

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Innere Medizin, III. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor Prof. Dr. med. Rolf Stahl

## **Progression von Nierenerkrankungen bei EP<sub>2</sub>- und p50- knockout Mäusen am Modell der renalen Ablation**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Alexandra Katharina Krygowski  
aus Bydgoszcz

Hamburg 2011

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 06.12.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Friedrich Thaiss**

**Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. med. André Schneider**

**Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. med. Jens Aberle**

Meinen Eltern

<b>Arbeitshypothese und Fragestellung</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>8</b>
1.1. Chronische Niereninsuffizienz .....	8
1.2. Progression von Nierenerkrankungen .....	9
1.3. Ablationsmodell .....	10
1.3.1. Hämodynamische und inflammatorische Ursachen der Progression .....	10
1.4. Mediatoren von Inflammation und Resolution .....	11
1.4.1. Cyclooxygenase-2 (COX-2) .....	11
1.4.2. Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) .....	12
1.4.3. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF-κB) .....	14
1.4.4. p50-Untereinheit von NF-κB .....	16
<b>2. Material</b> .....	<b>18</b>
2.1. Versuchstiere .....	18
2.2. Primersequenzen .....	19
2.3. Zusammensetzung verwendeter Lösungen .....	20
<b>3. Methoden</b> .....	<b>23</b>
3.1. Modell der renalen Ablation und Organentnahme .....	23
3.2. Urinanalyse .....	24
3.2.1. Gewinnung von Mäuseurin und Analyse .....	24
3.2.2. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese .....	24
3.2.2.1. Probenvorbereitung .....	25
3.2.2.2. Auftrennen der Proben.....	25
3.2.2.3. Färbung der Proteingelen (Silberfärbung) .....	26
3.2.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	26
3.3. Molekularbiologie .....	27
3.3.1. Isolierung von RNA .....	27
3.3.2. Bestimmung der RNA Konzentration .....	28
3.3.3. Reverse Transkription (RT) von mRNA in cDNA .....	29
3.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	29

3.4. Proteinbiochemie .....	30
3.4.1. Gelshiftanalyse / Electrophoretic Mobility-Shift Assay (EMSA) .....	30
3.4.1.1. Isolierung von nukleären Extrakten .....	32
3.4.1.2. Lowry Proteinbestimmung .....	32
3.4.1.3. Labeling der Sonde .....	33
3.4.1.4. Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	33
3.4.1.5. Supershift .....	34
3.5. Histologie .....	34
3.5.1. Allgemeines .....	34
3.5.1.1. Probenvorbereitung .....	34
3.5.1.2. Auswertung .....	35
3.5.2. PAS-Färbung .....	35
3.5.2.1. Glomerulosklerose-Index .....	35
3.5.3. Kollagen Typ IV-Färbung .....	36
3.5.3.1. Kollagen Typ IV-Auswertung .....	37
3.5.4. F4/80-Färbung .....	37
3.5.4.1. Auswertung der F4/80- positiven Zellen .....	38
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
4.1. Tabellarische Zusammenstellung der Basisdaten .....	39
4.2. Ergebnisse der Urinuntersuchungen .....	42
4.2.1. Qualitative Untersuchungen .....	42
4.2.2. Quantitative Untersuchungen .....	44
4.3. Ergebnisse der Real-Time-PCR .....	46
4.4. Ergebnisse der EMSA Untersuchungen .....	52
4.5. Ergebnisse der histologischen Untersuchungen .....	54
4.5.1. PAS-Färbung .....	54
4.5.2. Kollagen Typ IV-Färbung .....	57
4.5.3. F4/80-Färbung .....	60
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>62</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>67</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>69</b>

7.1. Abkürzungsverzeichnis .....	69
7.2. Literaturverzeichnis .....	71
7.3. Danksagung .....	83
7.4. Eidesstattliche Versicherung .....	84

## **Arbeitshypothese und Fragestellung**

Anhand eines Tiermodells von verminderter Nierenmasse, dem sogenannten „Ablationsmodell“ in Mäusen, soll der Einfluss von Prostaglandin E<sub>2</sub> und NF-κB auf die Progression von Nierenerkrankungen untersucht werden. Dabei werden sogenannte „knockout“ Mäuse mit genetisch fehlendem (deletiertem) EP<sub>2</sub>-Rezeptor bzw. fehlender NF-κB p50-Untereinheit verwendet, um den Einfluss auf den weiteren Verlauf bzw. das Voranschreiten der Nierenerkrankung zu untersuchen.

Die Hypothese ist, dass in den „knockout“ Mäusen wegen der Bedeutung von Prostaglandin E<sub>2</sub> und auch von NF-κB in der Regulation der Progression auch bei einem primär nicht entzündlich vermittelten Modell der fortschreitenden Nierenerkrankung der Verlauf der Erkrankung gegenüber wildtyp-Mäusen verändert ist. Wegen der komplexen Wirkungen der beiden Mediatoren (PGE<sub>2</sub> und NF-κB) sowohl in pro-inflammatorischer, als auch anti-inflammatorischer Hinsicht, ist dabei eine begründete Vorhersage, in welche Richtung die Balance durch eine Deletion der Mediatoren verändert wird, unseres Erachtens nicht möglich. Wir sind deshalb dieser Fragestellung ergebnisoffen und ohne einseitige Arbeitshypothese nachgegangen.

# 1. Einleitung

## 1.1. Chronische Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz bezeichnet einen Zustand eingeschränkter Nierenfunktion verschiedener Ursache mit langsamem, über Monate oder Jahre voranschreitendem Verlust der Nierenleistung. Der Begriff chronisches Nierenversagen bezeichnet das Terminal- oder Endstadium einer chronischen Nierenkrankheit, welches durch eine Nierenleistung von 15 % der Norm oder darunter (entsprechend einer glomerulären Filtrationsrate von unter 15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) gekennzeichnet ist und die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie in Form von Dialysebehandlung oder Nierentransplantation macht. Im Februar 2002 wurde von der Amerikanischen Nierenstiftung (National Kidney Foundation) der Begriff chronische Nierenkrankheit in der Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) neu definiert [2]. Diese Definition hat sich mittlerweile weltweit durchgesetzt. Eine chronische Nierenkrankheit liegt demnach vor, wenn die Nierenfunktion (glomeruläre Filtrationsrate: GFR) unter 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> der Norm abgefallen ist und wenn dieser Zustand länger als drei Monate anhält [49].

Das Maß für die Nierenfunktion stellt somit die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) dar. Sie wird zumeist vereinfacht durch die Bestimmung der Kreatinin-Konzentration im Serum und unter Anwendung von Näherungsformeln ermittelt. Die zwei gebräuchlichsten Formeln sind die verkürzte MDRD-Formel und die Cockcroft-Gault-Formel. In die verkürzte MDRD-Formel (1999) gehen Alter, Geschlecht, ethnische Herkunft und die Kreatinin-Konzentration ein [48, 87, 93]. Die Cockcroft-Gault-Formel (1973) benutzt Alter, Geschlecht, Kreatinin-Konzentration und Körpergewicht [15, 93]. Anhand der glomerulären Filtrationsrate und der Proteinurie wird die chronische Nierenkrankheit in fünf Schweregrade eingeteilt.

Die häufigsten Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz weltweit sind Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie [1, 34, 44, 65]. In den letzten zehn Jahren hat sich die Inzidenz und Prävalenz der chronischen Nierenerkrankungen etwa verdoppelt. Patienten mit chronischem Nierenversagen haben ein erhöhtes Risiko für das Entstehen einer terminalen Niereninsuffizienz mit daraus erforderlicher Nierenersatztherapie in Form einer Dialysebehandlung oder Transplantation. Dies ist von erheblich

volkswirtschaftlicher Bedeutung. Die Kosten für die Behandlung der terminalen Niereninsuffizienzen belaufen sich weltweit geschätzt auf 70-75 Milliarden Dollar, ausgenommen sind die Kosten der Nierentransplantation [53]. Außerdem ist das chronische Nierenversagen ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen [43, 54]. Die Haupttodesursache der Patienten mit chronischem Nierenversagen sind Herz-Kreislaufkrankungen [33]. Daher sollte ein zusätzliches Ziel in der Prävention von Herz-Kreislaufkrankungen in dieser Patientengruppe liegen [18, 76]. Trotz der volkswirtschaftlichen Bedeutung des chronischen Nierenversagens ist nur wenig über die Ursachen und die Pathophysiologie der einzelnen zur Niereninsuffizienz führenden Erkrankungen bekannt. Noch weniger werden bisher die inter- und intrazellulären Signalwege verstanden, die für das Fortschreiten der Erkrankung von Bedeutung sind, und leider sind deshalb auch keine kausalen Therapien verfügbar.

## **1.2. Progression von Nierenerkrankungen**

Angesichts der zunehmenden Zahl der chronischen Niereninsuffizienzen mit daraus folgender Nierenersatztherapie gewinnt die Prävention des chronischen Nierenversagens zunehmend an Bedeutung. Während früher die Glomerulonephritis als Hauptursache für chronische Niereninsuffizienz galt, sind heutzutage Diabetes mellitus und die arterielle Hypertonie ätiologisch von weitaus größerer Bedeutung.

Diabetes und arterielle Hypertonie führen zur Proteinurie, die ein Risikomarker und möglicherweise auch ein Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz, aber auch von kardiovaskulären Erkrankungen ist. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Senkung der Proteinurie bzw. der Albuminurie mit einer besseren renalen Prognose einhergeht und zu einer Senkung von kardiovaskulären Erkrankungen führt [68-72]. Daher ist die Senkung der Proteinurie ein wichtiges therapeutisches Ziel bei der Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 und der Hypertonie.

### **1.3. Ablationsmodell**

Die Progression von Nierenerkrankungen lässt sich experimentell beispielsweise mit einem sogenannten „Ablationsmodell“, der Reduktion eines Großteils der Nierenmasse, darstellen und untersuchen. Das Prinzip besteht darin, dass es nach Resektion eines größeren Anteils von Nierengewebe zwangsläufig zur Verschlechterung der Nierenfunktion und damit zum Voranschreiten der Nierenerkrankung kommt. Obwohl es sich bei dem „Ablationsmodell“ um ein primär nicht entzündliches Modell handelt, spielen auch inflammatorische Komponenten eine wichtige Rolle.

#### **1.3.1. Hämodynamische und inflammatorische Ursachen der Progression**

Die Reduktion von Nierenmasse ist ein nicht-immunologisches Modell der Progression von Nierenerkrankungen [36, 82]. Die Entwicklung der zunehmenden Narbenbildung der Glomeruli (Glomerulosklerose) und des Interstitiums (interstitielle Fibrose) beruhen auf einer hämodynamischen Störung, die durch die Reduktion der Nierenmasse hervorgerufen ist, und folglich einer Abnahme der Nierenleistung [104]. Die Ursachen in der Pathogenese der Vernarbung sind vielfältig. Eine wichtige Rolle spielen die Infiltration von Leukozyten, Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ , PDGF, FGF), vasoaktive Mediatoren, Zytokine, Apoptose ortsständiger Zellen, sowie Proteine und Proteasen der extrazellulären Matrix. Die Aktivierung und Proliferation der mesangialen Zellen innerhalb einiger Tage nach Ablation ist beispielsweise assoziiert mit „platelet-derived growth factor“ (PDGF) [22]. Durch die intraglomerulär hämodynamischen Veränderungen wird zudem das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert und es kommt zur verstärkten Ausschüttung von Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) mit schließlich resultierender Glomerulosklerose [38, 97, 99].

In der Niere wird TGF- $\beta$  in den Glomeruli und hauptsächlich in den distalen Tubuli exprimiert. Die Makrophagen bilden vor allem fibroblast growth Faktor (FGF), aber auch das TGF- $\beta$  und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ). Das TGF- $\beta$  beeinflusst die drei Mechanismen der Matrixexpansion - vermehrte Produktion, verminderter Abbau und vermehrte Produktion vernetzender Proteine - und die Regulation der einzelnen Reaktion [11]. Die Folge ist eine glomeruläre Sklerose und interstitielle Fibrose [77]. Dadurch, dass das TGF- $\beta$

die Fibroblasten aktivieren kann, kommt es im Verlauf vieler renaler Erkrankungen zur deren Stimulation. In späteren Phasen renaler Erkrankungen resultiert eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Ablagerung und Abbau von extrazellulärer Matrix zu Gunsten der Ablagerung. Die vermehrte extrazelluläre Matrix führt zu einer beginnenden Fibrose. Somit kann man sagen, dass nach initialer Schädigung der Niere residente Zellen aktiviert werden, die durch Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie z.B. dem TGF- $\beta$ , verschiedene Vorgänge wie Apoptose, Proliferation, Infiltration und epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) auslösen können [6, 39, 105, 106].

Ungefähr 10 Tage nach Ablation kommt es zur Infiltration des Restgewebes mit Makrophagen, das Maximum wird erreicht nach 12 Wochen [24, 74, 102]. Stimuliert wird diese Infiltration durch Expression von Monocyte-chemotactic protein-1 (MCP-1) und Angiotensin II von verschiedenen Zelltypen [78, 98]. Auch T-Lymphozyten, insbesondere T-Helfer-Zellen, spielen eine Rolle in der tubulointerstitiellen Infiltration [24, 74].

#### **1.4. Mediatoren von Inflammation und Resolution**

##### **1.4.1. Cyclooxygenase-2 (COX-2)**

Die Cyclooxygenasen (COX) sind zentrale Enzyme des Prostaglandinstoffwechsels. Es existieren insgesamt zwei Isoformen der Cyclooxygenasen, die COX-1 und COX-2. Die COX-1 wird konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert [60] und dient homöostatischen Funktionen wie beispielsweise der Zytoprotektion oder der Aggregation der Thrombozyten [23, 89]. Die Synthese von COX-2 hingegen wird in der Regel erst bei Verletzungen, Entzündungen oder Aktivierung von Zellen durch Zytokine und Mitogene induziert [20, 85].

Die Reaktionsprodukte der Cyclooxygenasen besitzen eine Reihe wichtiger physiologischer Funktionen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Nierendurchblutung, der Thrombozytenaggregation und dem Schutz der Schleimhäute im Gastrointestinaltrakt, insbesondere im Magen. Hier steht jedoch die Isoform COX-1 als „housekeeping enzyme“ im Vordergrund [51, 73]. Die COX-2 ist in vielen Geweben normalerweise nicht nachweisbar. Die Expression von COX-2 kann durch extrazelluläre Stimuli, als Reaktion auf ein

entzündliches Geschehen, massiv gesteigert werden. Konstitutiv exprimiert und nachweisbar ist die COX-2 allerdings im Gewebe von Niere, Prostata und Gehirn [85].

Als Substrat der COX-1 und -2 dient die Arachidonsäure, eine  $\omega$ -6-Fettsäure, welche als Baustein der membrangebundenen Phospholipide über die cytosolische Phospholipase A2 (cPLA2) freigesetzt wird [92]. Die Arachidonsäure wird durch die enzymatische Aktivität von COX-2 in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in das Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) umgewandelt. In einem zweiten Schritt reduziert COX-2 PGG<sub>2</sub> zu Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) [84]. Das Prostaglandin H<sub>2</sub> ist eine Vorstufe verschiedener Prostaglandine und kann durch zell- oder gewebsspezifische Synthesen zu Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ), Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) umgewandelt werden [75]. Aus der Arachidonsäure können so entweder durch verschiedene PGE-Synthesen Prostaglandine oder durch Lipxygenasen Leukotriene gebildet werden (siehe Abbildung 1).

#### **1.4.2. Prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)**

Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) gehört zur Gruppe der Prostaglandine, die insbesondere an entzündlichen Reaktionen beteiligt sind. Ziel von PGE<sub>2</sub> sind die Prostaglandinrezeptoren EP<sub>1</sub> bis EP<sub>4</sub>, welche sich durch eine unterschiedliche Affinität für ihren Liganden auszeichnen und über second messenger wie Ca<sup>2+</sup> oder zyklisches Adenosinmonophosphat weitere Signalwege aktivieren [19]. Die Prostaglandin EP-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren vom Rhodopsin-Typ [16]. Sie weisen eine extrazelluläre N-terminale Domäne, sieben Transmembranregionen sowie eine intrazelluläre C-terminale Domäne auf. Die Rezeptoren sind an heterotrimere G-Proteine gebunden, die mittels sekundärer Botenstoffe das extrazelluläre Signal in ein intrazelluläres Signal umwandeln. Durch die Bindung von Prostaglandinen wird eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, die die Konzentrationen von Kalzium und/oder cAMP verändert. Unter normalen Bedingungen führt z.B. die Aktivierung des EP<sub>1</sub>-Rezeptors zu einem Einstrom von Kalzium und damit zu einer Erhöhung von Inositoltriphosphat (IP3), die Aktivierung von EP<sub>2</sub>-, EP<sub>4</sub>- und

bestimmten Isoformen von EP<sub>3</sub>-Rezeptoren führt dagegen zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration [16, 59].

Prostaglandine vermitteln eine Vielzahl von unterschiedlichen Funktionen. Sie regulieren die glomeruläre Filtration [45], die Uteruskontraktion [27], die Sekretion und Motilität im Gastrointestinaltrakt [67] sowie die Embryoimplantation und -entwicklung. Die Prostaglandine führen zur Kontraktion sowie Relaxation der glatten Muskulatur z.B. in den Bronchien und im Gastrointestinaltrakt. Sie wirken bei der Zelldifferenzierung, Apoptose, und Onkogenese mit. Sie regulieren die Aktivität von Thrombozyten und sind in die vaskuläre Homöostase und Hämostase involviert [59]. Ausserdem spielen die Prostaglandine eine wichtige Rolle in der Inflammation und der Modulation von immunologischen Prozessen sowie der Induktion von Fieber [56].

Einige Studien zeigen, dass die Produkte der Cyclooxygenase-2 (COX-2) neben der Initiation der Entzündungsreaktion auch eine wichtige Rolle in der Resolution der akuten Entzündung spielen [5, 29, 37]. Durch die Produktion des pro-inflammatorischen Prostaglandin E<sub>2</sub> wird zwar die Entzündung eingeleitet, allerdings gibt es auch Hinweise, dass eine spätere Synthese von PGE<sub>2</sub> in der Rückbildung der Entzündung vorteilhaft wirken kann [79, 80]. Die Resolution wird auch bedingt durch die Synthese des anti-inflammatorischen 15-Deoxy-Delta-12,14-Prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>). Zum einen handelt es sich vermutlich um einen Wechsel in der Prostaglandinsynthese zwischen der pro-inflammatorischen Prostaglandine zu Beginn der Entzündung und der anti-inflammatorischen Prostaglandine während der Resolution der Entzündung [50]. Zum anderen ist COX-2 wahrscheinlich selbst von essentieller Bedeutung für die Resolution der Entzündung [17, 25, 55, 96].

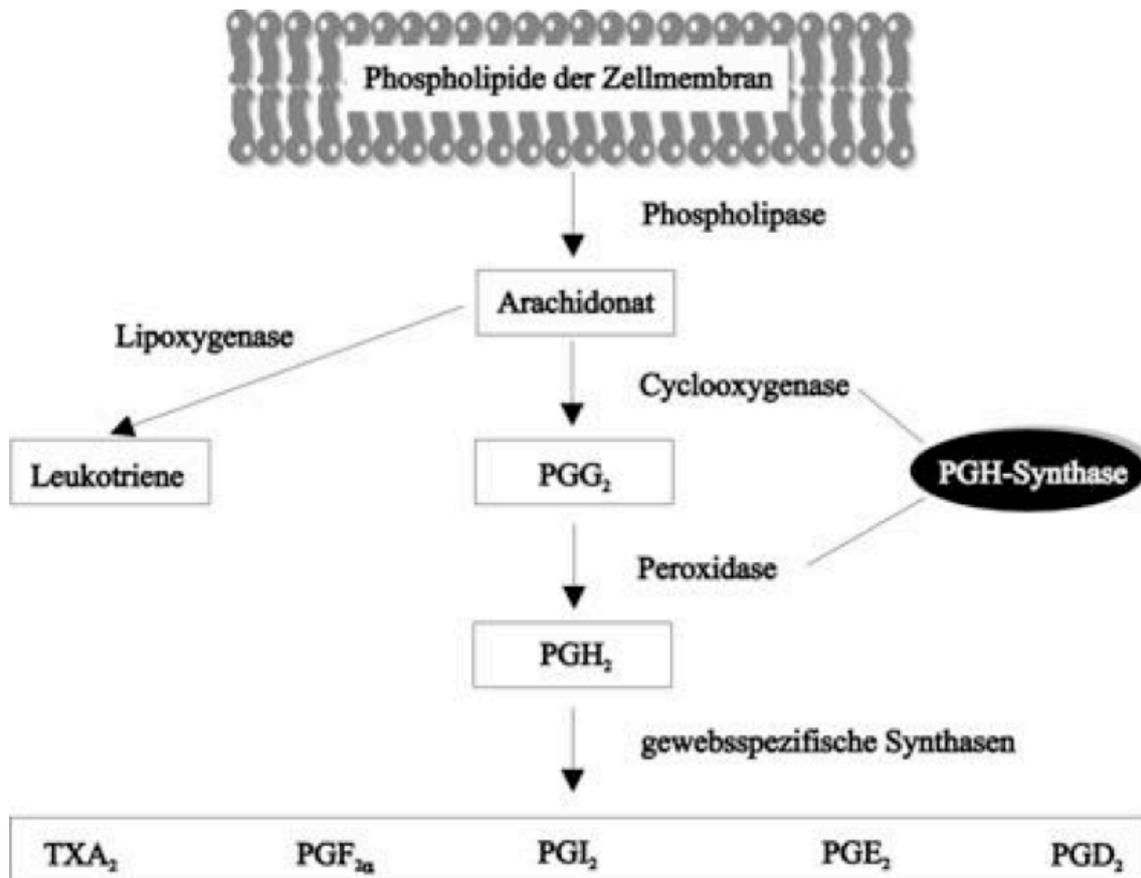


Abb. 1: Biosynthese von Prostaglandinen [83]

### 1.4.3. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- $\kappa$ B)

NF- $\kappa$ B spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und des Zelltodes. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B wird durch viele verschiedene Stimuli ausgelöst, dazu zählen Wachstumsfaktoren, Zytokine (z.B. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ), Chemokine, Adhäsionsmoleküle, bakterielle und virale Antigene (z.B. Lipopolysaccharide, doppelsträngige RNA) sowie induzierbare Enzyme wie die Cyclooxygenase-2 [41, 88, 91, 100].

NF- $\kappa$ B ist ein dimerer Transkriptionsfaktor aus der Familie der Rel-Proteine, der in fast allen Zelltypen und Geweben vorkommt [26]. Bei den Säugetieren sind fünf Rel- (NF- $\kappa$ B) Proteine bekannt. Diese werden in zwei Klassen unterteilt. Die erste Klasse besteht aus Rel-A (p65), Rel-B und c-Rel. Diese Proteine werden als fertige Produkte gebildet, d.h. sie müssen nicht mehr proteolytisch gespalten werden. Sie enthalten die Rel-Homologie-Domäne, die für die Bindung an die DNA, Dimerisierung, Bindung an I $\kappa$ Bs und nukleäre

Translokation zuständig ist. Die Rel-A (p65), Rel-B und c-Rel Proteine besitzen außerdem eine C-terminal gelegene Transaktivierungsdomäne (TAD), die die Gentranskription beeinflusst [64]. Die zweite Gruppe wird durch die Gene p105 (NF- $\kappa$ B1) und p100 (NF- $\kappa$ B2) in Form von Vorläuferproteinen gebildet. Aus dem Vorläuferprotein p100 entsteht durch proteolytische Spaltung das reife Protein p52. Das reife 50 kDa große NF- $\kappa$ B Protein entsteht durch konstitutive Prozessierung aus dem Vorläuferprotein p105 [35]. Diese Proteine enthalten keine Transaktivierungsdomäne. Alle fünf NF- $\kappa$ B-Untereinheiten können in-vivo sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden mit Ausnahme des Rel-B-Proteins, welches ausschließlich Heterodimere in-vivo bildet [28].

NF- $\kappa$ B liegt gewöhnlich inaktiv im Zytoplasma vor und hat deswegen keinen Zugang zu der im Zellkern befindlichen DNA. Die Retention im Zytoplasma wird erreicht durch inhibitorische  $\kappa$ B-Proteine (I $\kappa$ Bs), die an NF- $\kappa$ B binden und es so deaktivieren. Zu den inhibitorischen  $\kappa$ B-Proteinen gehören I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ , I $\kappa$ B- $\epsilon$  und das Bcl-3. Der I $\kappa$ B-Kinasekomplex (IKK) kann durch einen beliebigen Stimulus aktiviert werden. Die Folge ist eine Phosphorylierung sowie Ubiquitin-abhängiger Abbau der I $\kappa$ Bs durch das Proteasom [41, 42]. NF- $\kappa$ B-Moleküle werden somit von ihren Inhibitoren freigesetzt und können nun in den Zellkern gelangen, wo sie ihre spezifischen Funktionen ausüben. Der I $\kappa$ B-Kinasekomplex besteht aus IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sowie einer regulatorischen Untereinheit IKK $\gamma$ , dem NF- $\kappa$ B-essential-Modulator (NEMO).

Die IKK $\alpha$ -vermittelte Aktivierung des Rel B-p52-Komplexes spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der erworbenen Immunität und der lymphoiden Organe. IKK $\beta$  reguliert einen direkten, I $\kappa$ B $\alpha$ -abhängigen Weg, der in der angeborenen Immunität eine zentrale Rolle einnimmt [81]. cRel ist von Bedeutung in der Förderung des hämatopoetischen Zellüberlebens und Produktion von Mediatoren, die eine Entzündungsreaktion unterhalten [13, 31, 32].

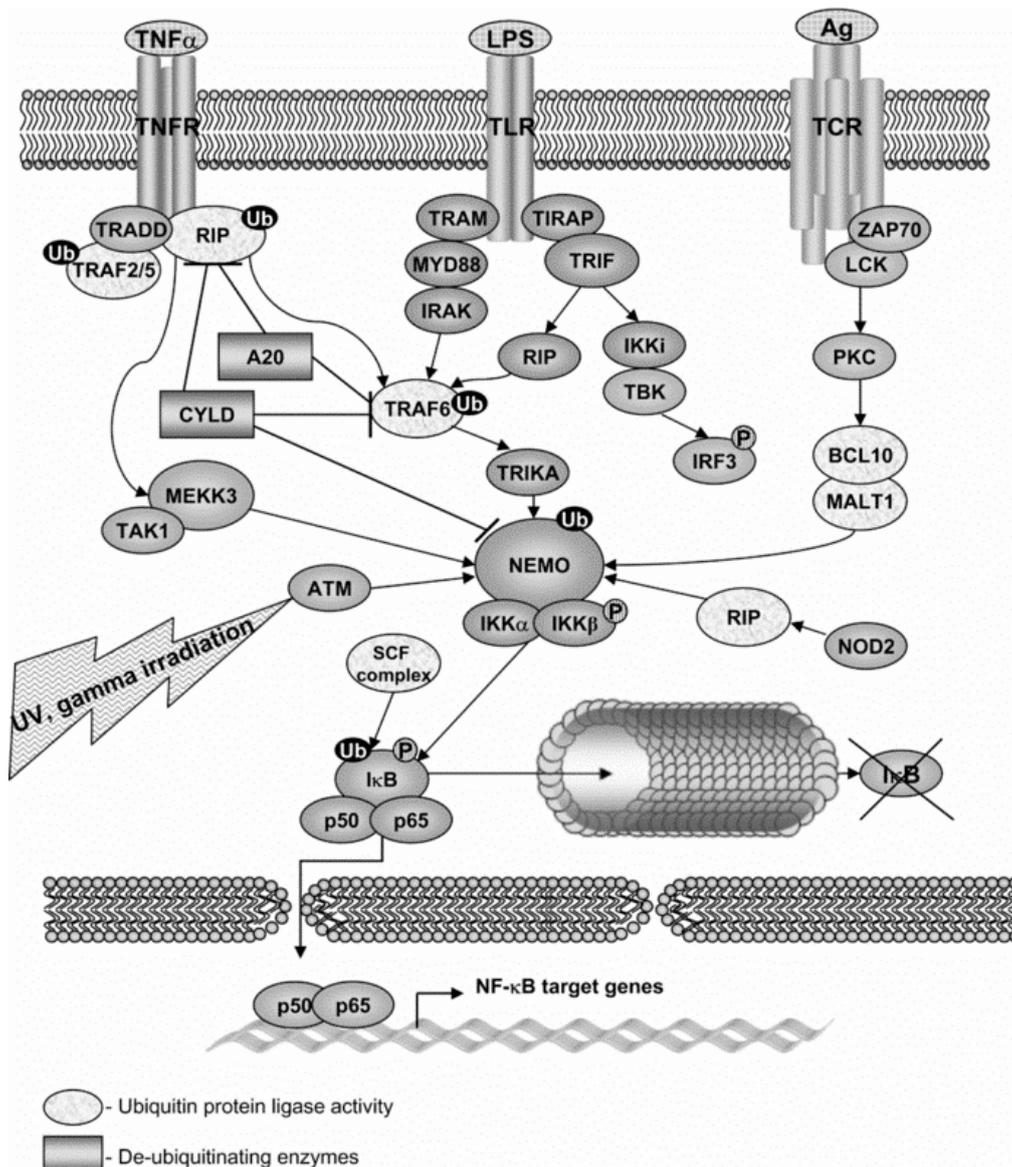


Abb. 2: NF- $\kappa$ B Signalweg [90]

#### 1.4.4. p50-Untereinheit von NF- $\kappa$ B

Der NF- $\kappa$ B-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Antwort der Entzündungs- und Immunreaktion durch Regulation der Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktoren und induzierbaren Enzymen wie z.B. der Cyclooxygenase-2 [7]. Ausserdem ist NF- $\kappa$ B auch als wichtiger Regulator des programmierten Zelltods Typ 1 (Apoptose) bekannt. Über die direkte und indirekte Regulation entsprechender Zielgene reguliert NF- $\kappa$ B damit sowohl anti-apoptotische als auch pro-apoptotische Mechanismen, die für die Resolution der Entzündung mitbestimmend sind. In Modellen mit Zellstimulation sind vor allem anti-

apoptotische Funktionen von NF- $\kappa$ B gut untersucht [8]. Zu den durch NF- $\kappa$ B regulierten anti-apoptotischen Genen zählen unter anderem Bcl-xL [58] und A1/Bfl1 [47, 95], die beide zur Bcl-2-Familie gehören. Neben der Regulation von anti-apoptotischen Genen führt NF- $\kappa$ B zur Expression von pro-apoptotischen Genen z.B. Bax, das ebenfalls zur Bcl-2-Familie gehört [9]. Zu den Mechanismen, über die NF- $\kappa$ B auch anti-inflammatorisch und pro-apoptotisch wirkt, und so zur Auflösung einer Entzündung beitragen kann, gehört auch die Stimulation der Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen und Prostaglandinen (z.B. über Stimulation der COX-2), sowie einer vermehrten Apoptose von Leukozyten [46].

Bei Nierengewebsverletzungen hat die Aktivierung von NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle in der Induktion der pro-inflammatorischen Genexpression und folglich in der Entstehung einer progressiven entzündlichen Nierenerkrankung. Erkenntnisse bezüglich der Funktion von NF- $\kappa$ B in Bezug auf die Inflammation und Resolution sind weitestgehend unklar. Es gibt jedoch Studien die zeigen, dass der p50-Untereinheit von NF- $\kappa$ B hinsichtlich der Auflösung einer Entzündung eine große Bedeutung zukommt, insbesondere bei der LPS-induzierten Nephritis [63]. Die p50-Homodimere antagonisieren die NF- $\kappa$ B abhängige pro-inflammatorische Genexpression und fördern gleichzeitig die Genexpression für die erforderliche Resolution. Daher beobachtet man bei NF- $\kappa$ B p50-knockout Mäusen eine signifikant höhere Expression von Chemokinen und eine anhaltende entzündliche Zellinfiltration mit folglich einsetzender Gewebsverletzung und reduziertem Überleben [57, 61, 86].

## **2. Material**

### **2.1. Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden Mäuse verwendet, die auf einem C57BL/6 Hintergrund gezüchtet waren. Drei verschiedene Genotypen wurden verglichen: 1. C57BL/6 Wildtypen (wt); 2. Mäuse mit einer Gendefizienz für die p50 Proteinuntereinheit des Transkriptionsfaktors NF-kappa B, p50-knockout (p50); und 3. Mäuse mit einer Gendefizienz für den Prostaglandin Rezeptor EP<sub>2</sub>, EP<sub>2</sub>-knockout (EP<sub>2</sub>). Diese Tiere waren die abladierten Mäuse, d.h. sie erfuhren eine 5/6-tel Nephrektomie als zweizeitigen Eingriff. Zu den Gruppen gab es jeweils die Kontrolltiere, die nur einmalig eine Nephrektomie erhalten haben.

Alle durchgeführten Arbeiten waren durch die Behörde für Wissenschaft und Gesundheit nach § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes genehmigt (F45/98, F1/98, F1/97) und unter Aufsicht der Tierversuchshaltung am UKE durchgeführt.

## 2.2. Primersequenzen (5` nach 3`)

mRANTES forward	GCA AGT GCT CCA ATC TTG CA
mRANTES reverse	CTT CTC TGG GTT GGC ACA CA
mMCP-1 forward	GGC TCA GCC AGA TGC AGT TAA
mMCP-1 reverse	CCT ACT CAT TGG GAT CAT CTT GC
mIP-10 forward	GCC GTC ATT TTC TGC CTC AT
mIP-10 reverse	TGC AGC GGA CCG TCC TT
mKollagen IV forward	GGC GGT ACA CAG TCA GAC CAT
mKollagen IV reverse	GGA ATA GCC GAT CCA CAG TGA
rTGF- $\beta$ forward	CGT GGA AAT CAA TGG GAT CAG
rTGF- $\beta$ reverse	GCA GGA AGG GTC GGT TCA T
m18s forward	CAC GGC CGG TAC AGT GAA AC
m18s reverse	AGA GGA GCG AGC GAC CAA A

### 2.3. Zusammensetzung verwendeter Lösungen

Pufferlösung:	50 mM MOPS
(NuPage MOPS SDS Running Buffer):	50 mM Tris Base
	0,1% SDS
	1 mM EDTA
Fixierlösung (Silberfärbung):	40% Methanol
	12% Essig
Entwicklungslösung (Silberfärbung):	6% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	0,02% Formaldehyd
	0,02% Na-Thiosulfat
GIT:	4 M Guanidinthiocyanat (Fa. Serva)
	25 mM Natrium-Citrat pH 7,0
	(Fa. Merck)
	0,5 % Natrium-Lauroylsarkosinat
	(Fa. Sigma)
	0,7 % β-Mercaptoethanol (Fa. Sigma)
Nonidet P-40:	Octylphenolpoly(ethylenglycolether)
Puffer A für nukleäre Extrakte:	10 mM HEPES pH 7,9
	10 mM KCl
	0,1 mM EDTA pH 8,0
	0,1 mM EGTA pH 8,0
	1 mM DTT
	Protease Inhibitor Mix M 1:100
	(Fa. Serva)

Puffer B für nukleäre Extrakte:	20 mM HEPES pH 7,9 400 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8,0 1 mM EGTA pH 8,0 1 mM DTT Protease Inhibitor Mix M 1:100 (Fa. Serva)
Labelingansatz:	2,0 µl 10x PNK-A Puffer 1,0 µl T4-Polynukleotidkinase x µl Oligo ( $\Sigma \sim 10$ pmol) 2,5 µl $\{^{32}\text{P}\}$ $\gamma$ dATP (=0,925 MBq / 25 µ Ci) ad 20 µl mit Aqua dest.
5x Binding Buffer:	90 mM HEPES pH 7,9 1 mM EDTA pH 8,0 0,5 mM EGTA pH 8,0 200 mM NaCl 1 mM DTT 0,5 mM PMSF 15 % Glycerol
Polyacrylamid-EMSA-Gel (4%):	2,21 g Glycerol 51,3 ml Aqua dest. 7,0 ml 10x TBE 9,33 ml 30 % (w/v) Acrylamid-Bis (29:1) 525 µl 10 % Ammoniumpersulfat 58,3 µl TEMED
Sample Diluent:	50 mM Tris 0,14 M NaCl 1 % BSA

	0,05 % Tween 20, pH 8,0
Bindungspuffer:	0,05 M Carbonat-Bicarbonat, pH 9,6
Waschlösung:	50 mM Tris 0,14 M NaCl 0,05 % Tween 20, pH 8,0
Blocklösung:	50 mM Tris 0,14 M NaCl 1 % BSA, pH 8,0
Schiff'sches Reagenz:	
Lösung 1:	2 g Pararosanilin EGA 30 ml 1 N HCl (85,42 g Aqua bidest. + 14,58 g 25 % HCl)
Lösung 2:	3,8 g Kaliumdisulfit (=Kaliummetabisulfit) 170 ml Aqua dest.
Hämatoxylin nach Gill:	0,2 g Hämatoxylin 200 ml Aqua dest. 0,02 g Natriumjodat 1,76 g Aluminiumsulfat-18-hydrat

### **3. Methoden**

Alle im Folgenden angewandten Versuchsmethoden richten sich nach dem abteilungsintern festgelegten Protokoll der Laboratorien der Abteilung für Innere Medizin/Nephrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

#### **3.1. Modell der renalen Ablation und Organentnahme**

Die renale Ablation erfolgte durch 5/6-tel Nephrektomie als zweizeitigen Eingriff, wobei während des ersten Eingriffs (Tag 1) etwa 1/2 bis 2/3 der linken Niere durch Unterbindung und nach ca. 10 bis 14 Tagen im zweiten Eingriff dann die rechte Niere in toto entfernt wurde. Bei der Operation wurde darauf geachtet, dass beide Nebennieren intakt in situ verblieben. Die Entnahme des restlichen 1/3-tel's der Niere für die weitere Verarbeitung und Untersuchung im Labor wurde bei allen drei Tiergruppen nach der kompletten Nephrektomie rechts an zwei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Bei der Hälfte der Tiere jeder Gruppe erfolgte dies nach drei Monaten, bei der anderen Hälfte jeweils nach sechs Monaten. Bei Kontrolltieren erfolgte die Organentnahme am Tag 1 in allen drei Versuchsgruppen.

Am Versuchsbeginn wurden die Tiere in Äthernarkose (Fa. Riedel de Haen) versetzt und danach gewogen. Anschließend wurden die Aorta und die Nieren freipräpariert, dann erfolgte mit einer 1 ml Insulinspritze (Fa. Becton Dickinson, Madrid) und einer Sterican 0,3 Kanüle (Fa. Braun) die Punktion der Aorta auf Höhe der Bifurcatio aortae, sodass etwa 0,5 ml Blut durch Aspiration entnommen werden konnte. Das Blut wurde in ein 1,3 ml Serumprobengefäß (Fa. Sarstedt) überführt. Im Zentrallabor erfolgte dann die Untersuchung des Kreatinins und Harnstoffs aus dem Serum. Nach Entfernen des verbliebenen Nierenteils, also des restlichen 1/3-tel der linken Niere wurde diese gewogen und dann gedrittelt. Ein Drittel wurde in eine vorbereitete große Petrischale überführt. Diese Proben dienten der Gewinnung von Protein und RNA und wurden bis zur weiteren Verarbeitung im Labor auf Eis gelagert. Das zweite Drittel wurde in ein Röhrchen mit 4%igem Formalin überführt. Diese Proben wurden für die Histologie verwendet. Das Nierengewebe wurde nach einem Tag in Formalin in 0,1 M Cacodylat-Puffer umgebettet. Das letzte Drittel wurde in eine kleine Petrischale überführt, mit Tissue Tek bedeckt und bei -80°C

eingefroren um Gefrierschnitte anzufertigen und weitere Analysen durchzuführen.

Zusätzlich zur Niere wurde auch das Herz gewogen um eine Hypertrophie festzustellen.

Bei den Kontrolltieren erfolgte am Tag 1 zur Probengewinnung die komplette beidseitige Nephrektomie. Die laborchemischen Untersuchungen waren identisch mit denen der Ablationstiere.

## **3.2. Urinanalyse**

### **3.2.1. Gewinnung von Mäuseurin und Analyse**

Zur Gewinnung von Urin wurden die Mäuse für ca. acht Stunden in Stoffwechsellkäfige gesetzt deren Boden aus einer 96-Loch Platte (Fa. Falcon) bestand. Die Idee dabei war, dass die Mäuse selten in das gleiche Loch urinieren und koten. Somit war wenig Urin mit Faeces kontaminiert. Um die Urinmenge zu steigern wurde den Mäusen zu Beginn 2 ml 0,9% NaCl intraperitoneal gespritzt. Der Urin wurde abpipettiert und in vorbereitete 1,5 ml Probengefäße überführt. Anschließend wurde der Urin bei -20°C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

Im Zentrallabor erfolgte dann die Bestimmung des Kreatinins und Harnstoffs aus den Mäuseurinen. Die Proben wurden vorher 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert und es mussten mindestens 200 µl Urin in die entsprechenden Röhrchen des Zentrallabors pipettiert werden, um die Bestimmung des Kreatinins und Harnstoffs zu gewährleisten.

### **3.2.2. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese**

Die Charakterisierung von Proteinen und die Überprüfung von deren Reinheit erfolgt mit Hilfe der Gelelektrophorese. Die Proteine sind aufgrund der Aminosäuren unterschiedlich stark elektrisch geladen und haben somit verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten und -richtungen in elektrischen Feldern. Um Diffusionseffekte zu vermeiden, findet die Elektrophorese in einem Gel statt. Als Gelmaterial wurde ein Polyacrylamid verwendet. Dieses Gel wird aus den giftigen Monomeren Acrylamid und N, N'-Methylen-bisacrylamid, sowie aus Ammoniumperoxidisulfat (APS) und Tetramethyldiamin (TEMED) hergestellt. Das Ammoniumperoxidisulfat (APS) wird als Radikalstarter

verwendet. Der Vernetzungsgrad und damit auch die Porengröße sind abhängig von der Acrylamidkonzentration. Die Polymerisationsgeschwindigkeit variiert abhängig von der Temperatur und vom pH-Wert.

Die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins wird durch Hinzugabe des anionischen Detergens SDS (Sodiumdodecylsulfat) zerstört. Durch die lang gestreckten Protein-SDS-Komplexe liegt das gleiche Ladung/Masse-Verhältnis vor, sodass die Ladung der Proteinuntereinheit nur noch von der Proteingröße und nicht mehr von der Ladung der Proteinuntereinheit abhängt. Die Proteine wandern aufgrund Ihrer negativen Ladung alle in dieselbe Richtung von der Kathode zur Anode.

### **3.2.2.1. Probenvorbereitung**

Von den Urinproben wurden 16 µl Urin in neue Eppendorf-Cups pipettiert. Alle Proben wurden mit 8 µl von dem Ladepuffer (NuPage Ladungspuffer + 0,4 M DTT) versetzt und zur vollständigen Denaturierung 10 min bei 80°C im Wasserbad erhitzt.

### **3.2.2.2. Auftrennen von Proben**

Für das Auftrennen von Proteinen wurden vorgefertigte, reduzierende 4-12% NuPage Bis-Tris Gradientengele (Fa. Invitrogen) benutzt. Das Gel wurde ausgepackt und mit Wasser gespült, um Reste des zur Konservierung verwendeten Butylalkohols zu entfernen. Anschließend wurde die Uringel-Blot-Apparatur vorbereitet und mit Pufferlösung (NuPage MOPS SDS Running Buffer) gefüllt.

Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer (Fa. PeqLab) eingespannt. Diese Kammer wurde anschließend vollständig mit Pufferlösung aufgefüllt. Die einzelnen Taschen wurden mit den Proteinen beladen, insgesamt 24 µl pro Tasche. In die erste Tasche wurde der Rainbow Marker (Marker Rainbow<sup>TM</sup> coloured protein molecular weight markers, Fa. Sigma) pipettiert, um den zu detektierenden Proteinen ihr entsprechendes Molekulargewicht zuzuordnen. Anschließend wurde über ein Netzgerät (Fa. Biorad) eine Stromstärke von 60 mA pro Gel und eine Spannung von 200 V angelegt. Diese Stromstärke wurde beibehalten, bis die ersten Proteine das untere Ende des Gels erreicht haben.

### **3.2.2.3. Färbung von Proteingelen (Silberfärbung)**

Nach Beendigung der SDS-Gelelektrophorese erfolgte zum Anfärben der Proteine eine Silberfärbung.

Die fertigen Gele wurden in einer Fixierlösung eine Stunde auf einem Schütteltisch (Fa. Fröbel) geschwenkt. Dies führte zur Denaturierung der Proteine im Gel und damit wurde ein weiteres Wandern der Proteine unmöglich. Anschließend erfolgte nach mehrmaligem Waschen mit 30% Ethanol und bidest. Wasser die Inkubation der Gele in einer Silbernitratlösung (0,2%  $\text{AgNO}_3$ ). Dadurch lagerten sich die Silberionen an die Proteine an. Das überschüssige Silber wurde durch mehrmaliges Waschen in bidest. Wasser abgewaschen. Anschließend erfolgte der Entwicklungsschritt. Durch Zugabe von alkalischem Formaldehyd wurden die Silberionen zu elementarem Silber reduziert. Dieses färbte die Stellen, an denen Proteine vorhanden waren, schwarz.

### **3.2.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Der ELISA dient der quantitativen Bestimmung von verschiedenen Inhaltsstoffen aus Proben, wie z.B. von Proteinen, Viren oder Antikörpern. Hierfür wird ein spezifischer monoklonaler Antikörper verwendet, der an eine 96-Mikrotiterplatte gebunden wird. Der Antikörper bindet aus der hinzugegebenen Probe die darin zu detektierenden Bestandteile. Durch einen zweiten, Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper wird durch Zugabe von Peroxidasesubstrat die am ersten Antikörper gebundene Probe durch Farbentwicklung detektiert. Diese Farbreaktion kann fotometrisch erfasst werden.

Für die Durchführung des ELISA's wurde hier ein Maus-Albumin-ELISA-Kit (Fa. Bethyl) verwendet. Alle verwendeten Materialien und Reagenzien wurden diesem Kit entnommen.

Vor der Durchführung wurden alle Urinproben per Teststreifen (Multistix, Fa. Bayer) untersucht. Abhängig von dem Eiweißgehalt der Proben wurden diese mit Sample Diluent unterschiedlich verdünnt, mindestens aber auf 1:100. Im ersten Schritt wurde die verwendete 96-Lochplatte mit dem bindenden Erstantikörper versetzt. Hierfür wurde der Antikörper (anti-Mausalbumin aus Ziege, Verdünnung 1:100) mit dem Bindungspuffer verdünnt, jeweils 100  $\mu\text{l}$  pro

Well pipettiert und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Mikrotiterplatte mit Waschlösung dreimal hintereinander abgewaschen. Es wurden 200 µl in jedes Loch pipettiert. Nach Abwaschen der nicht gebundenen Reste wurden alle nicht besetzten Bindungsstellen mit 200 µl Blocklösung in jedem Well behandelt und 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift. Im nächsten Schritt wurde die Standard-Reihe und die zu untersuchenden verdünnten Urinproben pipettiert, jeweils 100 µl pro Well in Doppelbestimmung, und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte wieder ein gründlicher Waschschrift, um das nicht gebundene Albumin zu entfernen. Anschließend wurde in jedes Well 100 µl des verdünnten zweiten Antikörpers (anti-Mausalbumin aus Ziege, Meerrettichperoxidase gekoppelt, Verdünnung 1:50000) hinzugegeben und ebenfalls 60 min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss erfolgte erneut ein gründlicher Waschschrift. Im letzten Schritt wurde das Enzymsubstratgemisch bestehend aus TMB-Lösung 1 und 2 hinzugegeben, jeweils 100 µl pro Well, um die gekoppelten Antikörper sichtbar machen zu können. Es folgte eine Inkubation von 15 min im Dunkeln. Die Meerrettichperoxidase setzte dieses Substrat um und es kam zu einer Farbreaktion. Durch Zugabe von 100 µl 2 M Schwefelsäure pro Well wurde diese Reaktion gestoppt. Die Auswertung erfolgte an einem ELISA-Lesegerät (Wellenlänge 450 nm).

### **3.3. Molekularbiologie**

#### **3.3.1. Isolierung von RNA**

Von dem entnommenen restlichen Mausnierengewebe wurde zunächst die Nierenrinde vom Mark mechanisch mit Skalpell und Pinzetten getrennt und zerkleinert. Die Nierenstücke wurden dann in einem Probengefäß mit 5 ml Puffer GIT und 35 µl 0,7% β-Mercaptoethanol versetzt. Der Puffer führt zur Lyse und Homogenisierung des Gewebes. Ein wichtiger Bestandteil des Puffers ist das stark denaturierend wirkende Guanidinisothiocyanat, das ebenfalls vorhandene RNasen sofort inhibiert. Die Gewebestücke wurden durch weiteres Behandeln in einem Douncer mithilfe von 50mal auf- und ab Bewegungen mit einem Pistill (Fa. Wheaton) zu einem homogenen Brei zerkleinert. Das so gewonnene Lysat wurde in ein Falcon Tube überführt und auf Eis unterm Abzug 45 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde zu dem Lysat 500 µl 2 Molarer

Natriumacetat Lösung, 1 ml Chloroform/Isomylalkohol und 5 ml Phenol einzeln hinzupipettiert, gut gemischt und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gemisch in RNase-freie Tubes überführt, mit Parafilm verschlossen und 20 min. bei 9500 rpm und 4°C in der Avanti J-20xP Zentrifuge (Fa. Beckman Coulter) zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bildeten sich zwei Phasen, in der oberen wässrigen Phase befand sich die RNA, die man vorsichtig bis ca. 0,5 cm oberhalb der Phasengrenze in ein neues RNase-freies Tube überführt hatte. Zu dieser abpipettierten Phase wurde das 1,3 fache Volumen eiskalten Isopropanols dazugegeben und gründlich gemischt. Diese Mischung mit dem Isopropanol wurde bis zur Ausfällung der RNA mindestens über Nacht bei -20°C stehen gelassen. Nach der Fällung der RNA wurde die Probe 45 min. bei 9500 rpm in einer Avanti J-20xP Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 0,5 ml abpipettiert und das Pellet mit 1 ml eiskaltem 80% Ethanol vom Rand abgespült. Das Pellet wurde in ein RNase-freies Eppendorf-Cup überführt, 10 min bei 12000 rpm in einer Tischzentrifuge (Fa. Eppendorf) bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 200-500 µl 80% Ethanol nachgewaschen. Zum Schluss erfolgte wieder eine Zentrifugation bei 12000 rpm 10 min lang. Der Wasch- und Zentrifugiervorgang wurde noch einmal wiederholt. Danach wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet für 5 min in der Speed Vac zentrifugiert, damit es trocken wird. Das Pellet wurde anschließend in DEPC-Wasser und RNase Inhibitor gelöst.

### **3.3.2. Bestimmung der RNA Konzentration**

Zur Überprüfung der Qualität und Quantifizierung der RNA wurde eine fotometrische Messung durchgeführt. Hierfür wurde die RNA mit RNase freiem Wasser 1:400 verdünnt. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion bei  $\lambda = 260$  nm und bei  $\lambda = 280$  nm. Der Quotient der Messung dient als Maß für die Reinheit der RNA. Dieser sollte zwischen 1,5 und 1,7 liegen. Ist die Präparation mit Protein, genomischer DNA und/oder aromatischen Substanzen kontaminiert spricht man von einer Verunreinigung. Es resultieren deutlich kleinere Werte für den Quotienten. Die Konzentrationen wurden aus der Extinktion nach der untenstehenden Formel errechnet:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = E \cdot 40 \cdot \text{Extinktion bei } 260 \text{ nm} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

### **3.3.3. Reverse Transkription (RT) von mRNA in cDNA**

Zur Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen aus mRNA mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) muss die zuvor gewonnene mRNA zunächst in komplementäre cDNA umgeschrieben werden. Dieser Schritt der reversen Transkription erfolgte mit Hilfe der Reversen Transkriptase aus dem Moloney-Murine-Leukemia-Virus (=MMLV-RT, Fa. Invitrogen), die die Aktivität einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase aufweist.

Im ersten Schritt wurde der gewonnenen RNA 2 µl DNase I DNA free zugesetzt um etwaige noch vorhandene DNA zu zerstören, denn das Vorhandensein von nativer DNA könnte ansonsten in der PCR zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Zu dem Gemisch wurden außerdem noch 24 µl Nuclease-Free Water und 3 µl 10x DNase Buffer dazugegeben und 30 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Nach der Inkubation wurden 5 µl DNase Inactivating Reagent zu allen Eppendorf-Cup's pipettiert, erneut 2 bis 3 min in Raumtemperatur inkubiert und 1 min bei 10000 rpm in der RT-Zentrifuge zentrifugiert. Zum Schluss wurden mit der 100 µl Pipettenspitze 30 µl RNA aus dem Gemisch in neue Eppendorf-Cup's pipettiert. Man muss sehr vorsichtig arbeiten, um nicht das Pellet zu berühren, da sich dort die DNA befindet.

Zur reversen Transkription wurde 7,5 µl verdaute RNA mit 1 µl Oligo dT und dNTPs versetzt und mit sterilem Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 12,5 µl gebracht. Oligo dT diente in diesem Ansatz als Primer für die Reaktion. Dieser Ansatz wurde 5 min auf 65°C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen, und anschließend für 5 min auf Eis heruntergekühlt. Dies verhinderte die Neubildung der RNA-Sekundärstruktur und ermöglichte die Hybridisierung der Primer. Der Ansatz wurde mit 4 µl 5x First-Strand Buffer (Fa. Invitrogen), 2 µl DTT (0,1 M Fa. Invitrogen), 1 µl Reverser Transkriptase und 0,5 µl des RNase-OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Fa. Invitrogen) versetzt. Die reverse Transkriptase arbeitete 50 min bei 37°C und wurde anschließend für 15 min bei 70°C hitzeinaktiviert.

### **3.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion folgt der reversen Transkription und amplifiziert logarithmisch spezifische DNA-Sequenzen aus der zuvor hergestellten cDNA. Durch die Entdeckung hitzestabiler DNA-Polymerasen, wie der Taq-DNA-

Polymerase von *Thermus aquaticus*, ist die Automatisierung dieses Vorgangs möglich geworden. In dieser Arbeit wurde zur Durchführung der PCR ein SYBR-Green-Mix verwendet (Fa. Sigma). In diesem Mix waren dNTP's, SYBR-Green-Farbstoff und die Taq-DNA-Polymerase enthalten.

Folgendes Protokoll wurde dafür verwendet:

1,5 µl cDNA

6,25 µl SYBR-Green

1,25 µl 0,9 µM Forward Primer

1,25 µl 0,9 µM Reverse Primer

2,25 µl H<sub>2</sub>O

Die Amplifizierung (Vervielfältigung) des gewünschten DNA-Abschnittes erfolgt durch die Wiederholung eines bestimmten Zyklusprofils. Ein Zyklus setzt sich aus folgenden Schritten zusammen. Zunächst erfolgt die Denaturierung der DNA durch Erhitzen auf 94°C für 40 s. Im nächsten Schritt erfolgt das Anlagern der Primeroligonukleotide an das 5'- und 3'-Ende der Template-DNA. Dieser Vorgang wird als Annealing bezeichnet. Je nach Annealingtemperatur des Primers wird die Temperatur auf 55°C bis 60°C gesenkt und für 40 s gehalten. Im Anschluss folgt die Elongation in der die Oligonukleotide durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTPs) verlängert werden. Diese Phase läuft bei 72°C für 40 s (etwa 60 s pro 1000 Nukleotide). Die DNA-Doppelstränge werden solange durch die DNA-Polymerase verlängert bis die DNA abfällt oder die Reaktion abgebrochen wird. Dieser Abbruch kann z.B. durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 95 °C erfolgen. Die Annealingtemperatur und die Zyklenzahl richteten sich nach dem jeweils verwendeten Primer.

Zum Ausschluss von Kontaminationen wurden pro PCR Ansatz eine Negativkontrolle, d.h. 11 µl PCR-Mastermix und 1,5 µl verdaut RNA, und eine Primerkontrolle, d.h. 11 µl PCR-Mastermix und 1,5 µl H<sub>2</sub>O, durchgeführt.

### **3.4. Proteinbiochemie**

#### **3.4.1. Gelshiftanalyse / Electrophoretic Mobility-Shift Assay (EMSA)**

Der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) ist eine Technik um DNA- oder RNA-bindende Protein-Interaktionen zu untersuchen und dient somit der Analyse von Transkriptionsfaktoren. Mit diesem Verfahren werden nicht nur die

Konzentrationen von Proteinen im Nukleus untersucht sondern auch die Fähigkeit dieser Proteine spezifisch an DNA zu binden und damit die Transkription zu beeinflussen. Dabei werden die Nukleoplasmaextrakte mit radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotiden gemischt. Diese Mischung wird mit Hilfe eines Polyacrylamidgeles elektrophoretisch aufgetrennt. Wegen des erhöhten Molekulargewichts des Oligonukleotides führt dessen Bindung zur verlangsamten Wanderung. Diese Bindung kann entsprechend dargestellt werden.

Durch Bindung von z.B. Wachstumsfaktoren und Zytokinen an ihre spezifischen Rezeptoren der Zelloberfläche wird eine koordinierte Kaskade der Signalweiterleitung in den Zellkern in Gang gesetzt. Die Transkriptionsfaktoren dienen in dieser Kaskade als terminale Empfänger und regulieren durch Modulation der Genexpression komplexe biologische Antworten.

In dieser Arbeit haben wir die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, AP-1 und C/EBP auf die Relevanz in der intrazellulären Aktivierung der Chemokine und Entzündungsmediatoren untersucht. Hierfür wurden in allen Tiergruppen die Tiere gepoolt. Exemplarisch werden in den Ergebnissen jeweils ein bis zwei Blots gezeigt. Eine aus den Ergebnissen resultierende Statistik ist wegen der gepoolten Versuchstiere nicht möglich gewesen.

Der erste untersuchte Transkriptionsfaktor war das NF-kappa B. NF- $\kappa$ B ist ein aus Dimeren bestehender Transkriptionsfaktor, der die Transkription einer Vielzahl von Genen induziert oder unterdrückt, indem er an bestimmte DNA-Elemente, die  $\kappa$ B-Sequenzen, in Promotoren bindet.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, das AP-1 (Activating protein-1), der an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt ist, wurde ebenfalls untersucht. Das AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der verschiedene Prozesse in einer Zelle reguliert. Er spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Differenzierung, Zellproliferation, Transformation und bei der Apoptose. AP-1 besteht aus Proteindimeren, die sich aus einer Kombination der verschiedenen Mitglieder der Jun-, Fos- und ATF (Activating transcription factor)- Proteinfamilien zusammensetzen. Die Familie der Jun-Proteine setzt sich zusammen aus c-Jun, JunB und JunD; die der Fos-Familie aus c-Fos, FosB, Fra1 und Fra2, und die der ATF-Familie aus ATF2, ATF3/LRF1, ATFa und B-ATF [4, 30, 40, 94]. Diese Untereinheiten binden an eine gemeinsame, spezifische DNA-Sequenz,

die sogenannte AP-1-Bindungsstelle. Somit werden abhängig vom Stimulus verschiedene Genexpressionen reguliert. Als Stimulus können Wachstumsfaktoren, Zytokine, bakterielle und virale Infektionen oder Stress wirken.

Der dritte untersuchte Transkriptionsfaktor ist das C/EBP (CCAAT/ enhancer-binding protein). Die C/EBP-Proteine gehören zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle im Metabolismus und bei der Differenzierung insbesondere von Hepatozyten, Adipozyten und myelomonozytären Zellen spielen [3, 66]. Die Mitglieder der C/EBP-Familie sind durch die basische Leucin-Zipper-Domäne an dem C-Terminus charakterisiert. Mithilfe der Leucin-Zipper-Struktur können die C/EBP-Moleküle Homo- und Heterodimere bilden und somit sowohl zwischen verschiedenen C/EBP-Proteinen als auch mit Transkriptionsfaktoren anderer Familien, z.B. mit NF- $\kappa$ B und AP-1, interagieren.

#### **3.4.1.1. Isolierung von nukleären Extrakten**

Für die Herstellung nukleärer Extrakte mussten die Puffer A und B hergestellt werden. Diese Arbeiten wurden alle auf Eis durchgeführt.

Von dem entnommenen restlichen Mausnierengewebe wurde zunächst die Nierenrinde vom Mark mechanisch mit Skalpell und Pinzetten getrennt und zerkleinert. Das Gewebe wurde in 1 ml Puffer A im Douncer homogenisiert, in Eppendorf-Cups überführt und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Zu dieser Suspension wurde 100  $\mu$ l 10% Nonidet P-40 (NP-40) dazugegeben, diese 10-15 sec. kräftig gemischt und sofort bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Gewebepellet wurde in 200-400  $\mu$ l Puffer B resuspendiert. Danach erfolgte die Inkubation für 15 bis 20 min bei 4°C auf einem Schüttelgerät. Nach der Inkubation wurde das Pellet erneut bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde als nukleärer Extrakt abgenommen und aliquotiert. Der Rest wurde dann im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### **3.4.1.2. Lowry Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung nach Lowry ist eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der Konzentration löslicher sowie unlöslicher Proteine [52].

Zunächst wurde eine Standardreihe hergestellt. Dafür hat man BSA in Protein-Lösungspuffer (Puffer B) von 10 mg/ml bis auf 0,625 mg/ml verdünnt. Als erstes wurden 5 µl von der Standardreihe (S1 bis S5) einfach in die Wells einer 96-Lochplatte pipettiert. In das 6 Well wurde als Blank (Nullwert) nur 5 µl von dem Protein-Lösungspuffer (Puffer B) pipettiert und in die übrigen Wells 5 µl von den zu messenden Proteinen in Doppelbestimmung. In jedes Well wurde als erstes 25 µl Reagenz A (Fa. Bio-Rad DC Protein Assay) dazugegeben und dann jeweils 200 µl Reagenz B (Fa. Bio-Rad DC Protein Assay). Die 96-Lochplatte wurde ungefähr 10 min bei Raumtemperatur inkubiert bis es zu einer gleichmäßigen Blaufärbung gekommen ist. Diese Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt, die im ELISA-Reader bei 550 nm gemessen wurde.

Danach erfolgte die Verdünnung der Kernproteine auf die Hälfte der einzusetzenden Gesamtmenge pro Mikroliter.

#### **3.4.1.3. Labeling der Sonde**

Als Oligonukleotide wurden NF-κB (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'), AP-1 (5'-CGCTTG ATGAGTCAGCCGGAA-3') (beide Fa. Promega) und C/EBP (5'-TGCAGATTGCGCAATCTGCA-3') (Fa. Santa Cruz) Konsensus-Sequenzen verwendet. Diese wurden jeweils am 5'-Ende durch die T4-Polynukleotid-Kinase (Fa. Promega) mit  $\{^{32}\text{P}\}$  γ dATP (Fa. Amersham) radioaktiv markiert. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei 37°C. Die T4-Polynukleotidkinase wurde bei 70°C im Wasserbad für 10 min inaktiviert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der markierten Oligonukleotide über Spin Columns G-50 Säulen (Fa. Amersham). Die spezifische Sondenaktivität wurde im β-Counter im 32-P-Kanal für 1 min gemessen.

#### **3.4.1.4. Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Zunächst musste ein Mastermix für Shiftansätze angesetzt werden.

Einfachansatz:

2 µl Poly(dI-dC) (Fa. Amersham)

4 µl 5x Binding Buffer

x µl Aqua dest. ad 18 µl

100000 cpm  $\{^{32}\text{P}\}$ -Sonde pro Probe

Es wurden 2 µl der entsprechenden Kernprotein-Verdünnung (= 10 g Protein) in Eppendorf-Cups vorgelegt und dazu 18 µl des Shift-Mastermixes im Isotopenlabor dazugegeben.

Die Inkubationszeit lag bei 30 min bei Raumtemperatur. Währenddessen erfolgte der Gel-Vorlauf bei 200 V 30 min lang. Das fertiggestellte 4 % Polyacrylamid-Gel wurde anschließend beladen. Die Elektrophorese lief ~2 h bei 200/250 V mit 1x Tris-Borat-EDTA Puffer (TBE). Das Gel wurde unter dem Abzug auf der Gelträgerfolie GelBond PAG Film (Fa. Biozym) über Nacht luftgetrocknet und anschließend mit Röntgenfilm (Fa. Fujifilm) exponiert. Sind nukleäre Proteine gebunden, lassen sich retardierte DNA/Protein Komplexe in der Autoradiographie nachweisen.

#### **3.4.1.5. Supershift**

Zum Nachweis einer spezifischen Interaktion von z.B. p50-Untereinheit des NF-κB-Transkriptionsfaktors mit der Bindungsstelle wurde ein Supershift mit einem Antikörper gegen die Untereinheit dieses Transkriptionsfaktors durchgeführt. Hierzu wurden die Proben wie unter 3.4.1.4 zusammen pipettiert, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend ~800 ng bis 4 µg des Antikörpers (Fa. Santa Cruz) dazugegeben. Die Ansätze wurden dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte dann die Elektrophorese.

### **3.5. Histologie**

#### **3.5.1. Allgemeines**

Zur Untersuchung von Gewebeschnitten der Versuchs- und Kontrolltiere wurden histologische Färbungen angefertigt. Die Einbettung der Gewebeproben und Anfertigung der Schnitte wurden von Frau Dr. C. Meyer-Schwesinger, Frau Mariola Reschka und Frau Melanie Schaper durchgeführt.

##### **3.5.1.1. Probenvorbereitung**

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden zunächst auf Objektträger (Fa. Menzel) gelegt und über Nacht bei 40°C im Wärmeschrank (Fa. Heraeus) gebacken. Dies diente der besseren Anheftung der Schnitte. Nach kurzer Abkühlungsphase bei Raumtemperatur erfolgte die Deparaffinisierung im Xylolbad (Fa. Riedel de Haen) für dreimal 5 min. Danach wurden die Schnitte

im abfallend konzentrierten Ethanolbad zweimal für je 5 min in 100%, 96% und 70% Ethanol (Fa. Th. Geyer) gewaschen. Anschließend erfolgte die Rehydrierung in Leitungswasser. Im Anschluss erfolgten die eigentlichen Färbungen nach dem jeweiligen Protokoll.

#### **3.5.1.2. Auswertung**

Die Auswertung der Färbungen erfolgte an einem Mikroskop (Axioskop Fa. Zeiss) und die Dokumentation mit einer am Mikroskop angeschlossenen Kamera (Axiocam Fa. Zeiss).

#### **3.5.2. PAS-Färbung**

Die PAS-Färbung gehört zu den Standardfärbungen und diente hier zur morphologischen Beurteilung des Nierengewebes. Es kommt dabei zur Anfärbung von Glykogen, neutralen Mucopolysacchariden, Muco- und Glykoproteinen.

Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden 1 min in 1% Periodsäure (Fa. Merck) gegeben. Danach wurden sie für 2 bis 3 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und mit Aqua dest. gespült, bis sie dann für 40 min in Schiff'sches Reagenz (Fa. Sigma) gegeben wurden. Um die überschüssige fuchsinschwefelige Säure zu entfernen wurden die Schnitte erneut unter fließendem Leitungswasser und in Aqua dest. gewaschen. Anschließend erfolgte für 5 bis 10 min die Hämatoxylin nach Gill Färbung. Nach Abwaschen der Rückstände wurden die Schnitte mit Deckgläsern (Fa. Menzel) eingedeckt und unterm Mikroskop kontrolliert.

##### **3.5.2.1. Glomerulosklerose-Index**

Der Glomerulosklerose-Index wurde mithilfe der PAS-Färbung bestimmt. Anhand des Glomerulosklerose-Index kann das Ausmaß der Schädigung des Glomerulums in Form einer Vermehrung der mesangialen Matrix und der Mesangiumzellen quantifiziert werden. Es wurden insgesamt 20 Glomeruli pro Schnitt und Niere unter einem Lichtmikroskop mäanderförmig umfahren und in 40-facher Vergrößerung nach glomerulosklerotischen Veränderungen untersucht. Der Grad der Glomerulosklerose wurde nach der Methode von el

Nahas et al [21] beurteilt, der die Schädigung der Glomeruli in 5 verschiedene Stadien unterteilte (Tab. 1).

Tab. 1: Stadieneinteilung der Glomerulosklerose

Stadium	Histologische Veränderungen	Anteil der Veränderungen am Konvolut
0	Normales Glomerulum	0%
1	Mesangiale Verdickung mit und ohne Proliferation von Mesangiumzellen. Keine Kapillarbeteiligung	≤25%
2	Mesangiale Proliferation mit partieller Gefäßwandbeteiligung. Segmentale Sklerose	≤50%
3	Große Teile der Kapillaren sind durch mesangiale Proliferation oder Narbenformation obliteriert, diffuse Sklerose	≤75%
4	Totale Obliteration der Kapillaren mit oder ohne Kapillarthrombose, globale Sklerose mit Kapillarkollaps	≤100%

Mithilfe der unten stehenden Formel konnte der Glomerulosklerose-Index (GSI) pro Niere berechnet werden.

$$GSI = \frac{(0 \times nx0) + (1 \times nx1) + (2 \times nx2) + (3 \times nx3) + (4 \times nx4)}{n (=20)}$$

nx0 - nx4 stehen für die Anzahl der Glomeruli in den Stadien 0 bis 4

### 3.5.3. Kollagen Typ IV-Färbung

Die Färbung diente der Darstellung von Kollagen Typ IV der Basalmembran. Typisch ist eine vermehrte Kollagen IV Bildung bei sklerotischen Umbauprozessen in der Niere. Zum Permeabilisieren des Gewebes wurden die Schnitte in Protease 24 Lösung für 15 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Proteasereaktion wurde mit 100% Ethanol gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für 5 min mit Aqua dest. gewaschen und mit Blockpuffer (1:20 Pferdeserum in PBS) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Ziege anti-Kollagen IV, Fa. Biotrend) erfolgte über Nacht bei 4°C in einer Konzentration von 1:600 in Blockpuffer. Am nächsten Morgen wurden die Gewebeschnitte dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper

(biotinylierter donkey anti-goat) in einer Konzentration von 1:200 für 30 min bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit PBS wurden die Schnitte mit dem vorbereiteten 1:100 konzentrierten Streptavidin-Biotin-Komplex versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben in ein Neufuchsinbad gegeben und bis zum Erreichen der gewünschten Färbung im Dunkeln entwickelt. Die Farbentwicklung wurde gelegentlich unter dem Mikroskop kontrolliert. Danach wurden die Schnitte nach Böhmer gegengefärbt, mit Fluoromount eingedeckt und bei Raumtemperatur trocken gelassen.

### **3.5.3.1. Kollagen Typ IV-Auswertung**

Die Kollagen Typ IV-Expression wurde ähnlich dem Glomerulosklerose-Index bestimmt. Die Paraffinschnitte wurden mäanderförmig durchfahren und 30 Glomeruli bei 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Der Anteil des positiv gefärbten Flächenanteils pro Glomerulum wurde mit Hilfe eines semiquantitativen Scores ermittelt. Je nach Ausmaß der Kollagen Typ IV-Ablagerungen wurde jedem Glomerulum ein Wert zwischen 0 und 4 zugewiesen. Dabei steht 0 für keine Kollagen Typ IV-Ablagerung, 1 für 25% des positiv gefärbten Flächenanteils pro Glomerulum, 2 für 50% und 3 für 75%. Eine 100% Kollagen Typ IV-Ablagerung wurde durch die Zahl 4 repräsentiert.

Mithilfe der untenstehenden Formel konnte die Kollagen Typ IV-Expression (Koll.IV-Expr.) berechnet werden.

$$(\text{Koll.IV-Expr.}) = \frac{(0 \times nx0) + (1 \times nx1) + (2 \times nx2) + (3 \times nx3) + (4 \times nx4)}{n (=30)}$$

nx0 - nx4 stehen für die Anzahl der Glomeruli in den Stadien 0 bis 4

### **3.5.4. F4/80-Färbung**

Die F4/80-Färbung diente der Darstellung der Monozyten und Makrophagen im Nierengewebe. Der verwendete Antikörper MCAP497 (Fa. Serotec) erkennt das Maus F4/80-Antigen, ein 160 kD Glykoprotein, welches auf murinen Makrophagen exprimiert wird. Der Antikörper bindet an Makrophagen unterschiedlicher Herkunft wie aus der Peritonealhöhle, Lunge, Milz, Thymus

und Blutmonozyten. Das Antigen wird nicht von Lymphozyten oder polymorphnukleären Zellen exprimiert.

Zunächst wurden die Gewebeproben dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 0,05% Trypsin-EDTA (Fa. Gibco) bei 37°C für 10 min. Um die Trypsinreaktion zu stoppen wurden die Schnitte kurz in 100% Ethanol getaucht und mit fließendem Wasser gespült. Danach folgte ein dreimaliger Waschschrift mit TBS für je 5 min. Anschließend wurden die Schnitte in Blockpuffer (2% Pferdeserum, 1% BSA, 0,1% Fischgelantine, 0,1% Triton X-100, 0,05% Tween 20 in TBS) für 30 min in Raumtemperatur zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Ratten Anti-Maus F4/80 (BM8) Antikörper, Fa. Biomedical) erfolgte bei 4°C über Nacht in einer Konzentration von 1:300 in Antikörperpuffer (5% Pferdeserum in TBS). Nach dreimaligem Abwaschen der nicht gebundenen Reste mit TBS für je 5 min erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (biotinylierter Esel Anti-Ratten Antikörper, Fa. Jackson) in TBS in einer Konzentration von 1:200 für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte wieder ein dreimaliger Waschschrift je 5 min mit TBS der nicht gebundenen Reste des sekundären Antikörpers. Danach wurden die Gewebeschnitte mit dem vorbereiteten Streptavidin-Biotin-Complex für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschschrift der Gewebeschnitte mit TBS wurden die Objektträger in Neufuchsinlösung im Dunkeln farentwickelt. Die Reaktion wurde nach ausreichender Färbung in Aqua dest. gestoppt. Bevor die Gewebeschnitte mit Fluoromount-G (Fa. Southern Biotechnology) eingedeckt wurden erfolgte die Kernfärbung nach Böhmer für 90 s. Unter dem Mikroskop zeigten sich die Zellkerne blau sowie membranöse und zytoplasmatische Färbung vereinzelter Makrophagen rot.

#### **3.5.4.1. Auswertung der F4/80- positiven Zellen**

Für die Bestimmung von F4/80- positiven Zellen wurde der komplette Paraffinschnitt der Niere pro Tier untersucht. Es wurden alle F4/80- positiven Zellen sowohl glomerulär als auch interstitiell bei 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop gezählt. Die Summe der Zellen pro Mausgruppe (wt, p50 oder EP<sub>2</sub>) und Zeitpunkt nach Ablation (Kontrolle, 3 und 6 Monate) wurde anschließend in einem Diagramm dargestellt.

## **4. Ergebnisse**

Hier werden die Ergebnisse von drei Tierversuchsreihen an drei genetisch verschiedenen Tierarten (wt-, p50- und EP<sub>2</sub>-Tiere) dargestellt. In jeder (Operation) der Versuchsreihe wurden die Tiere abhängig vom Zeitpunkt der 5/6-tel Nephrektomie zu drei Zeit-Gruppen untersucht (Kontrolle, nach 3 und 6 Monaten). Bei den Kontrolltieren erfolgte die Organentnahme nur am Tag 1. Alle Versuchsreihen wurden nach gleichem Schema und zu vergleichbaren Zeiträumen untersucht.

### **4.1. Tabellarische Zusammenstellung der Basisdaten**

Die Tabellen zeigen eine Übersicht über die Basisdaten der Versuchstiere zu drei verschiedenen Zeitpunkten der 5/6-tel Nephrektomie (Tag 1 (Kontrolltiere), 3 und 6 Monate nach Ablation). Serum-Kreatinin und Serum-Harnstoff wurden zum Zeitpunkt der Organentnahme bestimmt. Die Retentionsparameter sind nach Ablation über den Verlauf von 6 Monaten signifikant angestiegen. Dies spricht für eine zunehmende Niereninsuffizienz der Versuchstiere nach Ablation.

Tab. 2: Basisinformationen zu den **wt-Tieren** in der Kontrolle, 3 und 6 Monate nach Ablation

\*  $p < 0,01$  vs wt-Kontrolle

	Körpergewicht (g)	Gesamt-Nierengewicht (g)	Relatives Nierengewicht $10^3$	Gesamt-Herzgewicht (g)	Relatives Herzgewicht $10^3$	Serum Kreatinin (mg/dl)	Serum Harnstoff (mg/dl)
wt Kontrolle	25±1	0,35±0,03	13,86±0,66	0,14±0,01	5,65±0,46	0,15±0,06	28,3±2,7
wt Ablation 3 Monate	29±4	0,17±0,03	6,03±1,07	0,19±0,03	6,60±1,38	0,34±0,06*	56,4±17,2*
wt Ablation 6 Monate	33±2	0,24±0,03	7,22±1,15	0,26±0,05	7,80±1,62	0,36±0,14*	75,7±26,7*

Tab. 3: Basisinformationen zu den **p50-Tieren** in der Kontrolle, 3 und 6 Monate nach Ablation

\*  $p < 0,05$  vs p50-Kontrolle

	Körpergewicht (g)	Gesamt-Nierengewicht (g)	Relatives Nierengewicht $10^3$	Gesamt-Herzgewicht (g)	Relatives Herzgewicht $10^3$	Serum Kreatinin (mg/dl)	Serum Harnstoff (mg/dl)
p50 Kontrolle	27±4	0,37±0,04	13,89±2,11	0,15±0,02	5,51±0,47	0,16±0,04	16,7±5,4
p50 Ablation 3 Monate	27±3	0,24±0,03	9,02±0,96	0,19±0,04	7,13±1,72	0,25±0,11*	66,9±35,2*
p50 Ablation 6 Monate	27±3	0,28±0,05	10,18±1,32	0,26±0,08	9,49±3,29	0,22±0,11*	85,7±74,4*

Tab. 4: Basisinformationen zu den EP<sub>2</sub>-Tieren in der Kontrolle, 3 und 6 Monate nach Ablation

\*p<0,01 vs EP<sub>2</sub>-Kontrolle

	Körpergewicht (g)	Gesamt-Nierengewicht (g)	Relatives Nierengewicht 10 <sup>3</sup>	Gesamt-Herzgewicht (g)	Relatives Herzgewicht 10 <sup>3</sup>	Serum Kreatinin (mg/dl)	Serum Harnstoff (mg/dl)
EP <sub>2</sub> Kontrolle	34±2	0,49±0,04	14,50±0,92	0,20±0,03	6,05±0,66	0,16±0,03	27,7±8,0
EP <sub>2</sub> Ablation 3 Monate	32±5	0,19±0,03	6,05±1,06	0,21±0,05	6,50±1,30	0,37±0,09*	62,7±15,2*
EP <sub>2</sub> Ablation 6 Monate	29±3	0,25±0,10	8,74±4,40	0,23±0,05	7,98±1,78	0,31±0,07*	67,0±17,7*

Tab. 5: Retentionsparameter von allen Versuchstieren in der Kontrolle, 3 und 6 Monate nach Ablation

	wt Serum Kreatinin (mg/dl)	wt Serum Harnstoff (mg/dl)	p50 Serum Kreatinin (mg/dl)	p50 Serum Harnstoff (mg/dl)	EP <sub>2</sub> Serum Kreatinin (mg/dl)	EP <sub>2</sub> Serum Harnstoff (mg/dl)
Kontrolle	0,15±0,06	28,3±2,7	0,16±0,04	16,7±5,4	0,16±0,03	27,7±8,0
3 Monate	0,34±0,06	56,4±17,2	0,25±0,11	66,9±35,2	0,37±0,09	62,7±15,2
6 Monate	0,36±0,14	75,7±26,7	0,22±0,11	85,7±74,4	0,31±0,07	67,0±17,7

## **4.2. Ergebnisse der Urinuntersuchungen**

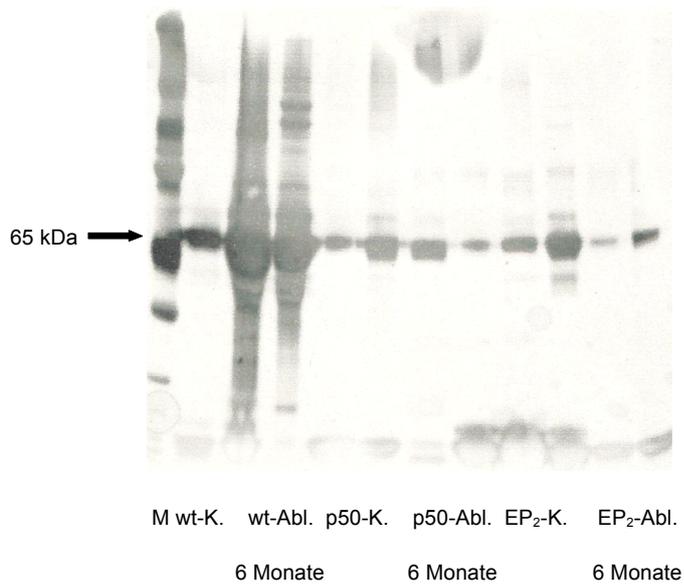
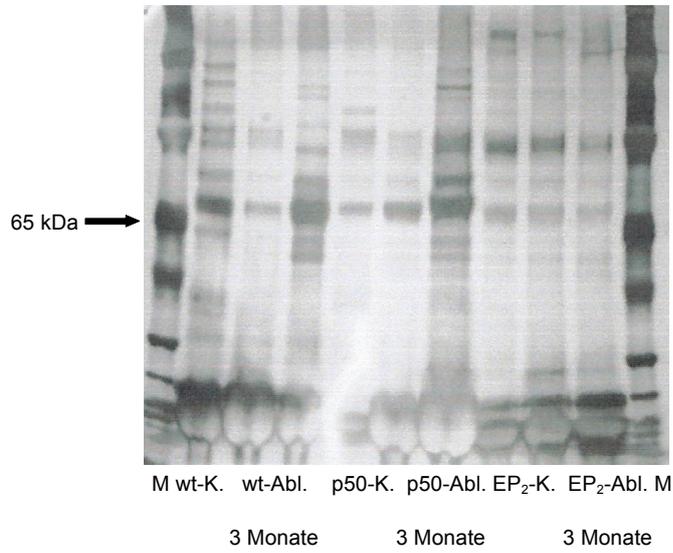
Die Proteinurie ist das Hauptsymptom bei Nierenerkrankungen und meist ein Zeichen einer glomerulären Schädigung. Mithilfe der Filtrations- und Rückresorptionsmechanismen der gesunden Niere wird nur eine geringe Menge Proteine im normalen Urin ausgeschieden. Bei einer Störung im Glomerulus kommt es zu einem durchlässigeren Filter mit Folge der Überschreitung der Resorptionskapazität im Tubulus.

Die Ausscheidung von Albumin im Urin wurde in dieser Arbeit als Marker für den verursachten Nierenschaden nach Ablation untersucht.

### **4.2.1. Qualitative Untersuchungen**

Die im Urin enthaltenen Proteine wurden per SDS-PAGE getrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Eine deutliche Bande bei ca. 66 kDa entspricht einer starken Albuminurie. Um die enthaltene Albuminmenge in den Urinen der Versuchstiere abschätzen zu können erfolgte ein Vergleich zwischen den silbergefärbten Uringelen der Ablationstiere und einem Gel, das mit bekannten Mengen Albumin beladen wurde. Die Tiere mit der stärksten Proteinurie enthielten ca. 100 µg Albumin.

Wie in der Abbildung 3 a und b zu sehen konnte man eine Proteinurie bei den Versuchstieren nach Ablation deutlich erkennen. 3 Monate nach Ablation kam es zu einer geringgradigen Proteinurie, 6 Monate nach Ablation zeigte sich die höchste Menge von Albumin im Urin. Bei einigen Tieren konnte man jedoch eine Abnahme der Albuminausscheidung 6 Monate nach Ablation erkennen, insbesondere bei den EP<sub>2</sub>-Mäusen (Abb. 3a). Trotzdem war die Proteinurie noch deutlich erhöht gegenüber den Kontrolltieren. Die verschiedenen Gruppen der Ablationstiere zeigten diese Zunahme der Proteinurie und spätere Abnahme in unterschiedlicher Deutlichkeit. Am stärksten ausgeprägt schien die Proteinurie bei den wt-Mäusen 6 Monate nach Ablation. Eine Proteinurie konnte bei den Kontrolltieren zwar auch dargestellt werden, jedoch deutlich geringer als bei den ablatierten Tieren.



*Abb. 3 a und b: Proteinausscheidungen im Urin der Kontroll- und Ablationstiere 3 und 6 Monate nach Ablation. Die SDS-Gele sind mittels Silberfärbung gefärbt. Der Pfeil weist auf die Höhe der Bande hin, die das im Urin enthaltene Albumin darstellt. Das Maximum der Albuminurie zeigte sich bei den wt-Mäusen 6 Monate nach Ablation. M = Marker*

#### **4.2.2. Quantitative Untersuchungen**

Die in der Silberfärbung dargestellte Albuminurie wurde mittels Albumin-ELISA aus den Urinen von allen Versuchstieren quantifiziert.

Es wurde die Albuminkonzentration/Kreatinin in mg/dl im Urin aller Versuchstiere gemessen. Die einzelnen Werte sind nach Zeitpunkten nach Ablation (Kontrolle, 3 und 6 Monate) in der Tabelle 6 zu sehen.

In dieser Untersuchung konnte ein deutlicher Unterschied in der Albuminausscheidung zwischen den Kontroll- und Ablationstieren gesehen werden. Allerdings gab es eine sehr große Streubreite bzw. sehr große Unterschiede in den maximal gemessenen Werten (Faktor 1000). Konzentrierte Urine mussten teilweise bis 100.000-fach verdünnt werden, so dass Messfehler möglicherweise noch zusätzlich verstärkt wurden.

Der Verlauf der Albuminurie bei den Kontroll- und Ablationstieren ist in Abbildung 4 aufgezeichnet. Es zeigte sich eine deutliche, aber statistisch nicht signifikante Zunahme der Albuminurie bei den Versuchstieren 6 Monate nach Ablation gegenüber den Kontrolltieren. Die höchste Albuminausscheidung konnte bei den p50-knockout-Mäusen sowohl 3 als auch 6 Monate nach Ablation gemessen werden. Die EP<sub>2</sub>-knockout-Mäuse hatten eine niedrigere Albuminurie im Vergleich zu den wt- und p50-knockout-Mäusen. Alle abladierten Tiere hatten gegenüber den Kontrolltieren eine höhere Albuminurie.

Tab. 6: Albuminkonzentration/Kreatinin in mg/dl im Urin von allen Versuchstieren in der Kontrolle, 3 und 6 Monate nach Ablation

wt-Mäuse			p50-Mäuse			EP <sub>2</sub> -Mäuse		
Kontrolle	3 Monate	6 Monate	Kontrolle	3 Monate	6 Monate	Kontrolle	3 Monate	6 Monate
		0,09						
		0,08						8,59
		0,56			0,18			0,03
		0,25			0,16			0,07
		0,93			2,70		0,09	0,19
	0,15	0,62		0,05	0,58		0,02	3,83
	0,12	0,41		47,47	0,10		0,07	0,06
	2,32	0,16		0,12	0,15		0,07	0,20
2,77	0,07	0,33	0,16	0,25	0,29		0,06	0,04
0,19	0,14	0,08	0,24	0,22	82,69	0,26	0,09	0,04
0,22	3,58	0,11	0,85	0,17	0,69	0,61	0,06	0,12
0,38	0,09	0,31	0,18	1,74	0,37	0,13	1,87	0,05
2,43	0,08	54,36	0,42	3,82	10,70	0,28	0,28	0,71
<b>1,20±1,29</b>	<b>0,82±1,36</b>	<b>4,49±14,9</b>	<b>0,37±0,29</b>	<b>6,73±16,5</b>	<b>8,96±24,7</b>	<b>0,32±0,21</b>	<b>0,29±0,60</b>	<b>1,16±2,57</b>

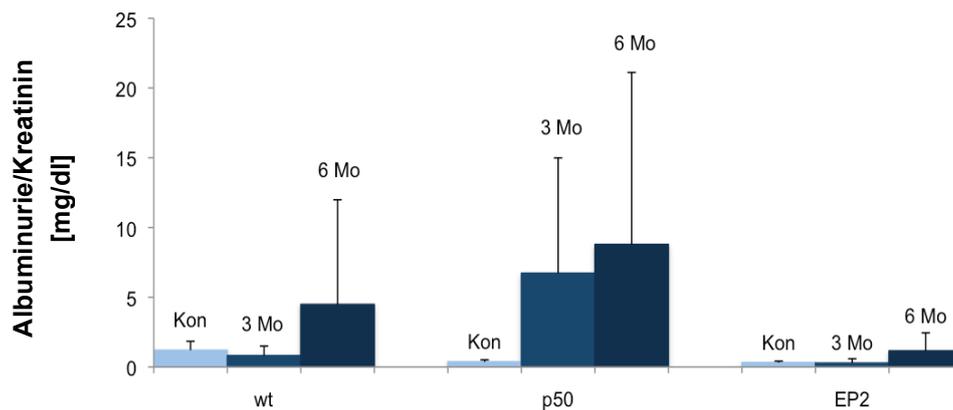


Abb. 4: Graphische Darstellung der im Albumin-ELISA ermittelten Daten. Die Albuminkonzentration/Kreatinin im Urin ist im Verhältnis zu den Zeitpunkten nach Ablation der Tiere dargestellt.

### 4.3. Ergebnisse der Real-Time-PCR

Die renale Expression der mRNA von Kontroll- und Ablationstieren wurde mithilfe der Real-Time-PCR (RT-PCR) auf eventuelle Unterschiede in jeder Versuchsreihe untersucht. Es wurden mögliche Veränderungen in der Expression der mRNA von inflammatorisch wirksamen Proteinen, den Chemokinen (RANTES, MCP-1 und IP-10), außerdem von einem Strukturprotein (Kollagen Typ IV), und einem Wachstumsfaktor (TGF- $\beta$ ), der auch die Kollagensynthese aktivieren kann, überprüft.

Die für inflammatorisch wirksame Proteine kodierende RNA wurde untersucht, um Hinweise auf ein eventuelles Entzündungsgeschehen zu erhalten. Die Expression der Chemokine RANTES, MCP-1 und IP-10 (CCL5, CCL2 und CXCL-10) konnte bei allen Ablationstieren in unterschiedlicher Konzentration gemessen werden (Abb. 5-7).

Die wt-Mäuse hatten 6 Monate nach renaler Ablation eine erhöhte Expression von allen Chemokinen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei p50-knockout- und EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen war die Expression der Chemokine bereits 3 Monate nach renaler Ablation erhöht, nach 6 Monaten war die Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe nur noch gering gesteigert (Abb. 5-7). Die Zeitkinetik erscheint bei den p50- und EP<sub>2</sub>-knockout-Tieren somit etwas verändert mit einer relativ früheren maximalen Expression der Chemokine. Zudem hatten die p50-knockout-Mäuse im Vergleich zu den wt- und EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen eine eher geringere Expression der Chemokine in der RT-PCR.

Der direkte Vergleich der relativen Chemokinexpression von knockout-Tieren im Vergleich zu wildtyp-Mausstämmen zu den drei untersuchten Zeitpunkten zeigte gesteigerte Expressionen insbesondere bei den p50-knockout-Mäusen bereits bei den Kontrolltieren (Abb. 8-10), besonders aber nach 3 Monaten. 6 Monate nach Ablation waren die Unterschiede zwischen wt-Mäusen und knockout-Mäusen nicht mehr so groß (Abb. 8-10).

Bei den EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen kam es insbesondere zu einer erhöhten mRNA-Expression von RANTES 3 Monate nach Ablation im Vergleich zu den wt-Mäusen (Abb. 8). Die Expression von MCP-1 und IP-10 war zwischen den wt-Mäusen und EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 9-10). Die mRNA-Expression des Strukturproteins Kollagen Typ IV nahm über den Beobachtungszeitraum von 6 Monaten in allen drei Gruppen in ähnlicher Weise

zu (Abb. 11). Auch die mRNA-Expression des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  nahm im Verlauf der Ablation sowohl bei den wt-Mäusen als auch bei den knockout-Mäusen (p50 und EP<sub>2</sub>) vergleichbar zu (Abb. 12).

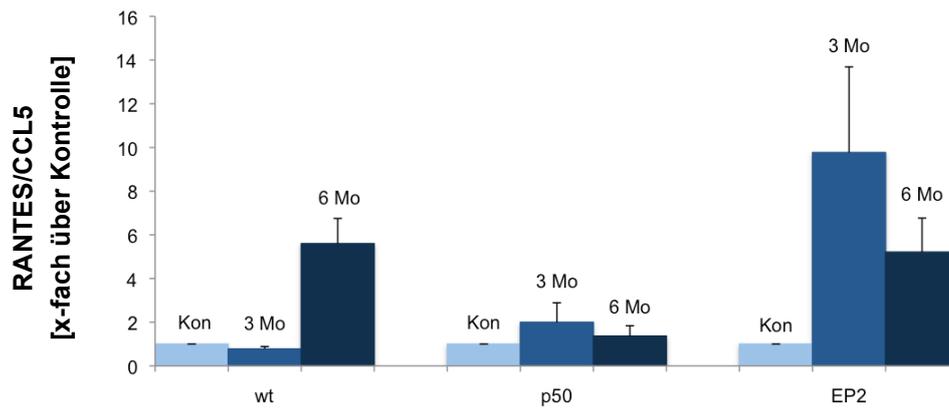


Abb. 5: RANTES-mRNA-Expression in der Niere bei den Kontroll- und Ablationstieren

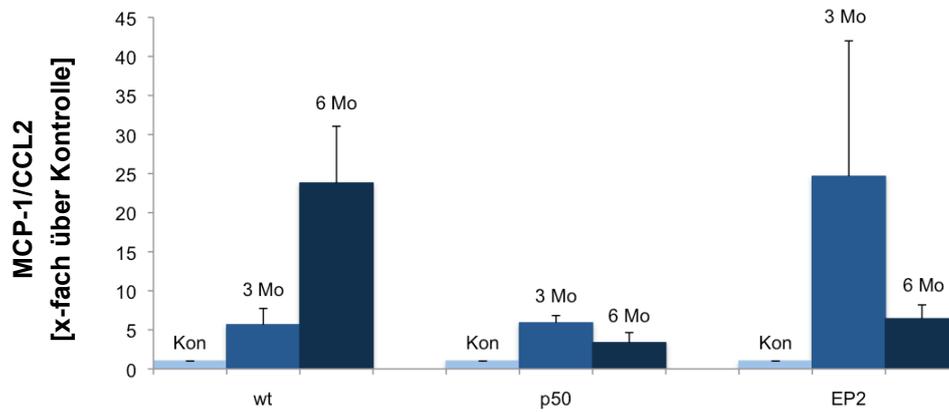


Abb. 6: MCP-1-mRNA-Expression in der Niere bei den Kontroll- und Ablationstieren

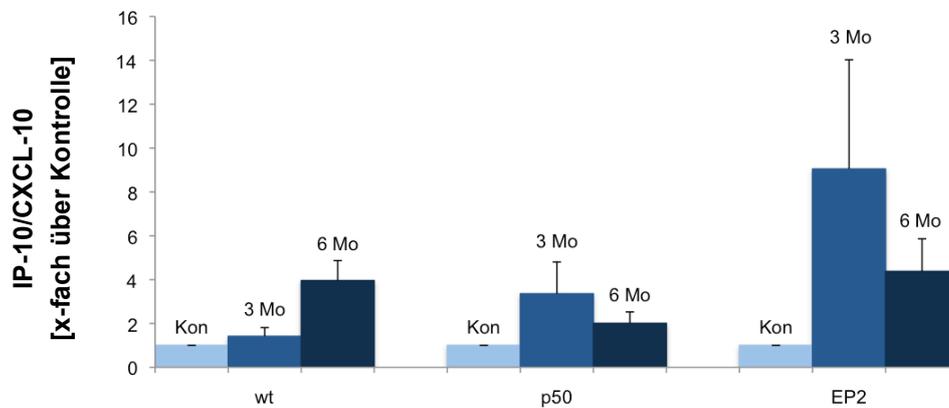


Abb. 7: IP-10-mRNA-Expression in der Niere bei den Kontroll- und Ablationstieren

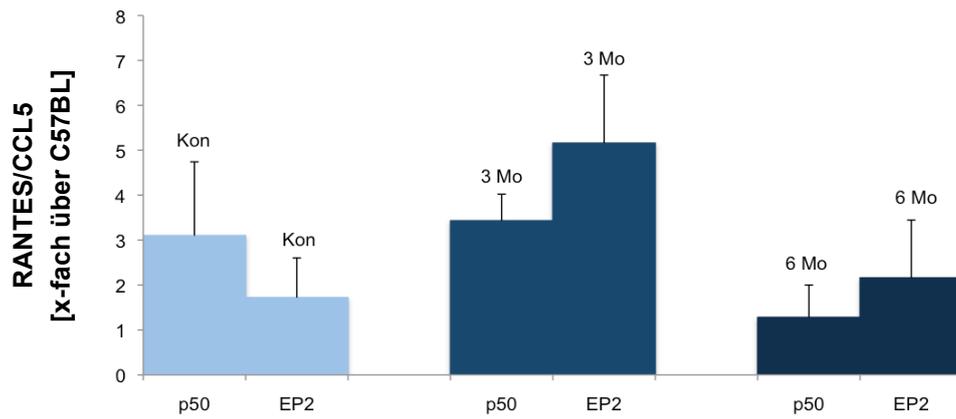


Abb. 8: RANTES-mRNA-Expression in der Niere bei den p50- und EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen im Vergleich zu den wt-Mäusen in der Kontrolle sowie 3 und 6 Monate nach Ablation

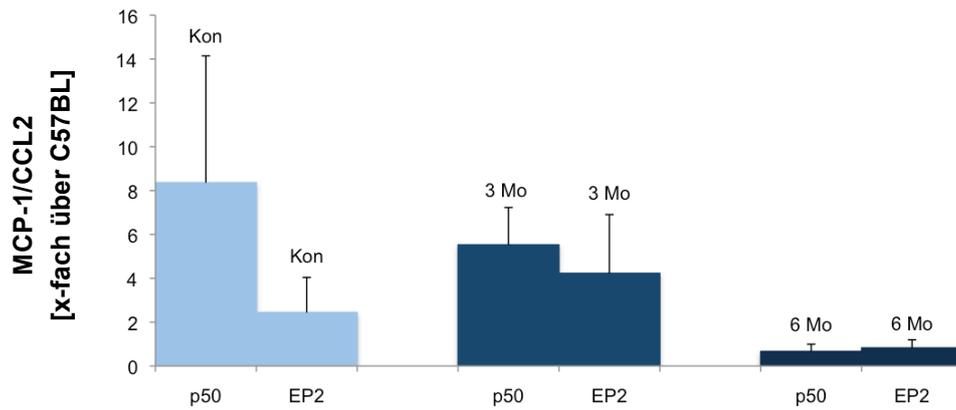


Abb. 9: MCP-1-mRNA-Expression in der Niere bei den p50- und EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen im Vergleich zu den wt-Mäusen in der Kontrolle sowie 3 und 6 Monate nach Ablation

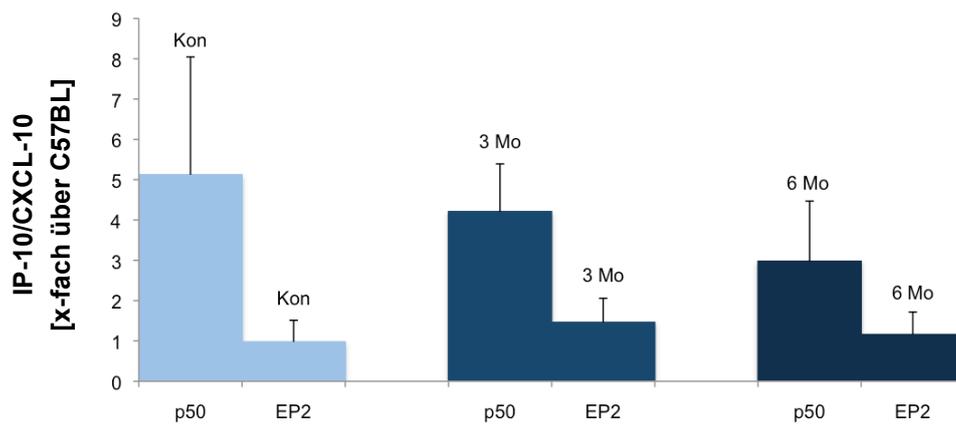


Abb. 10: IP-10-mRNA-Expression in der Niere bei den p50- und EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen im Vergleich zu den wt-Mäusen in der Kontrolle sowie 3 und 6 Monate nach Ablation

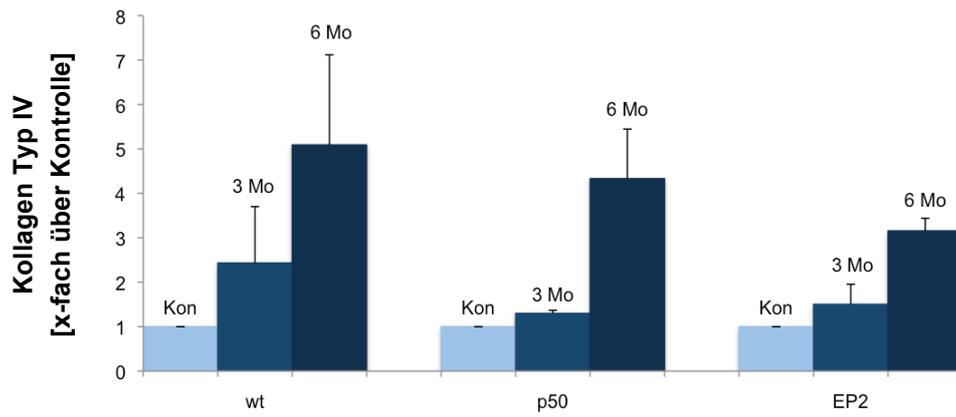


Abb. 11: Kollagen Typ IV-mRNA-Expression in der Niere bei den Kontroll- und Ablationstieren

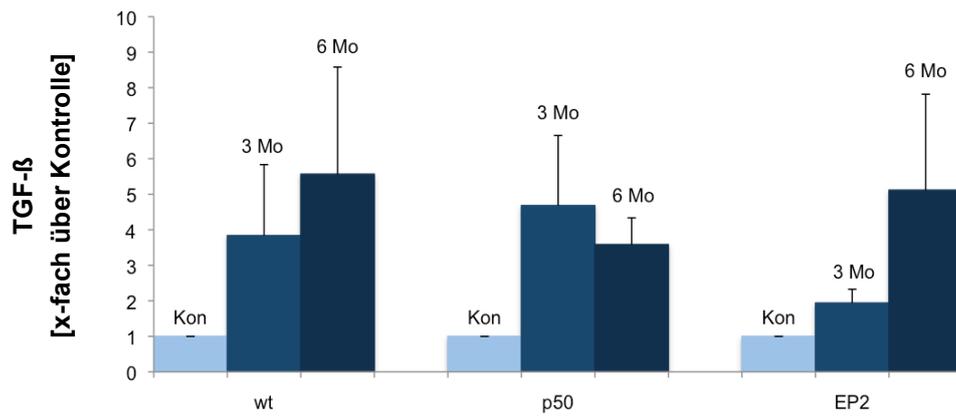


Abb. 12: TGF-β-mRNA-Expression in der Niere bei den Kontroll- und Ablationstieren

#### 4.4. Ergebnisse der EMSA-Untersuchungen

Die Gel-shift-Untersuchungen nukleärer Proteine aus den Mausnieren zeigten 6 Monate nach Ablation eine deutliche NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität bei den wt-Mäusen und EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen. Eine Bindungsaktivität bei den p50-knockout-Mäusen konnte, dem knockout des Gens entsprechend, nicht nachgewiesen werden (Abb. 13).

Es konnte keine gesteigerte Bindungsaktivität von AP-1 in allen drei untersuchten Gruppen gesehen werden (Abb. 14).

Die Bindungsaktivität von C/EBP konnte hier bei allen Versuchstieren 3 und 6 Monate nach Ablation in unterschiedlicher Intensität nachgewiesen werden (Abb. 15). Insbesondere bei den wt-Mäusen zeigte sich eine hohe Bindungsaktivität von C/EBP. Bei den p50-knockout-Mäusen war die C/EBP-Bindungsaktivität 3 Monate nach Ablation höher als nach 6 Monaten, bei den EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen wiederum war eine höhere Aktivierung nach 6 Monaten zu sehen.

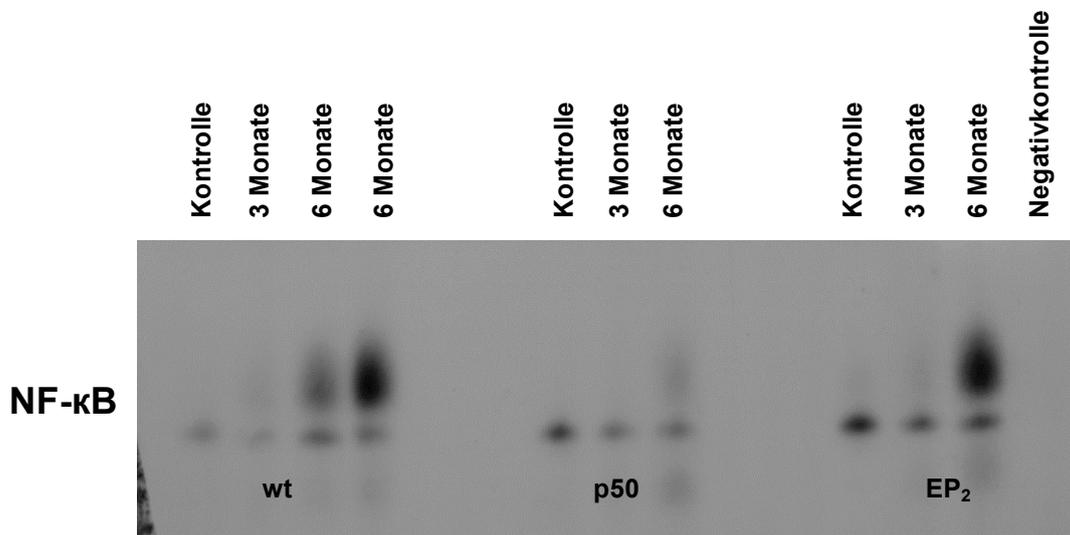


Abb. 13: Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B bei den Versuchstieren zu allen Zeitpunkten nach Ablation

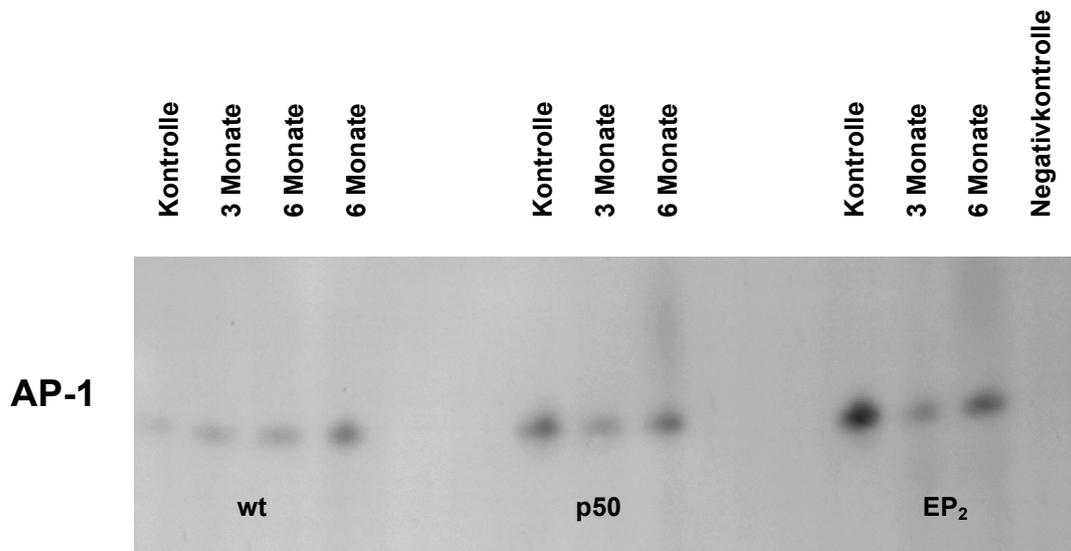


Abb. 14: Bindungsaktivität von AP-1 bei den Versuchstieren zu allen Zeitpunkten nach Ablation

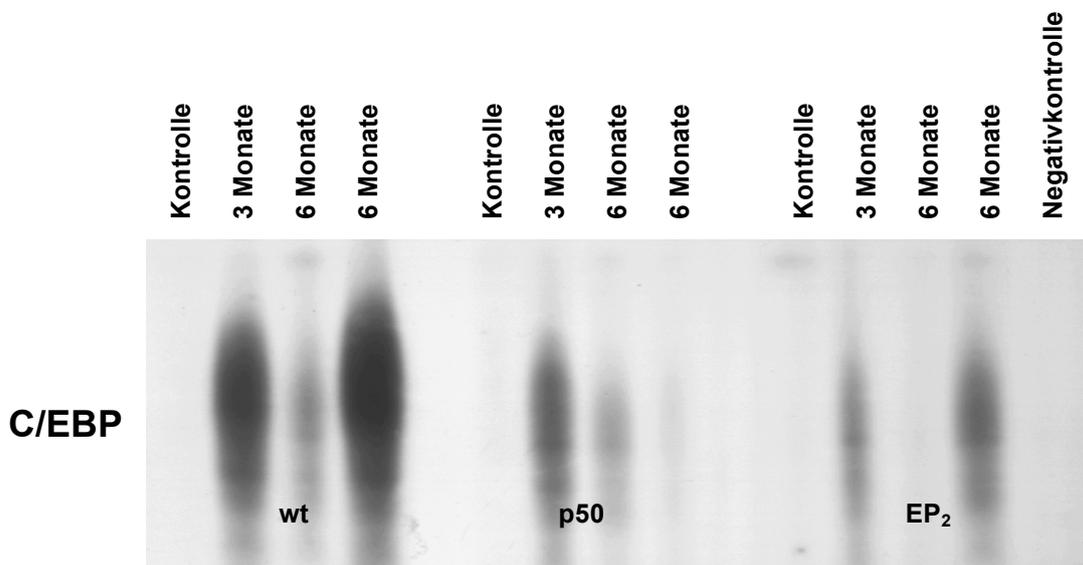


Abb. 15: Bindungsaktivität von C/EBP bei den Versuchstieren zu allen Zeitpunkten nach Ablation

## **4.5. Ergebnisse der histologischen Untersuchungen**

Bei allen Versuchstieren wurde Material für ausführliche histologische Untersuchungen entnommen. Die gezeigten Ergebnisse waren in der Regel bei allen Versuchstieren vorhanden, wobei sie sich mit unterschiedlicher Deutlichkeit darstellten.

### **4.5.1. PAS-Färbung**

Die PAS (Periodic-Acid-Schiff) Färbung ist eine der meist verwendeten chemischen Methoden in der Histologie. Bei der PAS-Reaktion werden insbesondere kohlenhydrathaltige Komponenten wie z.B. Glykoproteine, Muzine und Glykogen mit Hilfe von Perjodsäure und Schiff-Reagens nachgewiesen und stellen sich mikroskopisch rot dar. Die Zellkerne werden durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau angefärbt. Somit ermöglicht diese Färbung eine Übersicht über die verschiedenen Strukturen der Mäusenieren.

In der PAS-Färbung zeigten sich deutliche qualitative Unterschiede zwischen den Ablationstieren und den Kontrolltieren.

Bei den Ablationstieren konnte im Verlauf der Monate eine Zunahme des Glomerulusvolumen, eine sogenannte glomeruläre Hypertrophie, gesehen werden. Die glomeruläre Basalmembran stellte sich verbreitert dar, insbesondere bei den wt- und EP<sub>2</sub>-Mäusen. Bei allen drei Versuchsreihen kam es im Verlauf der Monate zu einer Zunahme der mesangialen Matrix und der mesangialen Zellzahl. Diese beschriebenen Läsionen der Glomeruli stellten sich in der Regel fokal, segmental bis hin zu diffus dar, insbesondere bei den EP<sub>2</sub>-Mäusen 6 Monate nach Ablation (Abb. 16).

In einigen Tubuli der abladerten Tiere waren Proteine zu erkennen, die zum Teil das gesamte Lumen ausgefüllt haben. Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigten sich bei den Ablationstieren die Tubuluszellen deutlich geschwollen und eine Verlagerung der Zellkerne nach apikal wurde sichtbar. Die Veränderungen der Zellkerne mit Verlagerung von basal nach apikal ist ein Zeichen für die bevorstehende Ablösung und damit Schädigung der betroffenen Zelle.

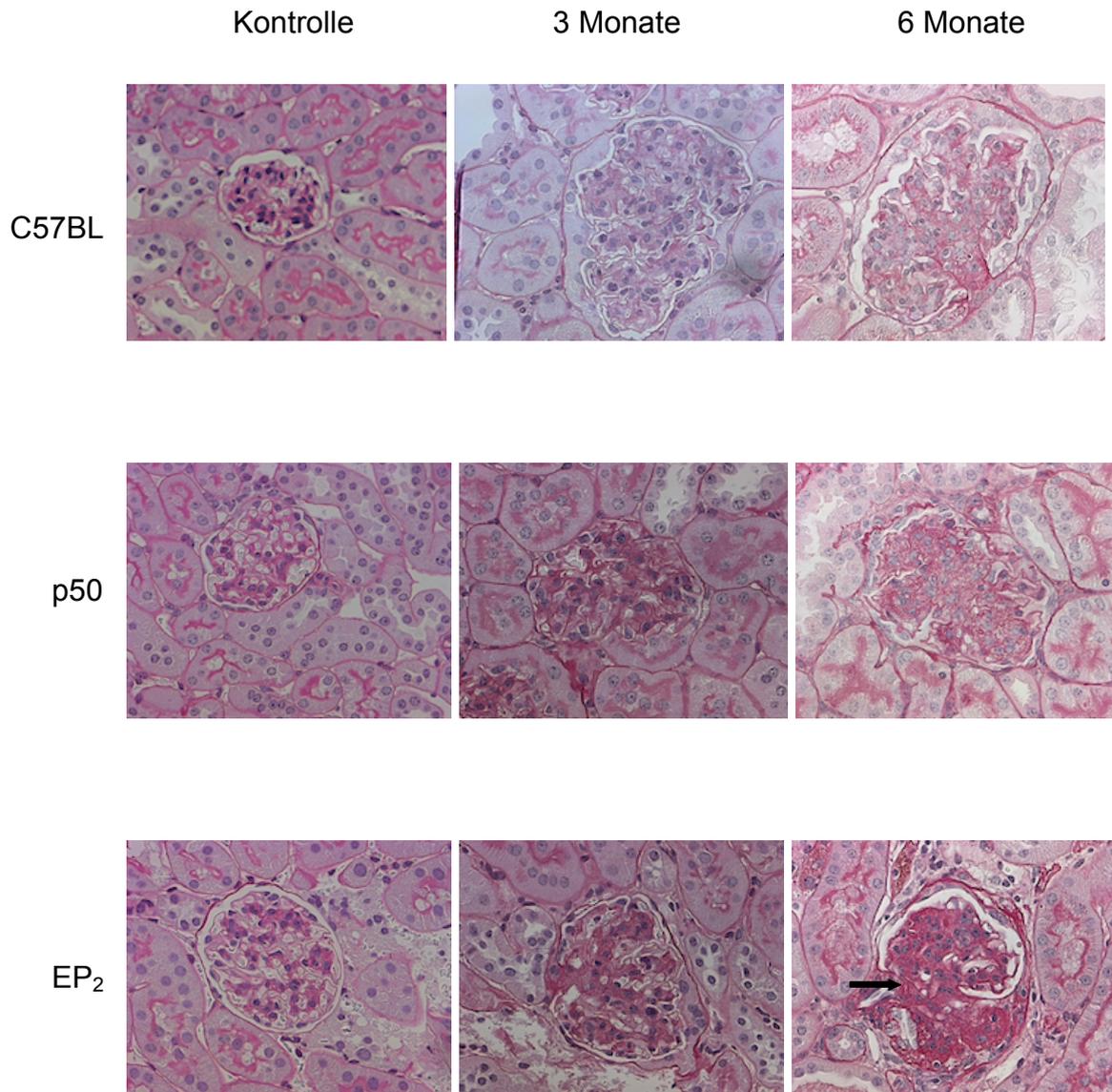


Abb. 16: PAS-Färbungen von Kontroll- und Ablationstieren in 40-facher Vergrößerung. Die glomerulären und tubulären Strukturen bei den Ablationstieren zeigen eine deutliche Hypertrophie. Der Pfeil (EP<sub>2</sub>-Maus 6 Monate nach Ablation) weist auf Ablagerungen im glomerulären Schlingenkonvolut hin. In den Gewebeschnitten der Kontrolltiere lassen sich diese Veränderungen nicht beobachten.

Der Glomerulosklerose-Index als Maß der glomerulären Vernarbung nahm über den Beobachtungszeitraum von 6 Monaten in allen drei Gruppen signifikant zu ( $p < 0,01$ ). Zwischen den drei Versuchsgruppen gab es 3 und 6 Monate nach Ablation jedoch keine signifikanten Unterschiede im Ausmaß der glomerulären Sklerose. Bei den Kontrolltieren zeigten sich in allen drei Versuchsgruppen kaum Vernarbungen (Abb. 17).

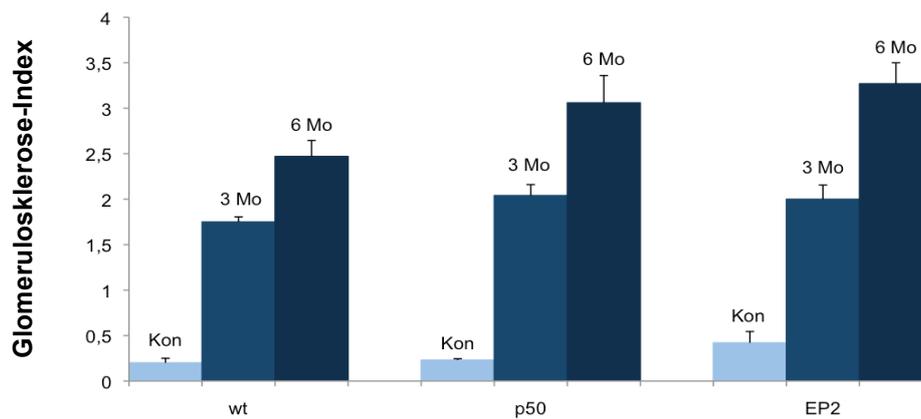


Abb. 17: Glomerulosklerose-Index bei allen Versuchstieren in Bezug auf den Zeitraum nach Ablation. Der Index wurde berechnet aus dem Anteil des PAS-positiven Materials im Glomerulus.

#### **4.5.2. Kollagen Typ IV-Färbung**

Das Ausmaß der Sklerose kann durch die zusätzliche Evaluation der mit Kollagen IV fibrosierten Anteile untermauert werden. Eine vermehrte Bildung von Kollagen Typ IV ist typisch bei sklerotischen Umbauprozessen und myoepithelialer Transformation von residenten Nierenzellen.

Die Kollagen Typ IV-Färbung zeigte im Vergleich zwischen den Kontroll- und den Ablationstieren deutliche Unterschiede. In den Kontrollen konnten keine Kollagen Typ IV-Ablagerungen nachgewiesen werden. Alle ablatierten Tiere zeigten im Verlauf der Monate nach Ablation eine zunehmende Kollagenablagerung in den Glomeruli und auch interstitiell. Insbesondere bei den p50-knockout-Mäusen waren die Umbauprozesse deutlich (Abb. 18).

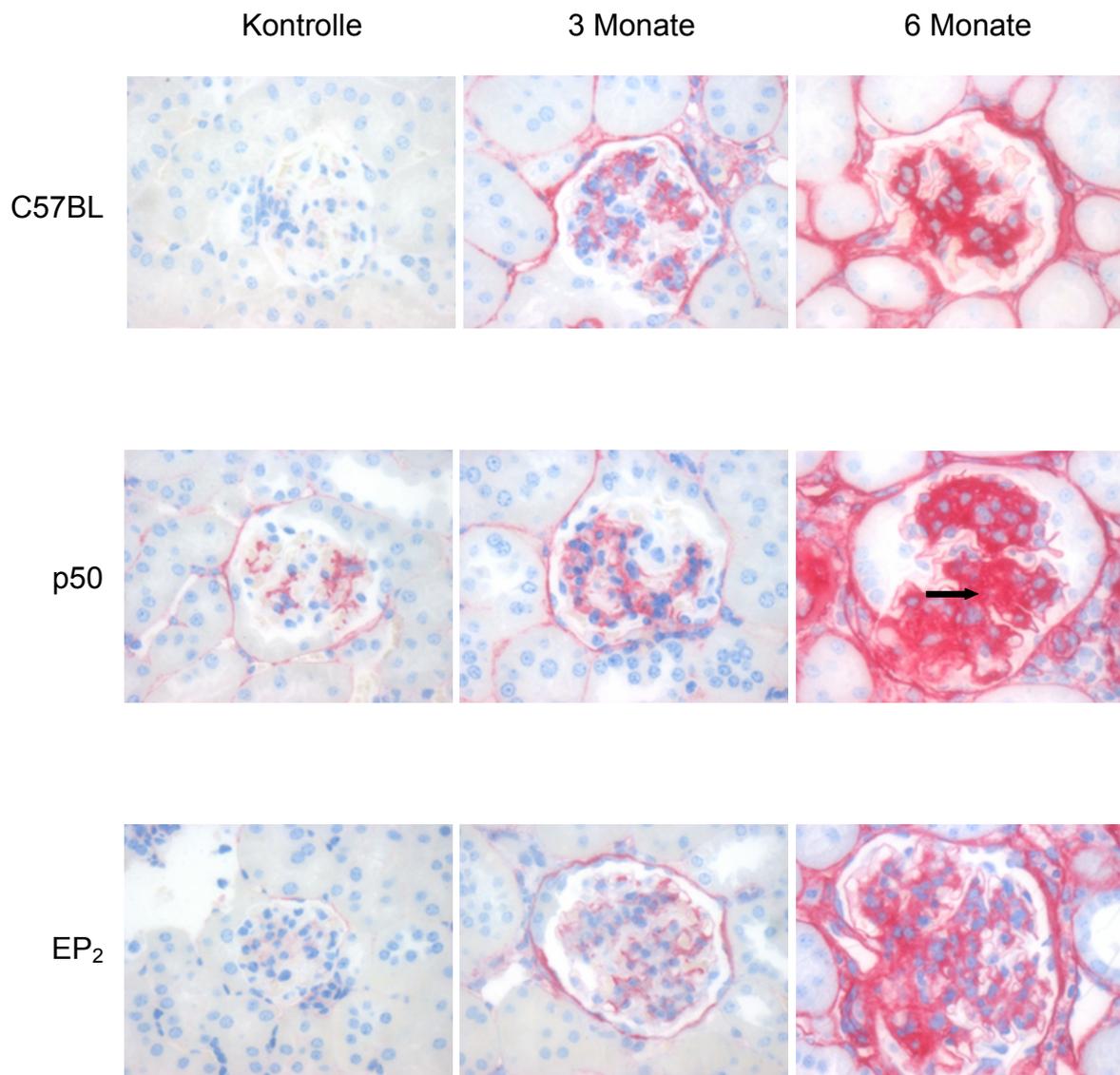


Abb. 18: Kollagen Typ IV-Färbungen von Kontroll- und Ablationstieren in 40-facher Vergrößerung. Der Pfeil (p50-Maus 6 Monate nach Ablation) zeigt die Matrixverdichtung und Kollagenablagerung im Glomerulus.

Bei den Ablationstieren kam es im Verlauf der Monate nach Ablation zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Kollagen Typ IV-Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren ( $p < 0,05$ ). Die Kollagen Typ IV-Expression war jedoch innerhalb der Tiergruppen 3 und 6 Monate nach Ablation nicht unterschiedlich (Abb. 19).

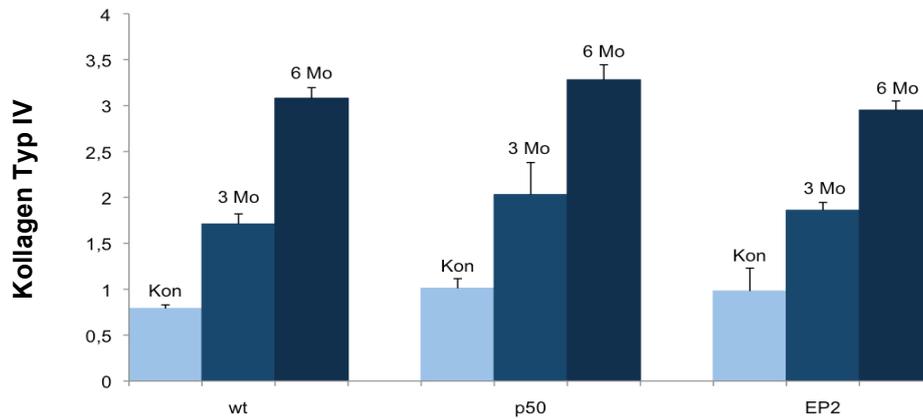


Abb. 19: Kollagen Typ IV-Expression bei allen Versuchstieren in Bezug auf den Zeitraum nach Ablation

### 4.5.3. F4/80-Färbung

Das F4/80-Antigen ermöglicht die Identifizierung von Makrophagen in den histologischen Schnitten. Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte sich eine deutliche Erhöhung der F4/80-positiven Zellen in den Ablationstieren. Die stärkste Expression der F4/80-positiven Zellen im Nierengewebe zeigte sich vor allem in den Ablationstieren 6 Monate nach Ablation. Die Zellen waren insbesondere periglomerulär und interstitiell lokalisiert (Abb. 20).

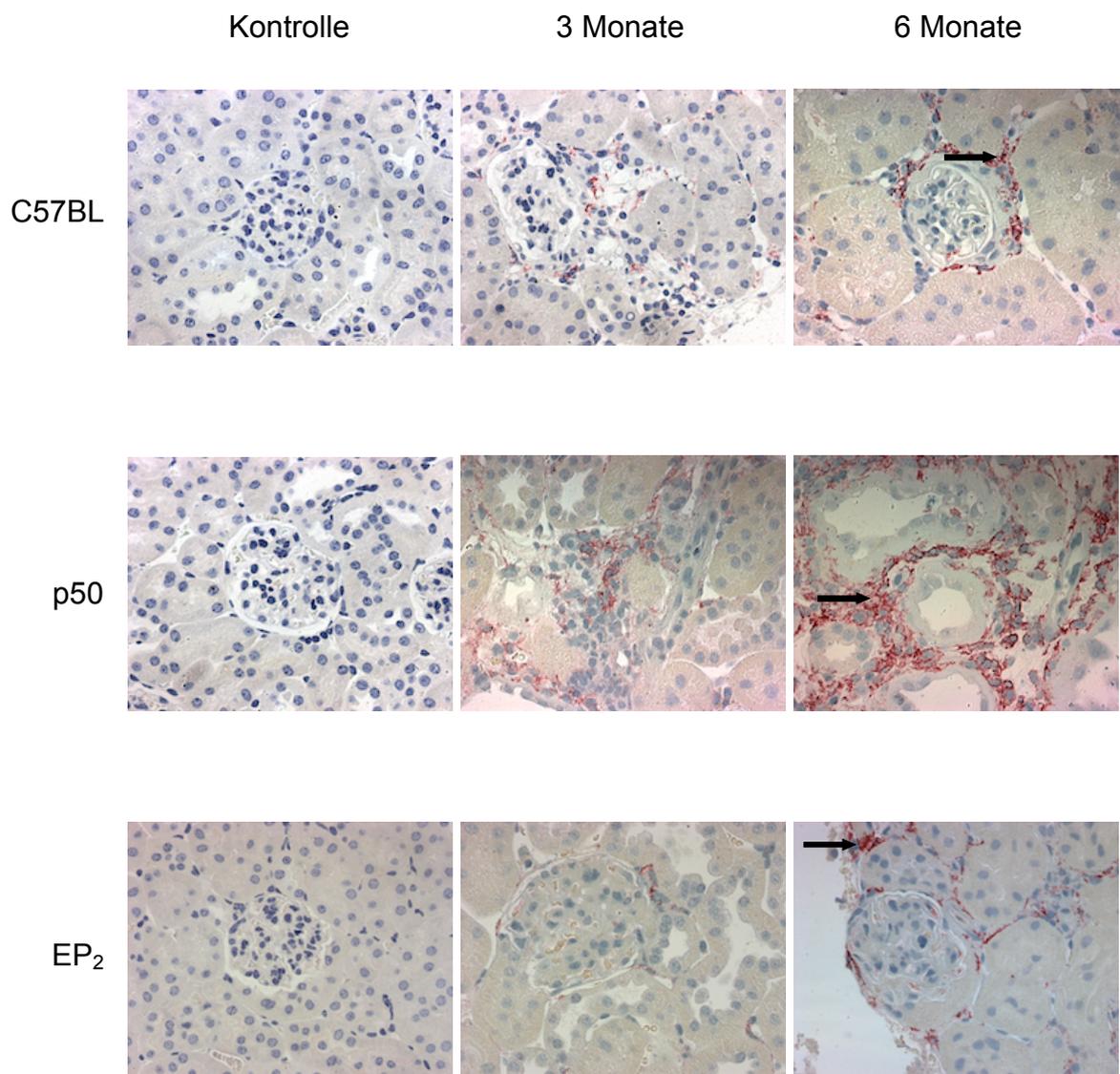


Abb. 20: F4/80-Färbungen der murinen Makrophagen in den Gewebeschnitten der Kontroll- und Ablationstiere in 40-facher Vergrößerung. Die Pfeile zeigen Makrophagen, die periglomerulär und interstitiell lokalisiert waren.

Die F4/80- positiven Zellen konnten bei den Ablationstieren 3 und 6 Monate nach Ablation gesehen werden. Bei den Kontrolltieren waren diese Zellen kaum nachweisbar. Bei den p50-knockout-Mäusen kam es im Verlauf der Monate zu einem signifikanten Anstieg der F4/80- positiven Zellen ( $p < 0,05$ ). Bei den EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen war die Infiltration an F4/80- positiven Zellen, insbesondere 6 Monate nach Ablation (Abb. 21), am ausgeprägtesten in den drei Versuchsgruppen ( $p < 0,01$ ). Die wt-Mäuse hatten 3 und 6 Monate nach Ablation einen deutlichen Anstieg, jedoch war dieser nicht signifikant.

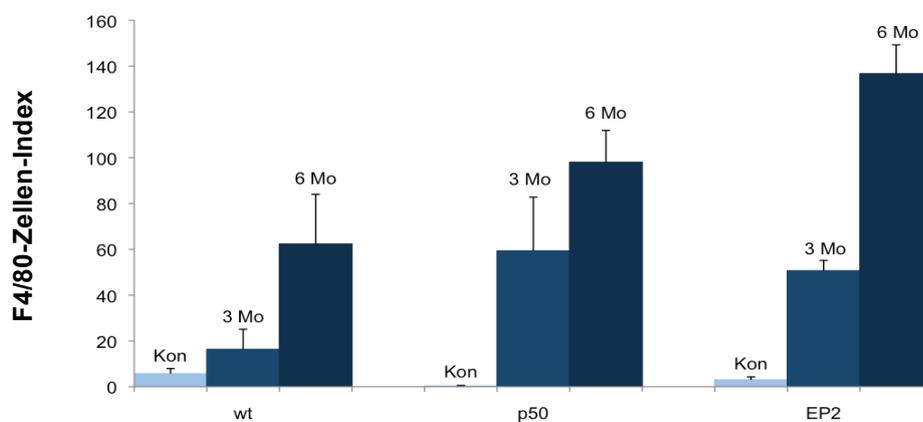


Abb. 21: F4/80-Zellen-Index bei allen Versuchstieren in Bezug auf den Zeitraum nach Ablation. Der Index wurde berechnet aus dem Anteil des F4/80-positiven Materials periglomerulär und interstitiell.

## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Einfluss von NF- $\kappa$ B und EP<sub>2</sub> auf die Progression der Niereninsuffizienz in einem Modell einer fortschreitenden Nierenschädigung, dem Modell der 5/6-tel Ablation, zu untersuchen. Dafür wurden knockout-Mäuse mit Gendefizienz der p50-Untereinheit von NF- $\kappa$ B bzw. einer EP<sub>2</sub>-Gendefizienz verwendet und mit Wildtyp-Tieren, auf dem genetischen C57BL/6-Hintergrund, verglichen.

Als Arbeitshypothese wurde ein veränderter Verlauf des Schweregrades der Nierenerkrankung nach Ablation in den gendefizienten Mäusen postuliert, insbesondere ein eher aggravierter Verlauf bei EP<sub>2</sub>-knockout Mäusen, dagegen ein möglicherweise gebesserter Verlauf bei p50-knockout Mäusen.

Als „klinische“ Zielparameter wurden die Retentionswerte (Harnstoff und Kreatinin) und die Proteinurie gemessen, außerdem die histologischen Veränderungen in der Niere mithilfe des Glomerulosklerose-Index, der Kollagen Typ IV-Ablagerungen und der Gewebsinfiltration von mononukleären Zellen quantifiziert. Als weitere Beurteilungsparameter wurden die RNA-Expressionen verschiedener Chemokine, des Strukturproteins Kollagen Typ-IV und des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  bestimmt. Zur Analyse einer möglicherweise veränderten intrazellulären Aktivierung der Entzündung in den knockout- im Vergleich zu den wt-Tieren wurde die Bindungsaktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren analysiert.

Die Retentionsparameter (Kreatinin und Harnstoff) zeigten sich nach Ablation über den Verlauf von 6 Monaten bei allen Genotypen der Ablationstiere signifikant erhöht ( $p < 0,01$  und  $p < 0,05$ ), was einer zunehmenden Niereninsuffizienz der Ablationstiere entspricht. Zwischen den verschiedenen Genotypen, insbesondere den knockout-Tieren im Vergleich zu den wt-Tieren gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede (Tab. 5).

Bezüglich der Proteinurie zeigten sich sowohl in der qualitativen Untersuchung mittels silbergefärbter Uringele, als auch in der quantitativen Untersuchung mittels Albumin-ELISA signifikante Albuminausscheidungen bei allen Ablationstieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Bei den wt- und p50-knockout-Mäusen konnte im Verlauf der Ablation eine deutlich höhere jedoch statistisch nicht signifikante Albuminurie gesehen werden als bei den EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen.

Unsere Ergebnisse sind bezüglich des Ausprägungsgrades der Proteinurie vergleichbar zu anderen Tiermodellen mit reduzierter Nephronmasse bzw. 5/6-Nephrektomie bei Knockout-Mäusen. So z.B. den mit selektiven COX-2-Inhibitoren behandelten ROP-Mäusen (Retinopathy of Prematurity, Frühgeborenenretinopathie), in denen eine Mutation des Os-Gens auf dem Chromosom 8 zu einer 50% Reduktion der Nephronzahl mit konsekutiver glomerulärer Hypertrophie und schwerer Glomerulosklerose führt. Ähnlich sind die Ergebnisse auch den Adiponectin-knockout-Mäusen und eNOS-knockout-Mäusen (endothelial nitric oxide synthase) in denen im Verlauf nach 12 Wochen eine signifikante Proteinurie gemessen wurde [14, 62, 101].

Unsere histologischen Untersuchungen zur Beurteilung der Strukturveränderungen der Nieren zeigten deutliche Unterschiede in den Nieren der Ablationstiere im Vergleich zu den Kontrolltieren. Sowohl bei den beiden knockout- als auch den wt-Tieren kam es im Verlauf von 6 Monaten zu einer deutlichen mesangialen Matrixzunahme und glomerulären Sklerosierung. Die Läsionen der Glomeruli stellten sich in der Regel fokal und segmental, bis hin zu diffus dar, insbesondere bei den EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen 6 Monate nach Ablation. Der Glomerulosklerose-Index nahm über den Beobachtungszeitraum von 6 Monaten in allen drei Gruppen signifikant zu, im Vergleich innerhalb der drei Tiergruppen gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied.

Als wichtigen Parameter in der frühen Steuerung der Fibrose wurde das Zytokin TGF- $\beta$  untersucht. Wir fanden hier eine erhöhte Expression der mRNA von TGF- $\beta$  bei den Ablationstieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Insbesondere mit zunehmendem Krankheitsverlauf bei den wt- und EP<sub>2</sub>-Mäusen 6 Monate nach Ablation waren die TGF- $\beta$ -Spiegel deutlich erhöht. So scheint das Ausmaß der Fibrosierung auch in diesem Modell mit der Höhe des TGF- $\beta$ -Spiegels zu korrelieren, auch wenn hier nur RNA untersucht wurde. Eine erhöhte Expression von TGF- $\beta$  findet sich in einer Vielzahl von Tiermodellen mit fibrotischen Erkrankungen der Nieren [12], zum Beispiel im Modell der Anti-Thy-1 Glomerulonephritis, in dem auch ein positiver Effekt auf den Verlauf der Erkrankung durch den Einsatz von neutralisierenden Antikörpern gegen TGF- $\beta$  gezeigt werden konnte [10]. Mithilfe der neutralisierenden Antikörper konnte die Akkumulation der extrazellulären Matrix signifikant gesenkt werden. Zudem konnten frühere Experimente eine Verminderung der TGF- $\beta$  Expression durch

die Gabe von Prostaglandin E zeigen [79]. Diese Ergebnisse in Zusammenhang mit Daten aus Zellkultur an Mesangiumzellen [103] ließen uns vermuten, dass die EP<sub>2</sub>-knockout-Mäuse eher eine aggravierte Reaktion zeigen würden.

Um weitere, dem TGF- $\beta$  nachgeschaltete, profibrotische oder direkt Matrixbildende Proteine zu untersuchen, wurde die Kollagen Typ IV-Expression sowohl auf mRNA-Ebene als auch quantitativ auf histologischen Schnitten nach Kollagen Typ IV-Färbung bestimmt. In der RT-PCR konnten deutlich erhöhte Kollagen Typ IV-Spiegel bei allen Ablationstieren, insbesondere 6 Monate nach Ablation gesehen werden. Die höchste Expression zeigte sich bei den wt-Mäusen und p50-knockout-Mäusen. Histologisch zeigten sich in den Glomeruli aller Ablationstiere im Verlauf der Monate nach Ablation statistisch signifikante sklerotische Veränderungen, wobei der glomeruläre Schaden innerhalb der Tiergruppen nicht signifikant unterschiedlich war.

Um den möglicherweise verschiedenen Einfluss von einwandernden Entzündungszellen fest zu stellen, haben wir histologische Färbungen von Makrophagen (F4/80 positiv) durchgeführt. Es zeigte sich gegenüber den Kontrolltieren eine statistisch signifikante Erhöhung von Makrophagen in den Nieren der Ablationstiere, insbesondere bei den p50- und EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen, sowohl 3 als auch 6 Monate nach Ablation. Die meisten Makrophagen konnten bei den EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen 6 Monate nach Ablation nachgewiesen werden. Zu betonen ist allerdings, dass die Zahl der einwandernden Makrophagen in dem hier untersuchten Ablationsmodell deutlich niedriger ist, als in den klassischen entzündlichen Modellen, z.B. den Glomerulonephritiden.

Die mRNA Untersuchung der Chemokine, die in der Kette der Entzündungsmediation früh aktiviert werden, zeigte eine Hochregulierung von RANTES, MCP-1 und IP-10. Die wt-Mäuse zeigten die höchste Expression von Chemokinen 6 Monate nach Ablation. Bei den p50- und EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen war die Expression 3 Monate nach Ablation am höchsten. Insgesamt hatten die p50-knockout-Mäuse eine deutlich niedrigere Expression von RANTES, MCP-1 und IP-10. Bei allen Tiergruppen waren die Ergebnisse jedoch statistisch nicht signifikant.

Insgesamt spricht somit sowohl die renale Infiltration von Entzündungszellen als auch die Hochregulierung von Chemokinen (RANTES, MCP-1 und IP-10) zumindest für eine entzündliche Begleitreaktion in unserem Modell, allerdings

zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den knockout- und wt-Tieren. Insgesamt bleibt aber auch die Expression der untersuchten Chemokine eher moderat im Vergleich zu den entzündlichen Nephritiden.

Da die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, AP-1 und C/EBP an der intrazellulären Aktivierung von Mediatoren der Entzündungsprozesse und besonders früh der Aktivierung von Chemokinen und Wachstumsfaktoren beteiligt sind, untersuchten wir deren Relevanz in unseren Tieren. Bei den wt-Mäusen und EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen zeigte sich eine deutlich gesteigerte NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität. Entsprechend dem bestehenden Gendefekt konnte bei den p50-knockout-Mäusen keine Bindungsaktivität nachgewiesen werden. Als möglicher „Alternativweg“ wurde zudem der Transkriptionsfaktor AP-1 untersucht, der allerdings bei den wt-Mäusen gar nicht und bei den p50- und EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen in einer sehr niedrigen nicht relevanten Ausprägung nachgewiesen werden konnte. Der Transkriptionsfaktor C/EBP wiederum zeigte bei allen Tieren eine hohe Bindungsaktivität. Zusammenfassend stellen damit unsere Untersuchungen auch bezüglich der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren keine Unterschiede in den wt- und knockout-Tieren heraus.

In unseren Experimenten konnte zum ersten Mal eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-kappa B und C/EBP am Modell der chronischen Niereninsuffizienz durch renale Ablation über einen Zeitraum von 6 Monaten nachgewiesen werden. Da die nukleären Proteine aus Extrakten der Gesamtniere isoliert wurden, konnte kein Unterschied zwischen wt, p50-knockout- und EP<sub>2</sub>-knockout-Tieren nachgewiesen werden.

Um weitere Aufschlüsse über die Rolle der Transkriptionsfaktoren in diesem Ablationsmodell zu erhalten, müssten möglicherweise Zell-spezifische knockout Modelle verwendet werden, die ein selektives Ausschalten der untersuchten Gene z.B. in Tubulusepithelzellen (Ikk2-f/f Kreuzung mit Pax8-raTA), in Lymphozyten (Ikk2-f/f Kreuzung mit CD4-Cre), oder in Monozyten/Makrophagen (Ikk2-f/f Kreuzung mit LysM-Cre) erlauben.

Zusätzlich ist vermutlich auch sehr bedeutsam, dass eine hohe Redundanz bei den beiden untersuchten Signalwegen besteht. Sowohl der NF- $\kappa$ B- als auch der EP<sub>2</sub>-Signalweg besitzen parallele oder alternative Aktivierungswege, die zu einer gleichen intrazellulären Reaktion führen. Der NF- $\kappa$ B-Signalweg kann

sowohl durch den „klassischen Weg“ über den Abbau von I $\kappa$ B, als auch durch den „alternativen Weg“ über die Prozessierung des Vorläufers p100, aktiviert werden. Die Aktivierung von EP<sub>2</sub> führt zu einer Erhöhung des second messenger cAMP intrazellulär. Dies geschieht ebenso durch den EP<sub>4</sub>-Rezeptor, der auch auf vielen Entzündungszellen und vermutlich auch in der Niere ähnlich verteilt wie der EP<sub>2</sub>-Rezeptor exprimiert wird. Somit könnten die Wirkungen der beiden Rezeptoren in dem untersuchten Modell sehr ähnlich sein.

Insbesondere durch diese Redundanzen ist meines Erachtens erklärbar, warum die erhofften Effekte der knockout-Strategien nicht deutlicher waren und keine signifikanten Unterschiede erreicht werden konnten.

## 6. Zusammenfassung

Die vorliegende Promotionsarbeit untersucht die Bedeutung der p50-Proteinuntereinheit des Transkriptionsfaktors NF-kappa B und des EP<sub>2</sub>-Rezeptors an einem Modell der chronischen Niereninsuffizienz, dem renalen Ablationsmodell (5/6-tel Nephrektomiemodell) der Maus.

Die Ergebnisse zeigen, dass es gelingt, eine chronische Niereninsuffizienz bei wt-Tieren stabil über einen Zeitraum von 6 Monaten zu induzieren. Die wt-Tiere zeigen sowohl klinisch als auch morphologisch nach 3 und 6 Monaten eine deutliche fortgeschrittene chronische Niereninsuffizienz. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen an diesem chronischen Modell bestätigen auch Hypothesen anderer Arbeitsgruppen, dass primär hämodynamische Veränderungen, z.B. durch eine Reduktion der Nierenmasse in der Niere langfristig auch zu chronisch entzündlich mitbedingten Folgeschäden führen können. Unsere Experimente zeigen eine deutliche Expression pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine in wt-Tieren 3 und 6 Monate nach renaler Ablation. Diese gesteigerte Expression der pro-inflammatorischen Zytokine wird morphologisch von einer gesteigerten tubulo-interstitiellen Infiltration von F4/80-positiven Entzündungszellen begleitet.

Überraschenderweise konnten in NF-kappa B p50 knockout- und in EP<sub>2</sub>-Rezeptor knockout-Mäusen im Vergleich zu den wt-Tieren keine signifikanten und konstant reproduzierbaren biologisch relevanten Unterschiede über den untersuchten Zeitraum von 6 Monaten festgestellt werden. Sowohl im Hinblick auf die klinische Ausprägung der Niereninsuffizienz als auch hinsichtlich der morphologischen Charakteristika und der Aktivierung pro-inflammatorischer Zytokine konnten keine signifikanten Unterschiede gesehen werden. Dies obwohl die Expression pro-inflammatorischer Chemokine in den p50 knockout-Tieren signifikant niedriger war als in wt- und EP<sub>2</sub>-Rezeptor defizienten Mäusen. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Progression der Niereninsuffizienz nach renaler Ablation bei wt-Mäusen, p50- und EP<sub>2</sub>-knockout-Mäusen gleich rasch voranschreitet. Obwohl es sich bei unserem „Ablationsmodell“ um ein primär nicht entzündliches Modell handelt, konnte gezeigt werden, dass auch inflammatorische Komponenten eine wichtige Rolle spielen. Mögliche pro- und anti-inflammatorische Effekte, die über p50 homodimere Komplexe oder EP<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelt werden, können an

diesem chronischen, primär hämodynamisch vermittelten Modell einer Nierenschädigung vermutlich aufgrund der relativ geringen entzündlichen Ausprägung und auch der Redundanz der Systeme im NF- $\kappa$ B und EP-Signalweg jedoch nicht weiter voneinander abgegrenzt werden.

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP-1	Activating protein-1
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATF	Activating transcription factor
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
C/EBP	CCAAT/ enhancer-binding protein
COX-2	Cyclooxygenase-2
DEPC	Diethylpyrocarbonat
cDNA	engl. complementary DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
FGF	fibroblast growth Faktor
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
g	Gramm
IFN	Interferon
I $\kappa$ B	Inhibitor of $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL	Interleukin
IP-10	Interferon gamma-induced protein 10
JDP	Jun dimerization protein (JDP)
k	kilo ( $\times 10^3$ )
kDa	Kilodalton
l	Liter
$\mu$	mikro ( $\times 10^{-6}$ )
m	milli ( $\times 10^{-3}$ )

M	Molarität
mA	Milliampere
MCP-1	Monocyte-chemotactic protein-1
min	Minute(n)
MIP-1	Macrophage inflammatory protein-1
mRNA	engl. messenger RNA
n	nano
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
PAS	Periodic-Acid-Schiff
PCR	Polymerasekettenreaktion
RANTES	regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
ROP	Retinopathy of Prematurity
rpm	engl. revolutions per minute = Umdrehungen in der Minute
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethyldiamin
TGF- $\beta$	Transforming growth factor-beta
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
V	Volt

## 7.2. Literaturverzeichnis

1. *Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States*, in *USRDS 2001 Annual Data Report*. 2001, National Institute of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases: Bethesda, MD.
2. *K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification*. *Am J Kidney Dis*, 2002. **39**(2 Suppl 1): p. S1-266.
3. Alam T, An MR, and Papaconstantinou J, *Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(8): p. 5021-4.
4. Angel P and Karin M, *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1072**(2-3): p. 129-57.
5. Bandeira-Melo C, et al., *Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 and lipoxin A4 accelerate resolution of allergic edema in *Angiostrongylus costaricensis*-infected rats: relationship with concurrent eosinophilia*. *J Immunol*, 2000. **164**(2): p. 1029-36.
6. Barisoni L and Mundel P, *Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases*. *Am J Nephrol*, 2003. **23**(5): p. 353-60.
7. Barnes PJ and Karin M, *Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases*. *N Engl J Med*, 1997. **336**(15): p. 1066-71.
8. Beg AA, et al., *Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B*. *Nature*, 1995. **376**(6536): p. 167-70.

9. Bentires-Alj M, et al., *Inhibition of the NF-kappa B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines*. *Oncogene*, 2001. **20**(22): p. 2805-13.
10. Border WA, et al., *Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1*. *Nature*, 1990. **346**(6282): p. 371-4.
11. Border WA and Ruoslahti E, *Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair*. *J Clin Invest*, 1992. **90**(1): p. 1-7.
12. Border WA and Noble NA, *Transforming growth factor beta in tissue fibrosis*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(19): p. 1286-92.
13. Carrasco D, et al., *Multiple hemopoietic defects and lymphoid hyperplasia in mice lacking the transcriptional activation domain of the c-Rel protein*. *J Exp Med*, 1998. **187**(7): p. 973-84.
14. Cheng H, et al., *Expression of mediators of renal injury in the remnant kidney of ROP mice is attenuated by cyclooxygenase-2 inhibition*. *Nephron Exp Nephrol*, 2005. **101**(3): p. e75-85.
15. Cockcroft DW and Gault MH, *Prediction of creatinine clearance from serum creatinine*. *Nephron*, 1976. **16**(1): p. 31-41.
16. Coleman RA, Smith WL, and Narumiya S, *International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes*. *Pharmacol Rev*, 1994. **46**(2): p. 205-29.
17. Colville-Nash PR and Gilroy DW, *Cyclooxygenase enzymes as targets for therapeutic intervention in inflammation*. *Drug News Perspect*, 2000. **13**(10): p. 587-97.

18. de Zeeuw D, Hillege HL, and de Jong PE, *The kidney, a cardiovascular risk marker, and a new target for therapy*. *Kidney Int Suppl*, 2005(98): p. S25-9.
19. Dey I, Lejeune M, and Chadee K, *Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract*. *Br J Pharmacol*, 2006. **149**(6): p. 611-23.
20. Dubois RN, et al., *Cyclooxygenase in biology and disease*. *FASEB J*, 1998. **12**(12): p. 1063-73.
21. el Nahas AM, et al., *Role of growth hormone in the development of experimental renal scarring*. *Kidney Int*, 1991. **40**(1): p. 29-34.
22. Floege J, et al., *Glomerular cell proliferation and PDGF expression precede glomerulosclerosis in the remnant kidney model*. *Kidney Int*, 1992. **41**(2): p. 297-309.
23. Fosslien E, *Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2000. **37**(5): p. 431-502.
24. Fujihara CK, et al., *Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney*. *Kidney Int*, 1998. **54**(5): p. 1510-9.
25. Fukunaga K, et al., *Cyclooxygenase 2 plays a pivotal role in the resolution of acute lung injury*. *J Immunol*, 2005. **174**(8): p. 5033-9.
26. Ghosh S, May MJ, and Kopp EB, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 225-60.
27. Gibb W, Matthews SG, and Challis JR, *Localization and developmental changes in prostaglandin H synthase (PGHS) and PGHS messenger ribonucleic acid in ovine placenta throughout gestation*. *Biol Reprod*, 1996. **54**(3): p. 654-9.

28. Gilmore TD, *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
29. Gilroy DW, et al., *Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties*. Nat Med, 1999. **5**(6): p. 698-701.
30. Goetz J, et al., *Structure and expression of the ATFa gene*. J Biol Chem, 1996. **271**(47): p. 29589-98.
31. Grigoriadis G, et al., *The Rel subunit of NF-kappaB-like transcription factors is a positive and negative regulator of macrophage gene expression: distinct roles for Rel in different macrophage populations*. EMBO J, 1996. **15**(24): p. 7099-107.
32. Grossmann M, et al., *The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(21): p. 11848-53.
33. Hallan S, et al., *Association of kidney function and albuminuria with cardiovascular mortality in older vs younger individuals: The HUNT II Study*. Arch Intern Med, 2007. **167**(22): p. 2490-6.
34. Haroun MK, et al., *Risk factors for chronic kidney disease: a prospective study of 23,534 men and women in Washington County, Maryland*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(11): p. 2934-41.
35. Hayden MS and Ghosh S, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
36. Hostetter TH, et al., *Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation*. Am J Physiol, 1981. **241**(1): p. F85-93.
37. Ianaro A, et al., *Role of cyclopentenone prostaglandins in rat carrageenin pleurisy*. FEBS Lett, 2001. **508**(1): p. 61-6.

38. Kagami S, et al., *Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells*. J Clin Invest, 1994. **93**(6): p. 2431-7.
39. Kalluri R and Neilson EG, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
40. Karin M, Liu Z, and Zandi E, *AP-1 function and regulation*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 240-6.
41. Karin M and Ben-Neriah Y, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 621-63.
42. Karin M and Lin A, *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 221-7.
43. Kasiske BL, *The kidney in cardiovascular disease*. Ann Intern Med, 2001. **134**(8): p. 707-9.
44. Klag MJ, et al., *Blood pressure and end-stage renal disease in men*. N Engl J Med, 1996. **334**(1): p. 13-8.
45. Kokko JP, *Effect of prostaglandins on renal epithelial electrolyte transport*. Kidney Int, 1981. **19**(6): p. 791-6.
46. Lawrence T, et al., *Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation*. Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1291-7.
47. Lee HH, et al., *NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9136-41.
48. Levey AS, et al., *A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation*.

- Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med, 1999. 130(6): p. 461-70.*
49. Levey AS, et al., *National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Ann Intern Med, 2003. 139(2): p. 137-47.*
  50. Levy BD, et al., *Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. Nat Immunol, 2001. 2(7): p. 612-9.*
  51. Lichtenstein DR, Syngal S, and Wolfe MM, *Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the gastrointestinal tract. The double-edged sword. Arthritis Rheum, 1995. 38(1): p. 5-18.*
  52. Lowry OH, et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951. 193(1): p. 265-75.*
  53. Lysaght MJ, *Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications. J Am Soc Nephrol, 2002. 13 Suppl 1: p. S37-40.*
  54. Mann JF, et al., *Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril: the HOPE randomized trial. Ann Intern Med, 2001. 134(8): p. 629-36.*
  55. Martin Sanz P, et al., *Cyclooxygenase 2: understanding the pathophysiological role through genetically altered mouse models. Front Biosci, 2006. 11: p. 2876-88.*
  56. Miller SB, *Prostaglandins in health and disease: an overview. Semin Arthritis Rheum, 2006. 36(1): p. 37-49.*
  57. Mizgerd JP, et al., *Nuclear factor-kappaB p50 limits inflammation and prevents lung injury during Escherichia coli pneumonia. Am J Respir Crit Care Med, 2003. 168(7): p. 810-7.*

58. Mora AL, et al., *Antiapoptotic function of NF-kappaB in T lymphocytes is influenced by their differentiation status: roles of Fas, c-FLIP, and Bcl-xL*. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(9): p. 1032-44.
59. Narumiya S, Sugimoto Y, and Ushikubi F, *Prostanoid receptors: structures, properties, and functions*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(4): p. 1193-226.
60. O'Neill GP and Ford-Hutchinson AW, *Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues*. *FEBS Lett*, 1993. **330**(2): p. 156-60.
61. Oakley F, et al., *Nuclear factor-kappaB1 (p50) limits the inflammatory and fibrogenic responses to chronic injury*. *Am J Pathol*, 2005. **166**(3): p. 695-708.
62. Ohashi K, et al., *Exacerbation of albuminuria and renal fibrosis in subtotal renal ablation model of adiponectin-knockout mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(9): p. 1910-7.
63. Panzer U, et al., *Resolution of renal inflammation: a new role for NF-kappaB1 (p50) in inflammatory kidney diseases*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009. **297**(2): p. F429-39.
64. Perkins ND, *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(1): p. 49-62.
65. Perneger TV, et al., *End-stage renal disease attributable to diabetes mellitus*. *Ann Intern Med*, 1994. **121**(12): p. 912-8.
66. Ramji DP and Foka P, *CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation*. *Biochem J*, 2002. **365**(Pt 3): p. 561-75.
67. Ramwell PW and Shaw JE, *Prostaglandin inhibition of gastric secretion*. *J Physiol*, 1968. **195**(2): p. 34P-36P.

68. Remuzzi G and Ruggenti P, *Prognosis of diabetic nephropathy: how to improve the outcome*. Diabetes Res Clin Pract, 1998. **39 Suppl**: p. S49-53.
69. Remuzzi G, Schieppati A, and Ruggenti P, *Clinical practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2002. **346**(15): p. 1145-51.
70. Remuzzi G and Weening JJ, *Albuminuria as early test for vascular disease*. Lancet, 2005. **365**(9459): p. 556-7.
71. Remuzzi G, Benigni A, and Remuzzi A, *Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes*. J Clin Invest, 2006. **116**(2): p. 288-96.
72. Remuzzi G, Macia M, and Ruggenti P, *Prevention and treatment of diabetic renal disease in type 2 diabetes: the BENEDICT study*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4 Suppl 2): p. S90-7.
73. Robert A, *Cytoprotection of the gastrointestinal mucosa*. Adv Intern Med, 1983. **28**: p. 325-37.
74. Romero F, et al., *Mycophenolate mofetil prevents the progressive renal failure induced by 5/6 renal ablation in rats*. Kidney Int, 1999. **55**(3): p. 945-55.
75. Rowley AF, et al., *Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems*. J Exp Biol, 2005. **208**(Pt 1): p. 3-14.
76. Sarnak MJ, et al., *Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention*. Circulation, 2003. **108**(17): p. 2154-69.

77. Schiffer M, et al., *Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling*. *Kidney Int Suppl*, 2000. **77**: p. S45-52.
78. Schiller B and Moran J, *Focal glomerulosclerosis in the remnant kidney model--an inflammatory disease mediated by cytokines*. *Nephrol Dial Transplant*, 1997. **12**(3): p. 430-7.
79. Schneider A, et al., *Prostaglandin E1 inhibits collagen expression in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis: possible role of TGF beta*. *Kidney Int*, 1996. **50**(1): p. 190-9.
80. Schneider A, et al., *Cyclooxygenase metabolites mediate glomerular monocyte chemoattractant protein-1 formation and monocyte recruitment in experimental glomerulonephritis*. *Kidney Int*, 1999. **55**(2): p. 430-41.
81. Senftleben U and Karin M, *The IKK/NF-kappaB pathway*. *Crit Care Med*, 2002. **30**(1 Supp): p. S18-S26.
82. Shimamura T and Morrison AB, *A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats*. *Am J Pathol*, 1975. **79**(1): p. 95-106.
83. Smith WL and Marnett LJ, *Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1083**(1): p. 1-17.
84. Smith WL, Meade EA, and DeWitt DL, *Interactions of PGH synthase isozymes-1 and -2 with NSAIDs*. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. **744**: p. 50-7.
85. Smith WL, Garavito RM, and DeWitt DL, *Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(52): p. 33157-60.
86. Snapper CM, et al., *B cells from p50/NF-kappa B knockout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line CH transcription, and Ig class switching*. *J Immunol*, 1996. **156**(1): p. 183-91.

87. Stevens LA, et al., *Impact of creatinine calibration on performance of GFR estimating equations in a pooled individual patient database*. Am J Kidney Dis, 2007. **50**(1): p. 21-35.
88. Tak PP and Firestein GS, *NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases*. J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 7-11.
89. Takeuchi K, et al., *Adaptive gastric cytoprotection is mediated by prostaglandin EP1 receptors: a study using rats and knockout mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **297**(3): p. 1160-5.
90. Terzic J, et al., *Ubiquitin signals in the NF-kappaB pathway*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 5): p. 942-5.
91. Vane JR, et al., *Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): p. 2046-50.
92. Vanegas H and Schaible HG, *Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cyclooxygenases] in the spinal cord*. Prog Neurobiol, 2001. **64**(4): p. 327-63.
93. Verhave JC, et al., *The reliability of different formulae to predict creatinine clearance*. J Intern Med, 2003. **253**(5): p. 563-73.
94. Vogt PK and Bos TJ, *jun: oncogene and transcription factor*. Adv Cancer Res, 1990. **55**: p. 1-35.
95. Wang CY, et al., *NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1680-3.
96. Willoughby DA, et al., *Resolution of inflammation*. Int J Immunopharmacol, 2000. **22**(12): p. 1131-5.

97. Wolf G, et al., *Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta*. J Clin Invest, 1993. **92**(3): p. 1366-72.
98. Wu LL, et al., *Macrophage and myofibroblast proliferation in remnant kidney: role of angiotensin II*. Kidney Int Suppl, 1997. **63**: p. S221-5.
99. Wu LL, et al., *Transforming growth factor beta 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: role of the renin-angiotensin system*. Kidney Int, 1997. **51**(5): p. 1553-67.
100. Yamamoto Y and Gaynor RB, *Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer*. J Clin Invest, 2001. **107**(2): p. 135-42.
101. Yamashita C, et al., *Exaggerated renal pathology of partial ablation-induced chronic renal failure in eNOS deficient mice*. Biol Pharm Bull, 2008. **31**(5): p. 1029-31.
102. Yang N, et al., *Local macrophage and myofibroblast proliferation in progressive renal injury in the rat remnant kidney*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**(8): p. 1967-74.
103. Zahner G, et al., *Prostaglandin E2 stimulates expression of matrix metalloproteinase 2 in cultured rat mesangial cells*. Kidney Int, 1997. **51**(4): p. 1116-23.
104. Zatz R, *Haemodynamically mediated glomerular injury: the end of a 15-year-old controversy?* Curr Opin Nephrol Hypertens, 1996. **5**(6): p. 468-75.
105. Zeisberg M, et al., *Renal fibrosis: collagen composition and assembly regulates epithelial-mesenchymal transdifferentiation*. Am J Pathol, 2001. **159**(4): p. 1313-21.

106. Zeisberg M and Kalluri R, *The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis*. J Mol Med, 2004. **82**(3): p. 175-81.

### **7.3. Danksagung**

Für die Überlassung des Themas und der Arbeit danke ich ganz herzlich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Friedrich Thaiss.

Bei Prof. Dr. med. Friedrich Thaiss möchte ich mich ganz herzlich für die tolle Zusammenarbeit und Hilfe im Tierstall bedanken. Seine innere Ruhe und sein außerordentliches Geschick haben die Durchführung der Tierversuche möglich gemacht und die Arbeitsatmosphäre sehr angenehm und mit viel Freude gestaltet.

Ganz besonders danke ich meinem Betreuer PD Dr. med. André Schneider für die herausragende Unterstützung und für die Begleitung durch die vorliegende Arbeit, für seinen Rat sowohl in der Planung und Durchführung der Versuche, als auch für den häufigen Ansporn, die Diskussionen, die entstandene Freundschaft.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Rolf Stahl, Direktor der III. Medizinischen Klinik – Nephrologie und Rheumatologie, für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen.

Bei den Mitarbeitern des nephrologischen Hauptlabors unter der Leitung von Herrn Dr. rer. nat. Gunther Zahner möchte ich mich für die große Hilfsbereitschaft und die entspannte und herzliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Allen voran gilt mein Dank Herrn Stefan Gatzemeier und Frau Melanie Schaper für die wunderbare Einarbeitung in die notwendigen Arbeitstechniken, für Ihre stetige Unterstützung bei Problemen und vor allem für Ihre Geduld während der gesamten Zeit. Ich danke auch ganz herzlich Frau Dr. med. Cathy Meyer-Schwesinger und Frau Mariola Reschka für die Anfertigung der histologischen Schnitte. Auch danke ich den Tierpflegern für die Betreuung der Tiere und die gute Zusammenarbeit.

Ich danke vor allem meinen Eltern Eva Krygowski und Marek Krygowski für die Ermöglichung meines Medizinstudiums, die tägliche Unterstützung, das Verständnis, den Beistand und die Hilfe auf dem gesamten Weg bis heute vom Weg zum Studium, während des Studiums, der Abschlussprüfungen und während meiner laufenden Weiterbildungszeit zur Fachärztin für Nephrologie.

Besonders danke ich auch meinem Lebenspartner Hendrik Schwarzer für die durchweg liebevolle und aufbauende Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit.

#### **7.4. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....