1971) What Signals the Kidney to Release Renin? *Circ Res* 28:301-6
- 23 de Gasparo M., Catt KJ., Inagami T., Wright JW., Unger T. (2000) International union of Pharmacology, XXIII The angiotensinII receptors. *Pharmacol Rev* 52:415-72
- 24 Deshmane SL., Kremlev S., Amini S., Sawaya BE. (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 29:313-326
- 25 Dinh DT., Frauman AG., Johnston CL., Fabiani ME. (2001) Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)* 100:481-492
- 26 Duffield JS (2003) The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond)* 104:27-38
- 27 Engvall E., Ruoslahti E. (1977) Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int J Cancer* 20:1-5
- 28 Esteban V., Lorenzo O., Ruperez M., Suzuki Y., Mezzano S., Blanco J., Kretzler M., Sugaya T., Egido J., Ruiz-Ortega M. (2004) Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 15:1514-1529
- 29 Farr LE., Smadel JE. (1939) The Effect of Dietary Protein on the Course of Nephrotoxic Nephritis in Rats. *J Exp Med* 70:615-627
- 30 Fassina G., Ferrari N., Brigati C., Benelli R., Santi L., Noonan D.M., Albin A. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteases: Regulation and biological activities. *Clinical & Experimental Metastasis* 18:111-20
- 31 Feldmann K. (2003) Signaltransduktion von Transforming-Growth-Factor-beta in Zytotoxischen T-Zellen , Dissertaion

- 32 Figari IS., Mori NA., Palladino MA. Jr. (1987): Regulation of neutrophil migration and superoxide production by recombinant tumor necrosis factors-alpha and -beta: comparison to recombinant interferon-gamma and interleukin-1 alpha. *Blood* 70:979-984
- 33 Flanders KC. (2004) Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 85:47-64
- 34 Floege J., Burns MW., Alpers CE., Yoshimura A., Pritzl P., Gordon K., Seifert RA., Bowen-Pope DF., Couser WG., Johnson RJ. (1992) Glomerular cell proliferation and PDGF expression precede glomerulosclerosis in the remnant kidney model. *Kidney Int* 41:297-309
- 35 Forst S. (2009): *TGF-beta1 induzierte Deposition extrazellulärer Matrixproteine im Tiermodell transgener eNOS+/- Mäuse*, Giessen : VVB Laufersweiler 2009, Dissertation, urn:nbn:de:hebis:26-opus-71901
- 36 Frank AE., Wingo CS., Weiner ID. (2000) Effects of ammonia on bicarbonate transport in the cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F219-226
- 37 Fraser D., Wakefield L., Phillips A. (2002) Independent regulation of transforming growth factor-beta1 transcription and translation by glucose and platelet-derived growth factor. *Am J Pathol* 161:1039-1049
- 38 Frei U., Schober-Halstenberg HJ. (2008) Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland. 2006/07, QuaSi-Niere gGmbH iL
- 39 Gabbiani G. (1992) The biology of the myofibroblast. *Kidney Int* 41:530-532
- 40 Ganten D., Ruckpaul K., Köhrle J. (2006) *Molekulare Medizin - Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autonomen Regulationsstörungen*, Springer Verlag Berlin Heidelberg

- 41 Gasc JM., Shanmugam S., Sibony M., Corvol P. (1994) Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. *Hypertension* 24:531-537
- 42 Gether U., Kobilka BK. (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 273:17979-17982
- 43 Gomez DE., Alonso DF., Yoshiji H., Thorgeirsson UP. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74:111-122
- 44 Griffiths GM., Mueller C. (1991) Expression of perforin and granzymes in vivo: potential diagnostic markers for activated cytotoxic cells. *Immunol Today* 12:415-419
- 45 Heinrich PC., Castell JV., Andus T. (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265:621-636
- 46 Hitomi J., Christofferson DE., Ng A., Yao J., Degterev A., Xavier RJ., Yuan J. (2008) Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 135:1311-1323
- 47 Hocevar BA., Brown TL., Howe PH. (1999) TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *Embo J* 18:1345-1356
- 48 Huang XR., Tipping PG., Apostolopoulos J., Oettinger C., D'Souza M., Milton G., Holdsworth SR. (1997) Mechanisms of T cell-induced glomerular injury in anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis in rats. *Clin Exp Immunol* 109:134-142
- 49 Ide M., Yamate J., Kuwamura M., Kotani T., Sakuma S., Takeya M. (2001) Immunohistochemical analysis of macrophages and myofibroblasts appearing in hepatic and renal fibrosis of dogs. *J Comp Pathol* 124:60-69

- 50 Jacob F., Polzin DJ., Osborne Ca., Allen Ta., Kirk CA., Neaton JD., Lekcharoensuk C., Swanson LL. (2002) Clinical evaluation of dietary modification for treatment of spontaneous chronic renal failure in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 220:1163-1170
- 51 Joag S., Zychlinsky A., Young JD. (1989) Mechanisms of lymphocyte-mediated lysis. *J Cell Biochem* 39:239-252
- 52 Johansson S., Svineng G., Wennerberg K., Armulik A., Lohikangas L. (1997) Fibronectin-integrin interactions. *Front Biosci* 2:d126-146
- 53 Jöhren O., Dendorfer A., Dominiak P. (2004) Cardiovascular and renal function of angiotensin II type-2 receptors. *Cardiovasc Res* 62:460-467
- 54 Karkar A. (2008) Modulation of renal inflammation: therapeutic strategies. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 19:1-19
- 55 Kaschina E., Grzesiak A., Li J., Foryst-Ludwig A., Timm M., Rompe F., Sommerfeld M., Kemnitz UR., Curato C., Namsolleck P., Tschöpe C., Hallberg A., Alterman M., Hucko T., Paetsch I., Dietrich T., Schnackenburg B., Graf K., Dahlof B., Kintscher U., Unger T., Steckelings UM. (2008) Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation* 118:2523-2532
- 56 Kim S. (1997) [Role of the renin-angiotensin system in cardiovascular and renal diseases]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 109:223-233
- 57 Kim S., Iwao H. (2000) Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 52:11-34
- 58 Komatsu K., Frohlich ED., Ono H., Ono Y., Numabe A., Willis GW. (1995) Glomerular dynamics and morphology of aged spontaneously hypertensive rats. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension* 25:207-213
- 59 Kraft W., Dürr UM., Hartmann K. (2003) *Krankheiten der Harnorgane, Katzenkrankheiten*. Hannover, Verlag M&H. Schaper Alfeld-Hannover, 857 ff

- 60 Krahenbuhl O., Tschopp J. (1991) Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Perforin-induced pore formation. *Immunol Today* 12:399-402; discussion 403
- 61 Krämer S. (2007) Mykophenolat Mofetil verlangsamt die Progression von chronischer Anti-Thy1-induzierter renaler Fibrose, ist aber nicht additiv zu einer hohen Dosis Enalapril, Dissertation, FU-Berlin, FB Veterinärmedizin, urn:nbn:de:kobv:188-fudissthesis-000000003114-9
- 62 Krämer S., Binder E., Loof T., Wang-Rosenke Y., Martini S., Kahdzhynov D., Budde K., Neumayer HH., Peters H. (2009): The lymphocyte migration inhibitor FTY720 attenuates experimental hypertensive nephropathy. *Am J Physiol.*; 297(1):F218-27
- 63 Krämer S., Kron S., Wang-Rosenke Y., Loof T., Kadzhynov D., Margera S., Kawachi H., Shimizu F., Martini S., Neumayer HH., Peters H. (2008): Rosuvastatin in additive to high-dose candesartan in slowing progression of experimental mesangioproliferative glomerulosclerosis. *Am J Physiol Renal Physiol.*; 294(4):F801-11
- 64 Lan HY., Paterson DJ., Atkins RC. (1991) Initiation and evolution of interstitial leukocytic infiltration in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 40:425-433
- 65 Lee VW., Wang YM., Wang YP., Zheng D., Polhill T., Cao Q., Wu H., Alexander IE., Alexander SI., Harris DC. (2008) Regulatory immune cells in kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 295:F335-342
- 66 Lentz KE., Skeggs LT., Dorer FE., Kahn JR., Levine M. (1976) The biochemistry of the renin-angiotensin system and its role in hypertension *The American Journal of Medicine* 60:737-48
- 67 Li MO., Wan YY., Sanjabi S., Robertson AK., Flavell RA: (2006) Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24:99-146
- 68 Löffler G., Petrides PE., Heinrich PC. (2007) *Biochemie und Pathobiochemie* , Springer Medizin Verlag Heidelberg, 893 ff

- 69 Lopez-Armada MJ., Gomez-Guerrero C., Egido J. (1996) Receptors for immune complexes activate gene expression and synthesis of matrix proteins in cultured rat and human mesangial cells: role of TGF-beta. *J Immunol* 157:2136-2142
- 70 Loskutoff DJ., Linders M., Keijer J., Veerman H., van Heerikhuizen H., Pannekoek H. (1987) Structure of the human plasminogen activator inhibitor 1 gene: nonrandom distribution of introns. *Biochemistry* 26:3763-3768
- 71 Lottspeich F., Engels JW., Zettelmeier Lay S. (1998) *Bioanalytik*. Heidelberg, Berlin, Spektrum akademischer Verlag GmbH
- 72 Lyons RM., Keski-Oja J., Moses HL. (1988) Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* 106:1659-1665
- 73 Makino H. (1992) [Glomerular extracellular matrix in glomerulosclerosis by molecular biology]. *Nippon Rinsho* 50:3038-3045
- 74 Martini S. (2006) Material und Methoden, Effekte des Lymphozytenmodulators FTY720 auf den Verlauf der akuten und chronischen Anti-Thy1-induzierten renalen Matrixexpansion. Dissertation, urn:nbn:de:kobv:fudissthesis000000002042-3
- 75 McCarty OJ., Zhao Y., Andrew N., Machesky LM., Staunton D., Frampton J., Watson SP. (2004) Evaluation of the role of platelet integrins in fibronectin-dependent spreading and adhesion. *J Thromb Haemost* 2:1823-1833
- 76 Mencoboni M., Lerza R., Bogliolo G. (1992) [Tumor necrosis factor: a cytokine with multiple actions]. *Recenti Prog Med* 83:15-17
- 77 Meyer TW., Rennke HG. (1988) Progressive glomerular injury after limited renal infarction in the rat. *Am J Physiol* 254:F856-862
- 78 Mezzano SA., Ruiz-Ortega M., Egido J. (2001) Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 38:635-638

- 79 Mifune M., Sasamura H., Shimizu-Hirota R., Miyazaki H., Saruta T. (2000) Angiotensin II type 2 receptors stimulate collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 36:845-850
- 80 Minkus G., Breuer W., Wanke R., Reusch C., Leuterer G., Brem G., Hermanns W. (1994) Familial nephropathy in Bernese mountain dogs. *Vet Pathol* 31:421-428
- 81 Moses HL., Yang EY., Pietsenpol JA: (1990) TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* 63:245-247
- 82 Mosher DF., Sottile J., Wu C., McDonald JA. (1992) Assembly of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 4:810-818
- 83 Naito T., Ma LJ., Yang H., Zuo Y., Tang Y., Han JY., Kon V., Fogo AB. (2009) Angiotensin type 2 receptor actions contribute to angiotensin type 1 receptor blocker effects on kidney fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 298:F683-691
- 84 [ncbi.nlm.nih.gov/nuccore](http://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore)
- 85 O'Donnell MP. (2000) Renal tubulointerstitial fibrosis. New thoughts on its development and progression. *Postgrad Med* 108:159-162, 165, 171-152
- 86 Oberbauer R., Haas M., Mayer G. (1996) Proteinuria as a consequence of altered glomerular permselectivity--clinical implications. *Clin Nephrol* 46:357-361
- 87 Okuda S. (1992) [Role of TGF-beta in glomerular diseases]. *Nippon Rinsho* 50:3032-3037
- 88 Pabst R., Sterzel RB., (1983) Cell renewal of glomerular cell types in normal rats. An autoradiographic analysis. *Kidney Int* 24:626-631
- 89 Paunesku T., Mittal S., Protic M., Oryhon J., Korolev SV., Joachimiak A., Woloschak GE., (2001) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol* 77:1007-1021

- 90 Pavenstadt H. (2000) Roles of the podocyte in glomerular function. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F173-179
- 91 Pesce CM., Striker LJ., Peten E., Elliot SJ., Striker GE. (1991) Glomerulosclerosis at both early and late stages is associated with increased cell turnover in mice transgenic for growth hormone. *Lab Invest* 65:601-605
- 92 Peters H. (2000) Wirkungen der L-Arginingabe bei immunvermittelter akuter und chronischer Glomerulofibrose. Habilitationsschrift: Medizinische Fakultät, Humboldt Univ., Berlin
- 93 Peters H., Martini S., Wang Y., Shimizu F., Kawachi H., Kramer S., Neumayer HH. (2004) Selective lymphocyte inhibition by FTY720 slows the progressive course of chronic anti-thy 1 glomerulosclerosis. *Kidney Int* 66:1434-1443
- 94 Picard N., Baum O., Vogetseder A., Kaissling B., Le Hir M. (2008) Origin of renal myofibroblasts in the model of unilateral ureter obstruction in the rat. *Histochem Cell Biol* 130:141-155
- 95 Pichler R., Huber K. (1998) Das Renin-Angiotensin-System und dessen pharmakologische Beeinflussung durch Angiotensin II Rezeptorblocker bei kardiovaskulären und renalen Erkrankungen. *Journal of Cardiology*, 5:515-529
- 96 Pihusch M., Pihusch V., Holler E., (2005) Plasminogen activator inhibitor-1: a review. *Lab Med*, 29:403-411
- 97 Pfaffl MW. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res*, 29:e45
- 98 Potts JR., Campbell ID. (1994) Fibronectin structure and assembly. *Curr Opin Cell Biol* 6:648-655
- 99 [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6514](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6514)

- 100 Remuzzi A., Puntorieri S., Battaglia C., Bertani T., Remuzzi G. (1990) Angiotensin converting enzyme inhibition ameliorates glomerular filtration of macromolecules and water and lessens glomerular injury in the rat. *J Clin Invest* 85:541-549
- 101 Remuzzi A., Puntorieri S., Mazzoleni A., Remuzzi G. (1988) Sex related differences in glomerular ultrafiltration and proteinuria in Munich-Wistar rats. *Kidney Int* 34:481-486
- 102 Remuzzi G., Bertani T. (1998) Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 339:1448-1456
- 103 Reusch C., Hoerauf A., Lechner J., Kirsch M., Leuterer G., Minkus G., Brem G. (1994) A new familial glomerulonephropathy in Bernese mountain dogs. *Vet Rec* 134:411-415
- 104 Roudebush P., Hand MS., Thatcher CD., Remillard RL., Lewis LD: (2000) *Small Animal Clinical Nutrition*, Mark Morris Institute
- 105 Rompe F., Artuc M., Hallberg A., Alterman M., Stroder K., Thone-Reineke C., Reichenbach A., Schacherl J., Dahlof B., Bader M., Alenina N., Schwaninger M., Zuberbier T., Funke-Kaiser H., Schmidt C., Schunck WH., Unger T., Steckelings UM. (2010) Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension* 55:924-931
- 106 Ruiz-Ortega M., Egido J. (1997) Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 52:1497-1510
- 107 Ruiz-Ortega M., Esteban V., Suzuki Y., Ruperez M., Mezzano S., Ardiles L., Justo P., Ortiz A., Egido J. (2003) Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney Int Suppl*:S21-26
- 108 Ruster C., Wolf G. (2006) Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 17:2985-2991

- 109 Schocklmann HO., Lang S., Sterzel RB. (1999) Regulation of mesangial cell proliferation. *Kidney Int* 56:1199-1207
- 110 Shankland SJ. (2006) The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 69:2131-2147
- 111 Shankland SJ., Pippin J., Flanagan M., Coats SR., Nangaku M., Gordon KL., Roberts JM., Couser WG., Johnson RJ. (1997) Mesangial cell proliferation mediated by PDGF and bFGF is determined by levels of the cyclin kinase inhibitor p27Kip1. *Kidney Int* 51:1088-1099
- 112 Sharma A., Askari JA, Humphries MJ., Jones EY., Stuart DI. (1999) Crystal structure of a heparin- and integrin-binding segment of human fibronectin. *Embo J* 18:1468-1479
- 113 Shea SM., Raskova J., Morrison AB. (1978) A stereologic study of glomerular hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat. *Am J Pathol* 90:201-210
- 114 Shi Y., Massague J. (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685-700
- 115 Siragy HM. (2009) The potential role of the angiotensin subtype 2 receptor in cardiovascular protection. *Curr Hypertens Rep* 11:260-262
- 116 Stacy BD., Wilson BW. (1970) Acidosis and hypercalciuria: renal mechanisms affecting calcium, magnesium and sodium excretion in the sheep. *J Physiol* 210:549-564
- 117 Steckelings UM., Kaschina E., Unger T. (2005) The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides* 26:1401-1409
- 118 Steckelings UM., Rompe F., Kaschina E., Namsolleck P., Grzesiak A., Funke-Kaiser H., Bader M., Unger T. (2009) The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 11:67-73

- 119 Stünzi H., Weiss E. (1990): *Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin*, 8. Aufl. Paul Parey Verlag
- 120 Suter P.F., Kohn B. (2006) Harnapparaterkrankungen, Nephrologie, Urologie; *Praktikum der Hundeklinik*. Berlin, Parey Verlag; 809 ff
- 121 Taub DD., Proost P., Murphy WJ., Anver M., Longo DL., van Damme J., Oppenheim JJ. (1995) Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 95:1370-1376
- 122 Thomas WG., Qian H., Chang CS., Karnik S. (2000) Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin II (AT(1A)) receptor requires generation of a conformation that is distinct from the inositol phosphate-signaling state. *J Biol Chem* 275:2893-2900
- 123 Unger T., Dahlof B. (2010) Compound 21, the first orally active, selective agonist of the angiotensin type 2 receptor (AT2): implications for AT2 receptor research and therapeutic potential. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 11:75-77
- 124 Uniprot.org: Angiotensinogen. [www.uniprot.org/uniprot/P01015#PRO\\_0000032469](http://www.uniprot.org/uniprot/P01015#PRO_0000032469); 24.01.2014
- 125 Uniprot.org: AT 2 Receptor Typ 1a. [www.uniprot.org/uniprot/P25095](http://www.uniprot.org/uniprot/P25095); 24.01.2014
- 126 Uniprot.org: AT 2 Receptor Typ 1b. [www.uniprot.org/uniprot/P29089](http://www.uniprot.org/uniprot/P29089); 24.01.2014
- 127 Uniprot.org: AT 2 Receptor Typ 2. [www.uniprot.org/uniprot/P35351](http://www.uniprot.org/uniprot/P35351); 24.01.2014
- 128 Van Vliet A., Baelde HJ., Vleming LJ., de Heer E., Bruijn JA. (2001) Distribution of fibronectin isoforms in human renal disease. *J Pathol* 193:256-262
- 129 Viedt C., Orth SR. (2002) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the kidney: does it more than simply attract monocytes? *Nephrol Dial Transplant* 17:2043-2047

- 130 Vogt A., Nakanoin K. (1965) Speciesbedingte Unterschiede im Ablauf der experimentellen Nephritis der Ratte nach Injektion von Kaninchen- und Enten-Antirattennierenserum. *Virehows Arch. path. Anat.* 340, 177--184
- 131 Wan Y., Wallinder C., Plouffe B., Beaudry H., Mahalingam AK., Wu X., Johansson B., Holm M., Botoros M., Karlen A., Pettersson A., Nyberg F., Fandriks L., Gallo-Payet N., Hallberg A., Alterman M. (2004) Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT2 receptor agonist. *J Med Chem* 47:5995-6008
- 132 Wang-Rosenke Y., Mika A., Khadzhyrov D., Loof T., Neumayer HH., Peters H. (2012): Impact of biological gender and soluble guanylate cyclase stimulation on renal recovery after relief of unilateral ureteral obstruction. *J Urol.*; 188(1): 316-23
- 133 Weissenbach M., Clahsen T., Weber C., Spitzer D., Wirth D., Vestweber D., Heinrich PC., Schaper F. (2004) Interleukin-6 is a direct mediator of T cell migration. *Eur J Immunol* 34:2895-2906
- 134 Wenzel UO., Krebs C., Benndorf R. (2010) The angiotensin II type 2 receptor in renal disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 11:37-41
- 135 Wenzel UO., Thaiss F., Helmchen U., Stahl RA., Wolf G. (2002) Angiotensin II infusion ameliorates the early phase of a mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 61:1020-1029
- 136 Wolf G., Butzmann U., Wenzel UO. (2003) The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol* 93:P3-13
- 137 Wu L., Iwai M., Nakagami H., Chen R., Suzuki J., Akishita M., de Gasparo M., Horiuchi M. (2002) Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling in angiotensin II type 2 receptor null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:49-54
- 138 Wu L., Iwai M., Nakagami H., Li Z., Chen R., Suzuki J., Akishita M., de Gasparo M., Horiuchi M. (2001) Roles of angiotensin II type 2 receptor stimulation associated with

- selective angiotensin II type 1 receptor blockade with valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury. *Circulation* 104:2716-2721
- 139 Xu M., Deng B., Chow YL., Zhao ZZ., Hu B., (2007); Effects of curcumin in treatment of experimental pulmonary fibrosis: a comparison with hydrocortison. *J Ethnopharmacol*; 112(2):292-9
- 140 Yamada T., Horiuchi M., Dzau VJ. (1996) Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:156-160
- 141 Yu C., Takeda M., Soliven B. (2000) Regulation of cell cycle proteins by TNF-alpha and TGF-beta in cells of oligodendroglial lineage. *J Neuroimmunol* 108:2-10
- 142 Zhang SL., To C., Chen X., Filep JG., Tang SS., Ingelfinger JR., Chan JS. (2002) Essential role(s) of the intrarenal renin-angiotensin system in transforming growth factor-beta1 gene expression and induction of hypertrophy of rat kidney proximal tubular cells in high glucose. *J Am Soc Nephrol* 13:302-312

## 13 Danksagung

Großer Dank gilt Prof. Dr. Harm Peters, der mir das Thema überlassen hat, mir mit Rat und Tat zu jedem Zeitpunkt zur Seite stand und die Arbeit in der praktischen Durchführung und im theoretischen Teil mit besonderer Hingabe betreut hat.

Prof. Dr. Achim Gruber danke ich für die Beratung und abschließende Begleitung dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich insbesondere den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, bestehend aus Tanja Loof, Stephanie Krämer, Alice Mika, Yingrui Wang-Rosenke, Dmytro Khadzhynov und Jens Gaedeke für ihren selbstlosen Einsatz und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich danke auch Frau Dr. Ulrike M. Steckelings für die Bereitstellung des Wirkstoffes Compound 21.

Meinen Eltern, meiner Frau, meinen Geschwistern und meinen Freunden danke ich für die bedingungslose Unterstützung, den Spaß und die Aktivitäten außerhalb der Promotionsarbeit.

## **14 Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich die Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfen erstellt habe.

Berlin, den 19.03.2015

Daniel Brand