

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Zentrum für Innere Medizin
III. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor Prof. Dr. med. Rolf Stahl

**Die Rolle von Myeloperoxidase bei der Pathogenese
Hypertonie-induzierter Nierenschäden**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Dr.med.)
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg,

vorgelegt von

Robin Schmidt-Haupt
aus Freiburg i.Br.

Hamburg, 2010

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 23.06.2011**

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

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:
Prof. Dr. Ulrich Wenzel**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter:
PD Dr. Tim Magnus**

**Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin:
Prof. Dr. Sigrid Harendza**

Die vorliegende Dissertationsschrift entstand im Rahmen eines Stipendiums des Graduiertenkollegs „Entzündung und Regeneration“ der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg im Förderzeitraum 2007-2008.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift wurden vom Promovierenden bei der Jungen Niere 2009 in München vorgestellt und unter die besten drei Vorträge gewählt.

Meinen Eltern
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Teil I Einleitung	1
1.1 Arbeitshypothese und Versuchsziel	2
1.2 Die Niere und ihre Funktionen	2
1.3 Hypertonie-induzierte Nierenschäden (Nephrosklerose)	4
1.3.1 Pathogenese Hypertonie-induzierter Nierenschäden	4
1.3.2 Chronisches Nierenversagen	5
1.4 Myeloperoxidase (MPO)	6
1.4.1 Struktur von Myeloperoxidase (MPO)	6
1.4.2 Vorkommen von Myeloperoxidase (MPO)	7
1.4.3 Funktion von Myeloperoxidase (MPO)	8
Teil II Material und Methoden	10
2.1 Das DOCA + Ang II-Hochdruckmodell	11
2.1.1 Hintergrund	11
2.1.2 Versuchsaufbau und Versuchsprotokoll	11
2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung	12
2.2.1 Tierkollektiv	12
2.2.2 MPO-Knockout-Mäuse (MPO-KO-Mäuse)	13
2.2.3 Haltungsbedingungen	13
2.2.4 Genehmigung	14
2.3 Operationen und Organentnahme	14
2.3.1 Allgemeines Operationsprotokoll	14
2.3.2 Uninephrektomie	14
2.3.3 Subkutane Implantation von DOCA-Pellets	15
2.3.4 Subkutane Implantation von Ang II-Minipumpen	15
2.3.5 Organentnahme	16
2.4 Blutdruckmessung	17
2.5 Körpergewichtsmessung	18
2.6 Bestimmung des relativen Nierengewichtes	18
2.7 Bestimmung des relativen Herzgewichtes	18
2.8 Proteinuriediagnostik	19
2.8.1 Gewinnung von Mausurin zur Analyse	19
2.8.2 Quantifizierung der Albuminausscheidung im Urin (ELISA)	19
2.8.3 Messung der Kreatininkonzentration im Mausurin	21
2.8.4 Uringelektrophorese zur Charakterisierung der Proteinurie	22
2.9 Plasmaparameter	22
2.9.1 Gewinnung von Heparinplasma aus Mausblut	22
2.9.2 Harnstoff, Kreatinin und Cystatin-C	23
2.9.3 Cholesterin und Triglyceride	23
2.10 Histologie	23
2.10.1 Fixierung und Einbettung	23
2.10.2 PAS-Färbung (Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung)	23
2.10.3 F4/80-Färbung	24
2.10.4 CD3-Färbung	25
2.10.5 Neutrophilen-Färbung	25
2.10.6 Nierenmorphologie	26
2.10.7 Quantifizierung der Glomerulosklerose	26
2.10.8 Glomerulummorphometrie	27
2.10.9 Quantifizierung von intratubulären Proteinpräzipitaten	27

2.10.10 Bestimmung der Fläche intratubulärer Proteinpräzipitate	27
2.10.11 Quantifizierung der Infiltration von Entzündungszellen	28
2.11 Genexpression	29
2.11.1 Isolierung von RNA aus dem Nierenkortex	29
2.11.2 Qualitative und quantitative Analyse der Nukleinsäurelösung	31
2.11.3 DNase-I-Verdau	31
2.11.4 cDNA-Synthese (RT-PCR)	32
2.11.5 RTQ-PCR (Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction)	33
2.12 Konzentration von Myeloperoxidase (MPO) im Plasma	34
2.13 NO-Bioverfügbarkeit	35
2.14 Statistik	35
Teil III Ergebnisse	36
3.1 Blutdruck	37
3.2 Mortalität	38
3.3 Körpergewichtsverlauf	39
3.4 Relative Nierengewichte	40
3.5 Nierenhistologie	42
3.5.1 Histologische (lichtmikroskopische) Betrachtung	42
3.5.2 Nierenmorphologie	43
3.5.3 Glomerulosklerose	45
3.5.4 Glomerulusvolumen	47
3.5.5 Anzahl und Fläche intratubulärer Proteinpräzipitate	49
3.5.6 Infiltration von Monozyten/Makrophagen in die Niere	50
3.5.7 Infiltration von T-Zellen in die Niere	52
3.5.8 Infiltration von Neutrophilen in der Niere	53
3.6 Proteinuriediagnostik	54
3.6.1 Diagnostischer Wert der Proteinuriediagnostik	54
3.6.2 Urinsticks	54
3.6.3 Ergebnisse der Albumin/Kreatinin-Bestimmung im Urin	55
3.6.4 Ergebnisse der Uringelektrophorese	56
3.7 Blutfettwerte	58
3.7.1 Diagnostischer Wert der Dyslipidämie	58
3.7.2 Cholesterin	60
3.7.3 Triglyceride	61
3.8 Renale Genexpression	63
3.8.1 MCP-1/CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)	63
3.8.2 TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)	65
3.8.3 IP-10 (CXCL10)	66
3.8.4 Kollagen Typ-I	67
3.8.5 Kollagen Typ-III	69
3.8.6 PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1)	70
3.8.7 TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1)	71
3.8.8 iNOS (induzierbare NO-Synthase)	72
3.9 Nierenfunktion	73
3.9.1 Kreatinin	74
3.9.2 Harnstoff	75
3.9.3 Cystatin C	76
3.10 NO-Bioverfügbarkeit	77
3.10 Herzveränderungen	79
3.10.1 Relative Herzgewichte	79
3.10.2 Kardiale Genexpression	80
3.11 Konzentration von Myeloperoxidase im Plasma	83
Teil IV Zusammenfassung und Diskussion	85

4.1 Inflammation	85
4.2 Nierenfibrose	86
4.3 Proteinurie und Dyslipidämie	88
4.4 Nierenfunktion	89
4.5 Herzveränderungen	90
4.6 Diskussion	91
4.7 Limitationen	93
Teil V Ausblick: MPO und unilaterale Ureterobstruktion	95
5.1 Obstruktive Nephropathie	95
5.2 Das Modell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO)	95
5.3 Ergebnisse der UUO in MPO-defizienten Mäusen	97
5.4 Diskussion	98
Teil VI Anhang	100
6.1 Abkürzungsverzeichnis	100
6.2 Literaturverzeichnis	102
6.3 Danksagung	106
6.4 Eidesstattliche Erklärung	107

Teil I Einleitung

1.1 Arbeitshypothese und Versuchsziel

1.2 Die Niere und ihre Funktionen

1.3 Hypertonie-induzierte Nierenschäden (Nephrosklerose)

1.4 Myeloperoxidase

1.1 Arbeitshypothese und Versuchsziel

Die für Hypertonie-induzierte Nierenschäden verantwortlichen zellulären und molekularen Mechanismen sind noch ungeklärt. Ziel des Versuchsvorhabens war es, die Rolle der Myeloperoxidase (MPO) bei der Pathogenese Hypertonie-induzierter Nierenschäden zu untersuchen. Die Tatsache, dass Phagozyten, d.h. Neutrophile, Monozyten und Makrophagen, entscheidende Effektorzellen bei der Pathogenese von degenerativen Nierenerkrankungen wie der Nephrosklerose sind (Wada et al., 2007), lässt annehmen, dass die in Neutrophilen und Monozyten exprimierte Myeloperoxidase dabei eine entscheidende Rolle spielen könnte. Bei der Entwicklung anderer mit chronischen Entzündungsprozessen einhergehenden Erkrankungen wurden der Myeloperoxidase sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Eigenschaften nachgesagt. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Fragestellung untersucht, welche Rolle die Myeloperoxidase bei der Pathogenese von Hypertonie-induzierten Nierenschäden spielt.

1.2 Die Niere und ihre Funktionen

Zu den Hauptfunktionen der Nieren zählen die Homöostase des Wasser-Elektrolyt-, Säure-Base- und Mineralhaushaltes sowie die Ausscheidung von harnpflichtigen Stoffwechselendprodukten und Giftstoffen. Für diese Funktionen verantwortlich sind eine Vielzahl von Nephronen. Das Nephron, welches aus einem Nierenkörperchen (Glomerulus) und seinem ableitenden Nierenkanälchen (Tubulus) besteht (Abbildung 1), ist die kleinste Funktionseinheit der Niere. Die Glomeruli erhalten ihren arteriellen Blutzufuhr aus den Vasa afferentia. Diese Arteriolen entsprechen den Endästen eines Gefäßbaumes, welcher ausgehend von der A.renalis das Nierenparenchym durchzieht. Jeweils ein Vas afferens dringt am Blutpol in den Glomerulus ein, um sich hier in ein intraglomeruläres Kapillarnetz aufzufächern. Dieses Kapillarknäuel ist von Podozyten umspinnen und in Mesangiumzellen und Bindegewebsmatrix eingebettet.

Glomeruluskapillaren, glomeruläre Basalmembran (GBM) und Podozyten bilden zusammen den Glomerulusfilter der Blut-Harn-Schranke. Durch diesen Glomerulusfilter wird Blutplasma der Glomeruluskapillaren als Primärharn in den Bowmann'schen Kapselraum abfiltriert. Pro Minute durchfließen ca. 600 ml Plasma die Glomeruli der Niere, wovon ca. 20%, d.h. 120 ml Primärharn pro Minute, abfiltriert werden. Triebkraft für die Ultrafiltration ist ein Druckgradient über den Glomerulusfilter, welcher vom hydrostatischen und kolloidosmotischen Druck innerhalb der Glomeruluskapillaren abhängig ist. Die Permeabilität von Makromolekülen in den Primärharn ist von deren Form, Radius und Ladung abhängig. Grob geschätzt werden Makromoleküle über 60 kDa und einem Radius über 3 nm nicht filtriert und verbleiben im Kapillarknäuel.

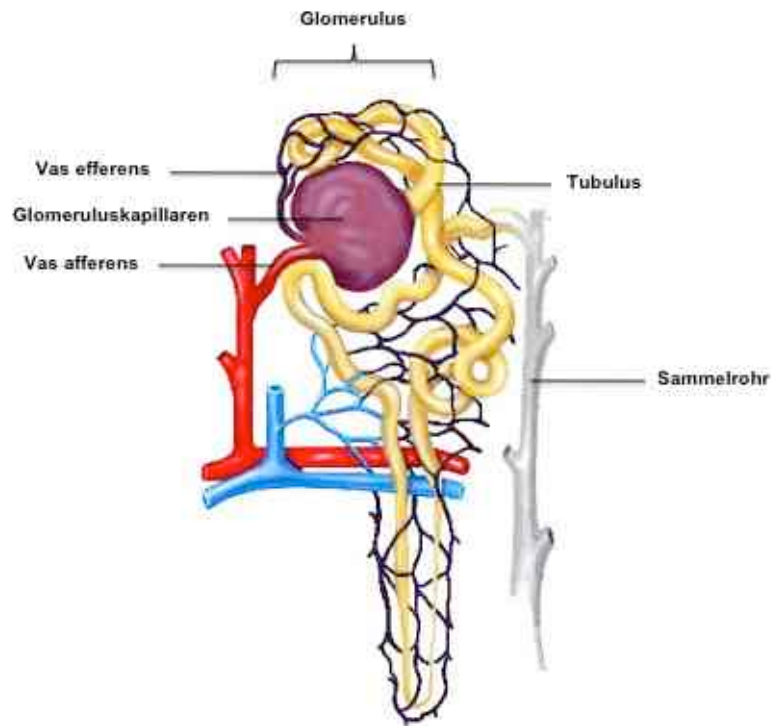


Abbildung 1 Das Nephron (modifiziert)
 © University of Canterbury, New Zealand

Nach Filtration des Primärharns werden die Glomeruluskapillaren über ein Vas efferens, welches den Glomerulus ebenfalls am Blutpol verlässt, drainiert. Die Vasa efferentia der oberflächlich gelegenen subkapsulären und mediokortikalen Nephrene fächern sich folgend in ein zweites peritubuläre Kapillarnetz, welches die in der Nierenrinde (Cortex) gelegenen Tubuli umspinnt, auf. Die Vasa efferentia der tieferliegenden juxtaglomerulären Nephrene durchziehen dagegen als Vasa recta das Nierenmark (Medulla). Der venöse Abfluss erfolgt über die V.renalis in die V.cava inferior.

Der in den Bowmann'schen Kapselraum abfiltrierte Primärharn verlässt den Glomerulus am Harnpol und fließt in den proximalen Tubulus ab. Diesem schließt sich der intermediäre und folgend distale Tubulus an, letzterer mündet letztendlich in ein Sammelrohr. Der Urin erreicht dadurch das Nierenbecken und fließt über die ableitenden Harnwege ab. Vor der Ausscheidung werden dem Primärharn während der Passage durch das Tubulussystem jedoch u.a. Wasser, Natriumchlorid (NaCl), Magnesium (Mg^{2+}) und Calcium (Ca^{2+}) sowie Hydrogenphosphat (HPO_4^{2-}) und Harnstoff (NH_3) entzogen, sowie nach Bedarf Protonen (H^+) und Hydrogenbikarbonat (HCO_3^-) und Ammonium (NH_4^+) resorbiert bzw. sezerniert. Auch Glukose, Aminosäuren und filtrierte Proteine werden physiologischerweise fast vollständig rückresorbiert. Harnpflichtige Endprodukte des Stickstoff- und Protein- und Purinstoffwechsel werden dagegen in Form von Harnstoff, Kreatinin und Harnsäure ausgeschieden. Insgesamt werden

ca. 99% des Ultrafiltratvolumens rückresorbiert und von den täglich produzierten ca. 170 l Primärharn nur ca. 1,7 l eines hyperosmolaren Endharns ausgeschieden.

1.3 Hypertonie-induzierte Nierenschäden (Nephrosklerose)

1.3.1 Pathogenese Hypertonie-induzierter Nierenschäden

Ca. 20% aller Erwachsenen in der westlichen Welt sind von Bluthochdruck betroffen was die arterielle Hypertonie zu einer der häufigsten Erkrankungen überhaupt macht. Eine über Jahre bestehende arterielle Hypertonie gilt als Risikofaktor für die Entstehung von Arteriosklerose und wirkt sich insbesondere schädigend auf Arterien und Arteriolen aus. Der genaue kausale Zusammenhang zwischen Bluthochdruck und Arteriosklerose ist gegenwärtig noch unverständlich. Dem amerikanischen Arterioskleroseforscher Russel Ross (Ross, 1977) zufolge ist der für die Entstehung von Arteriosklerose entscheidende Initialschritt die Verletzung der Arterienwand („response to injury hypothesis“). Diese Initialverletzung entsteht häufig, im Sinne eines Barotraumas, auf dem Boden einer chronischen arteriellen Hypertonie.

Die häufigsten Folgeerkrankungen von chronischem Bluthochdruck, und der damit assoziierten Arteriosklerose, nämlich Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt sowie Schlaganfall, zählen zu den geläufigsten Todesursachen in den Industrienationen. Nach Herz und Gehirn wird jedoch auch häufig die Niere von der hypertensiven Belastung in Mitleidenschaft gezogen. Das in der Niere entstehende Krankheitsbild entspricht der Arteriosklerose der Nierengefäße und wird deshalb Nephrosklerose genannt.

Der für die Nephrosklerose ursächliche Pathomechanismus ist gegenwärtig im Detail noch unverständlich. Bekannt ist jedoch, dass arterielle Hypertonie sich insbesondere auf die kleinsten Arterien der Niere, die Nierenarteriolen, schädigend auswirkt. Normalerweise sind diese vor systemischen Blutdruckschwankungen durch den Bayliss-Effekt geschützt. Dieser Schutzmechanismus induziert bei Blutdruckanstieg im Bereich der Vasa afferentia eine Vasokonstriktion, wodurch der intravasale Druck im Glomerulus konstant gehalten wird (Bidani et al., 2004). Diese myogene Autoregulation der Nierendurchblutung ist beim Menschen jedoch nur im Bereich systolischer Blutdrücke von ca. 80-180 mmHg wirksam. Höhere Blutdrücke im Bereich der präglomerulären Arteriolen führen zu Druckbelastung, konsekutiver Gefäßdilatation und daraus resultierenden Dehnungsschäden (Meyrier, 1999). Folge dieser Gefäßschädigungen sind komplexe Umbauprozesse mit Ablagerung PAS-positiven Materials innerhalb der Gefäßwand (Marcantoni et al., 2007). Die daraus resultierende Verbreiterung der Gefäßwand führt wiederum zur Einengung des Gefäßlumens und fortgeschritten zu Gefäßverschlüssen, wodurch Ischämie und Fibrose im Bereich der betreffenden Glomeruli und Tubuli verursacht werden. Nephrosklerotische Veränderungen ziehen aus diesem Grunde zunehmend alle Strukturen der Niere in Mitleidenschaft.

Zu den histomorphologischen Korrelaten nephrosklerotischer Nierenschäden zählen Atrophie, Fibrose und Sklerose im Bereich von Arteriolen, Glomeruli, Tubuli und Interstitium (Marcantoni et al., 2007). Geschädigte Glomeruli werden in diesem Kontext durch Ablagerungen PAS-positiven Materials im Sinne einer Glomerulosklerose auffällig. Betroffene Tubuli sind häufig atrophiert und dilatiert. Im Interstitium werden Infiltrate von Entzündungszellen sowie ausgedehnte Narbenzonen beobachtet (Meyrier, 1999). Diese gleichmäßig verteilten Narbenbildungen werden auch makroskopisch in Form einer höckrig granulierten Veränderung der Nierenoberfläche sichtbar.

In Abhängigkeit ihrer Entwicklungsgeschwindigkeit werden zwei Formen der Nephrosklerose unterschieden. Als benigne Nephrosklerose wird die sich langsam entwickelnde Form der Nierenarteriosklerose bezeichnet. Von ihr abzugrenzen ist die rasant fortschreitende maligne Nephrosklerose, welche auf dem Boden einer massiven arteriellen Hypertonie entsteht und mit akuten Rupturierungsschäden von Gefäßen und Glomeruli einhergeht (Bidani et al., 2004). In beiden Fällen gehen die nephrosklerotischen Veränderungen über Jahre hinweg mit einer progredienten Abnahme der Nierenfunktion einher, an deren Ende das chronische Nierenversagen steht.

1.3.2 Chronisches Nierenversagen

Das chronische Nierenversagen ist die gemeinsame Endstrecke vieler verschiedener über Jahre bestehenden Nierenerkrankungen. Unabhängig der Genese kommt es dabei progredient zum Untergang funktionstüchtiger Nephrone und damit Abnahme der exkretorischen und inkretorischen Nierenfunktion.

Maß für die exkretorische Nierenfunktion ist die glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Beim jungen nierengesunden Erwachsenen beträgt sie ca. $120 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Gehen funktionstüchtiger Nephrone verloren kommt es zur Verringerung der renalen Filtrationsfläche, was sich in der Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) widerspiegelt. Ab einer GFR unter $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ist mit dem Anstieg harnpflichtiger Substanzen im Serum zu rechnen. Im Terminalstadium des chronischen Nierenversagens sinkt die Nierenleistung unter 15% der Norm, was einer glomerulären Filtrationsrate (GFR) unter $15 \text{ ml/min/1,73m}^2$ entspricht. Die Entgiftungsfunktion der Nieren ist nun nicht mehr gewährleistet, eine Akkumulation von Urämietoxinen mit drohender Urämie ist die Folge. Zu diesen Urämietoxinen gehören v.a. Abbauprodukte des Protein- und Purinstoffwechsels. In diesem Fall ergibt sich die Notwendigkeit der Nierenersatztherapie in Form einer Dialyse oder Nierentransplantation.

Die Prävalenz der chronischen Nierenersatztherapie betrug dem Jahresbericht 2006/2007 der Quasi-Niere (Frei et al., 2007) zufolge in Deutschland 1.114 Patienten pro Millionen Einwohner. Die Nephrosklerose ist dabei für ca. 25% aller neu auftretenden dialysepflichtigen

Niereninsuffizienzen verantwortlich. Ursächlich dafür ist die hohe Prävalenz von Bluthochdruck in den Industrienationen wie Deutschland. Arterielle Hypertonie steht damit, trotz stetiger Fortschritte der antihypertensiven Therapiemöglichkeiten, auf Platz 2 der Hauptursachen des chronischen (dialysepflichtigen) Nierenversagens. Nennenswert ist, dass arterielle Hypertonie nicht nur direkte Ursache eines chronischen Nierenversagens sein kann, sondern auch die Progression aller anderen Nierenerkrankungen unabhängig ihrer Genese beschleunigt. Arterielle Hypertonie sowie antihypertensive Therapie sind deshalb bei allen Nierenerkrankungen von zentraler Bedeutung.

1.4 Myeloperoxidase (MPO)

1.4.1 Struktur von Myeloperoxidase (MPO)

Reife Myeloperoxidase ist ein $\alpha_2\beta_2$ -Dimer und besteht aus zwei identischen Untereinheiten welche durch eine Disulfidbrücke verbunden sind (Abbildung 2).

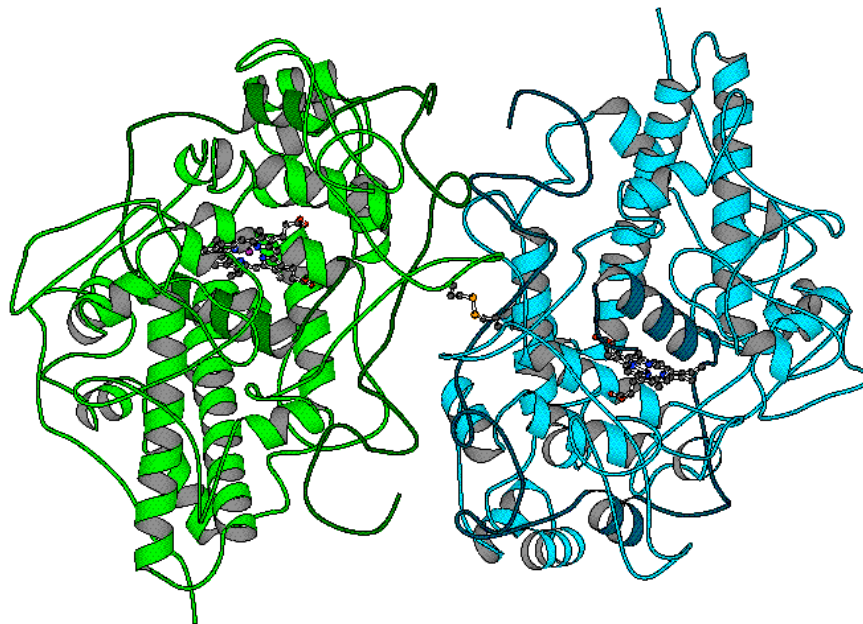


Abbildung 2 Struktur der Myeloperoxidase
© PROMISE, USA

Jedes Monomer besteht aus einer schweren Kette, welche kovalent gebunden ein katalytisches Hämgerüst enthält, sowie aus einer leichten Kette (Fenna et al., 1995). Das Zentralion des Hämanteils entspricht einem dreiwertigen Eisenatom (Fe^{3+}), welches die MPO befähigt, an Elektronenübertragungsreaktionen teilzunehmen. Die Myeloperoxidase ist das Produkt eines einzelnen Gens, welches sich auf dem langen Arm von Chromosom 17 in den Segmenten q12-24 befindet und eine Länge von ca. 14 kb hat. Das Myeloperoxidasegen kodiert demnach sowohl für die leichten als auch schweren Ketten beider Untereinheiten. Das initia-

le Translationsprodukt des Myeloperoxidasegens ist ein ca. 80 kDa schweres Präkursorprotein, welches als preproMPO bezeichnet wird. Aus dieser werden durch co- bzw. posttranslationale Modifikation und Proteolyse die entsprechenden Ketten jeweils einer Untereinheit gebildet. Nach Insertion des Häms entsteht über die Vorstufe der proMPO nach Dimerisierung die enzymatisch aktive reife MPO, welche eine molekulare Masse von ca. 164 kDa besitzt (Lau et al., 2006).

Reife MPO ist ein glykosyliertes, argininreiches Hämprotein. Ihre Argininseitenketten verleihen der MPO starke basische (kationische) Eigenschaften und einen isoelektrischen Punkt über 10. Aus diesem Grund bindet MPO an negativ geladene Oberflächen, eine Tatsache welche nicht unerheblich für ihre Funktion ist.

1.4.2 Vorkommen von Myeloperoxidase (MPO)

Die Myeloperoxidase ist ein von Neutrophilen und in geringerem Ausmaß auch von Monozyten synthetisiertes Enzym.

1. **Neutrophile:** Der neutrophile Granulozyt (Neutrophile) ist der häufigste Typ der weißen Blutzellen. Beim erwachsenen Menschen zählen ca. 60% aller Leukozyten im Blut zu dieser Population. Neutrophile gehören wie Makrophagen zu den klassischen Entzündungszellen. Sie sind Teil der angeborenen (unspezifischen) Immunabwehr und auf Phagozytose und Zerstörung von Mikroorganismen spezialisiert. Neutrophile dienen v.a. der unspezifischen Abwehr („first line defense“) von in den Organismus eingedrungenen Bakterien, Viren und Pilzen.

MPO findet sich in den azurophilen Granula von Neutrophilen gespeichert und macht bis 5% deren Gesamtproteins aus (Shultz et al., 1962). Die Synthese von MPO beginnt während der Myelopoese von Neutrophilen im Stadium des Promyelozyten und endet mit Beginn des Myelozytenstadiums. Anschließend werden die MPO-haltigen Granula nur noch auf die entsprechenden Tochterzellen verteilt.

2. **Monozyten:** Monozyten stellen beim erwachsenen Menschen ca. 5% aller Leukozyten im Blut. Sie entsprechen den Vorläuferzellen der Makrophagen. Monozyten/Makrophagen zählen wie Neutrophile zu den klassischen Entzündungszellen. Auch sie sind zur Phagozytose und Zerstörung von Mikroorganismen befähigt. In diesem Kontext bilden Makrophagen in den Geweben „Abwehrnetze“ und haben dadurch Erstkontakt („first line defense“) mit potentiellen Antigenen.

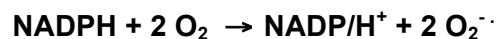
MPO wird während der Myelopoese der Monozyten im Knochenmark im Stadium der Promyelomonocyten exprimiert und macht ca. 1% deren Gesamtproteins aus (Bos et al., 1978). Reife Monozyten enthalten zwar noch MPO-haltige Granula, verlieren diese jedoch i.d.R. bei der Reifung zu Gewebemakrophagen. Es wird angenommen, dass Gewebema-

krophagen MPO auch aus ihrer Umgebung aufnehmen können, z.B. durch Phagozytose von Neutrophilen.

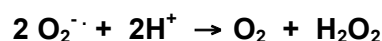
1.4.3 Funktion von Myeloperoxidase (MPO)

Die Myeloperoxidasereaktion trägt zur Mikrobizidität von Neutrophilen bei und spielt deshalb eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen durch Neutrophile. Neutrophile sind in der Lage, opsonisierte pyogene Pathogene rezeptorvermittelt zu phagozytieren. Dabei ist vornehmlich die Opsonisation mit Antikörpern und Komplement entscheidend. Mit dem Fc-Rezeptor sowie dem C3b-Rezeptor besitzen Neutrophile die dafür passenden Rezeptoren.

Die Bindung opsonisierter Pathogene an die entsprechenden neutrophilen Rezeptoren induziert deren Invagination in ein Phagosom, ein Prozess der als Phagozytose bezeichnet wird. Dieses Phagosom verschmilzt folgend mit Vertretern der zwei Granula-Typen, welche sich im Zytoplasma der Neutrophilen finden. Azurophile Granula entleeren dabei u.a. MPO in das Phagosom, in den spezifischen Granula findet sich membranständig die NADPH-Oxidase. Die NADPH-Oxidase überträgt folgend je ein Elektron von zytoplasmatisch bereitgestelltem NADPH auf intraphagosomal befindliche Sauerstoffmoleküle (O_2).

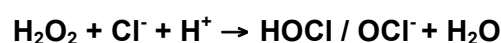


Innerhalb des Phagosoms entstehen dadurch Superoxidanionen ($O_2^{\cdot -}$), welche entweder spontan oder durch Superoxiddismutase katalysiert zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduziert werden.



Der Reaktionsgleichung ist zu entnehmen, dass die Bildung von H_2O_2 mit einem massiven Verbrauch von O_2 einhergeht. Dieser gesteigerte Sauerstoffverbrauch wird als „respiratory burst“ bezeichnet.

Intraphagosomal erzeugtes H_2O_2 kann per diffusionem phagozytierte Pathogene erreichen und diese über seine stark oxidierende und damit mikrobizide Wirkung zerstören. Obwohl H_2O_2 an sich ein ausreichend mikrobizides Potential besitzt, wird es in einer Folgereaktion durch MPO katalysiert auch zu hypochloriger Säure / Hypochlorit ($HOCl/OCl^-$) umgesetzt. Die im Rahmen der Degranulation in das Phagosom freigesetzte MPO bindet aufgrund ihrer basischen Argininseitenketten an die negativ geladene Oberfläche von invaginierten Mikroorganismen. In unmittelbarer Nähe zum Mikroorganismus katalysiert MPO nun die 2-Elektronen-Oxidation von Chloridionen durch H_2O_2 zu $HOCl$ (Klebanoff, 1999).



$HOCl$ ist wie H_2O_2 ein starkes Oxidanz, jedoch etwa 100 mal reaktiver als Wasserstoffperoxid. $HOCl$ reagiert mit einer Vielzahl von oxidierbaren Biomolekülen via Chlorination und

kann dadurch Mikroorganismen terminal schädigen.

Die beschriebenen Reaktionsschritte können jedoch nicht nur intrazellulär, sondern auch im Extrazellulärraum ablaufen. Bei Stimulation von Neutrophilen durch opsonisierte Pathogene, deren Größe die Phagozytose nicht erlaubt, kann MPO auch in den Extrazellulärraum sezerniert werden. Zur Gewährleistung der Immunabwehr muss bei der folgenden Bildung der reaktiven Oxidantien im Extrazellulärraum unter Umständen dann auch die Schädigung von gesundem Gewebe in Kauf genommen werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass proMPO teilweise vom Transport in die entsprechenden zytoplasmatischen Granula abweichend als Monomer konstitutiv in den Extrazellulärraum sezerniert wird (Hansson et al., 2006). Reife MPO und proMPO besitzen identische enzymatische Eigenschaften (Furtmüller et al., 2001).

Die Myeloperoxidaseaktivität im Intra- und Extrazellulärraum scheint neben ihrer Bedeutung bei der Immunabwehr weitere und bisher nur unvollständig verstandene Auswirkungen zu haben. Über die Oxidation von Cl^- oder SCN^- durch MPO entstehen die reaktiven Moleküle HOCl/OCl^- bzw. HOSCN , welche ihrerseits zur Chlorination bzw. Oxidation von Proteinen, Lipiden und DNA in der Lage sind (Malle et al., 2007). Weitere Reaktionsprodukte der Myeloperoxidaseraktion sind NO_2^\bullet and Tyr^\bullet , welche sich von L-Tyrosin bzw. NO_2^- ableiten. Für diese Radikale konnten gezeigt werden, dass sie ebenfalls an der Modifikation von Proteinen und Lipiden beteiligt sind (Hazen et al., 1997). Ferner gibt es Anzeichen dafür, dass MPO Stickstoffmonoxid (NO) zu Nitrit (NO_2^-) oxidieren und dadurch die Stickstoffmonoxidbioverfügbarkeit verringern kann (Eiserich et al., 2000).

Zusammengefasst scheinen die Funktionen der Myeloperoxidase bzw. die von ihr generierten Reaktionsprodukte weit über die gut beschriebene Mikrobizidität hinauszugehen. Im Rahmen verschiedener inflammatorischer Prozesse konnten sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte nachgewiesen werden (Brennan et al., 2001).

Teil II Material und Methoden

- 2.1 Das DOCA+Ang II-Hochdruckmodell
 - 2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung
 - 2.3 Operationen und Organentnahme
 - 2.4 Blutdruckmessung
 - 2.5 Körpergewichtsmessung
 - 2.6 Bestimmung des relativen Nierengewichtes
 - 2.7 Bestimmung des relativen Herzgewichtes
 - 2.8 Proteinuriediagnostik
 - 2.9 Plasmaparameter
 - 2.10 Histologie
 - 2.11 Genexpression
 - 2.12 Konzentration von Myeloperoxidase im Plasma
 - 2.13 NO-Bioverfügbarkeit
 - 2.14 Statistik
-

2.1 Das DOCA + Ang II-Hochdruckmodell

2.1.1 Hintergrund

Versuchsmäuse mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6J sind relativ resistent gegenüber Hypertonie-induzierten Nierenschäden (Hartner et al., 2003). Erst die Kombination von DOCA (DOCA) und Angiotensin II (Ang II) ermöglicht auch in C57BL/6J-Mäusen die Induktion einer arteriellen Hypertonie, welche längerfristig auswertbare Hochdruckschäden in Nieren und anderen Organen wie dem Herzen verursacht (Kirchhoff et al., 2007).

Sowohl DOCA als auch Ang II wirken blutdrucksteigernd. Die alleinige Gabe von DOCA simuliert einen Hyperaldosteronismus, mit konsekutiver Natrium- und Wasserretention und ist klassisches Modell einer salzabhängigen arteriellen Hypertonie mit supprimiertem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Die Gabe von Ang II induziert dagegen zudem auch eine auf Vasokonstriktion beruhende arterielle Hypertonie. Das DOCA + Ang II-Modell nutzt den synergistischen Effekt der Kombination beider Substanzen.

2.1.2 Versuchsaufbau und Versuchsprotokoll

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Versuchstiere wurden entsprechend ihres genetischen Hintergrundes jeweils einer Kontrollgruppe sowie einer Hochdruckgruppe zugeteilt. Da Kontroll- und Hochdruckkollektiv jeweils in Mäuse mit Wildtyp-Hintergrund (C57BL/6J WT) und MPO-Knockout-Hintergrund (C57BL/6J MPO-KO) geteilt wurden, entstanden insgesamt die der Abbildung 3 zu entnehmenden vier Gruppen.

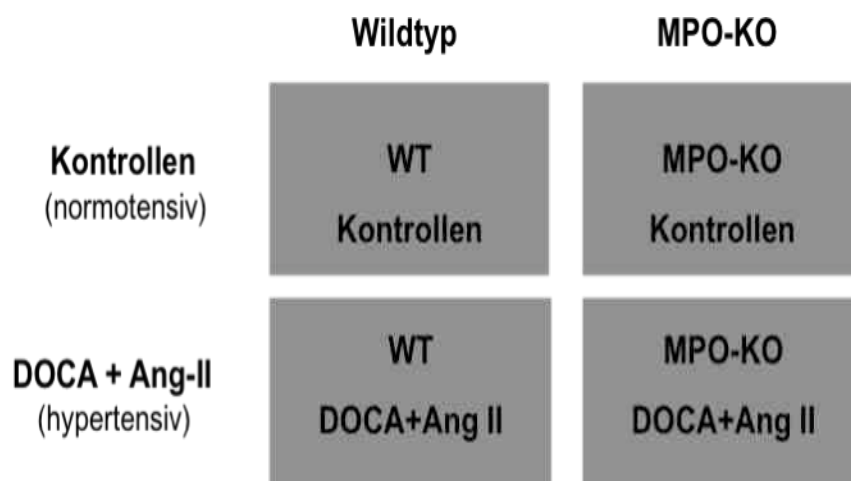


Abbildung 3 Versuchsgruppen

Bei Versuchsbeginn (Tag 0) wurde allen Versuchsmäusen durch unilaterale Nephrektomie die rechte Niere entfernt. Die Kontrolltiere wurden im weiteren Versuchsverlauf unter norma-

len Bedingungen gehalten und bei Versuchsende am Tag 35 während der Organentnahme getötet (Abbildung 4).



Abbildung 4 Versuchsprotokoll der Kontrollgruppen

In den beiden Hochdruckgruppen wurde dagegen ein experimenteller Bluthochdruck induziert. Nach unilateraler Nephrektomie am Tag 0 wurden die Tiere beider Hochdruckgruppen dafür am Tag 14 der subkutanen Implantation jeweils eines 50 mg DOCA-Pellets (Deoxycorticosterone Acetate, Innovative Research of America, USA) unterzogen. Am Tag 21 erfolgte dann die subkutane Implantation jeweils einer mit Ang II-Lösung gefüllten Minipumpe (Micro-osmotic Pump 1002, Alzet, USA). Diese Minipumpen wurden mit in steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung (Sodium Chloride 0,9%, Baxter, Belgium) gelöstem Ang II-Pulver (Human Synthetic Angiotensin II, Sigma, USA) gefüllt, und förderten 1,5 ng Ang II pro Minute und Gramm Körpergewicht. Ab diesem Zeitpunkt erhielten die Versuchstiere der beiden Hochdruckgruppen zusätzlich ausschließlich 1 %ig NaCl (Sodium Chloride, J.T.Baker, Holland) enthaltendes Trinkwasser. Während der folgenden 14 tägigen Hochdruckperiode entstanden die zu untersuchenden Hypertonie-abhängigen Organschäden, woraufhin am Tag 35 der jeweilige Versuchsdurchgang mit einer Organentnahme beendet wurde (Abbildung 5).

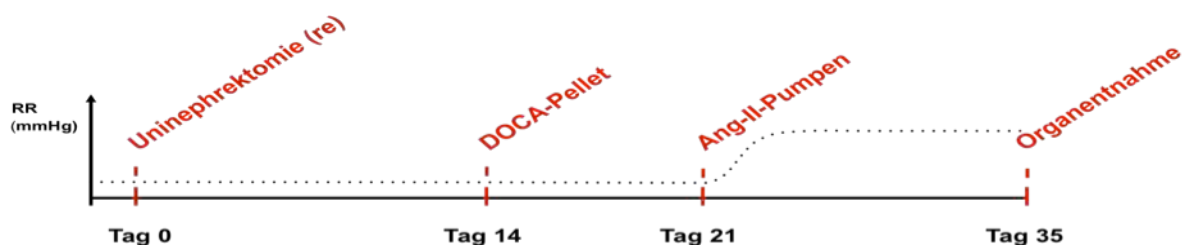


Abbildung 5 Versuchsprotokoll der Hochdruckgruppen

2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

2.2.1 Tierkollektiv

In den entsprechenden Versuchsgruppen wurden 10-12 Wochen alte männliche Mäuse mit dem Hintergrund C57BL/6J und einem Körpergewicht von 23 g bis 29 g verwendet. Sowohl WT-Mäuse (C57BL/6J) als auch MPO-KO-Mäuse (B6.129X1-Mpotm1Lus/J) wurden ursprünglich bei Jackson Laboratory (Maine, USA) kommerziell erworben.

2.2.2 MPO-Knockout-Mäuse (MPO-KO-Mäuse)

Die verwendeten MPO-Knockout-Mäuse wurden ursprünglich von Aldons Lysis (University of California, Los Angeles, USA) erzeugt und sind bei Jackson Laboratory kommerziell erhältlich.

Knockout-Tiere sind beliebte Forschungsmodelle zur Untersuchung von Funktion und Rolle bestimmter Gene bzw. ihrer Produkte. Der „Knockout“ entspricht der gezielten Inaktivierung eines bestimmten Gens durch genetische Manipulation embryonaler Stammzellen. Zunächst wird dafür ein Inaktivierungsvektor hergestellt, welcher eine Sequenz des zu inaktivierenden Gens enthält, die aber zur Erzeugung des Knockouts entsprechend verändert ist. Der für den Myeloperoxidase-Knockout verwendete Inaktivierungsvektor wurde konstruiert, um ein vorzeitiges Stopcodon innerhalb von Exon 7 des Myeloperoxidasegens einzufügen. Dieser Inaktivierungsvektor wurde mittels Elektroporation in noch undifferenzierte von 129X1/SvJ-Mäusen abgeleitete RW4 embryonale Stammzellen eingebracht. Durch homologe Rekombination wurden daraufhin Abschnitte des Inaktivierungsvektors mit dem Targetgen im Mausgenom ausgetauscht. Zur Identifizierung der rekombinierten Stammzellen war dem Inaktivierungsvektor zusätzlich eine Neomycinresistenz sowie das Gen für die Thymidinkinase des Herpes-simplex-Virus (HSV-tk) beigefügt. Durch Applikation von Neomycin konnten folgend die Zellen selektiert werden, welche den Inaktivierungsvektor erfolgreich in ihr Genom rekombiniert hatten. Bei Einbau des Inserts an der gewünschten Stelle wird die HSV-tk zerstört. Bei anschließender Behandlung mit dem Virostatikum Ganciclovir überleben nur die Zellen, welche den Inaktivierungsvektor an richtiger Stelle rekombiniert haben. Die korrekt rekombinierten Stammzellen wurden folgend in Blastozysten eingebracht und in den Uterus einer Leihmuttermaus implantiert. Die sich davon ableitenden chimeren Mäuse wurden nach ihrer Geburt auf C57BL/6J Hintergrund zurückgekreuzt. Durch weitere Kreuzung wurden homozygote Mäuse erzeugt, bei denen alle Zellen den gewünschten Knockout besaßen. Zur Aufrechterhaltung der Knockout-Linie werden homozygote Männchen mit homozygoten Weibchen verpaart.

Homozygote MPO-Knockout-Mäuse besitzen eine normale Fertilität und zeigen eine regelrechte Entwicklung sowie keine auffälligen Abnormalitäten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Produkte des Myeloperoxidasegens, d.h. mRNA oder Protein, sind in den Knockout-Mäusen jedoch nicht detektierbar. Ihre Neutrophilen und Monozyten besitzen dementsprechend keine endogene Peroxidaseaktivität, die Synthese von HOCl ist ergo nicht vorhanden. Die Superoxidspiegel entsprechen dagegen denen von Wildtyp-Mäusen.

2.2.3 Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere waren in der Versuchstierhaltung des UKE untergebracht. Die Haltung erfolgte tiergerecht unter standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 25 °C

und einem Hell-Dunkel-Zyklus von jeweils 12 Stunden. Die Ernährung bestand aus Trockenpellets (V1536-000 sniffR/M-H, Sniff, Germany) sowie Wasser ad libitum. Die tägliche Betreuung erfolgte durch das Fachpersonal der Versuchstierhaltung des UKE.

2.2.4 Genehmigung

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuche waren gemäß §7 TschG genehmigt („Die Rolle der Myeloperoxidase bei akuter und chronischer Niereninsuffizienz“ (35/08)).

2.3 Operationen und Organentnahme

2.3.1 Allgemeines Operationsprotokoll

Bei sämtlichen operativen Eingriffen erfolgte die Narkoseeinleitung mit einem Gasnarkosegerät im Sinne einer Inhalationsnarkose mit 5 %igem Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluorethyl-difluormethylether, Abbot, USA) im Inspirationsgas, sowie die Aufrechterhaltung der Narkose mit 3-4 %igem Isofluran. Vor Operationsbeginn wurde die erforderliche Narkosetiefe durch Überprüfung auf völliges Fehlen von Reflexen durch Kneifen mittels Pinzette sichergestellt.

Zur Analgesie wurde den Versuchstieren intraoperativ 150 mg/kgKG Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm Tropfen, Ratiopharm, Germany) subkutan mit einer Wirkungsdauer von ca. sechs Stunden gespritzt. Danach sowie an den folgenden drei Tagen erhielten die Tiere 1,3 mg/ml Metamizol über das Trinkwasser.

Um ein intraoperative Auskühlung der Versuchstiere zu verhindern, erfolgten alle Eingriffe auf einem beheizten Operationstisch. Postoperativ wurden die Versuchstiere durch ein Heizkissen vor Unterkühlung geschützt.

Alle Operationen erfolgten unter sterilen Kautelen. Das zu operierende Tier wurde mit einem sterilen OP-Tuch bedeckt, welches nur das Operationsfeld aussparte. Der Operateur trug sterile Handschuhe, Mundschutz und OP-Haube.

Nach jedem operativen Eingriff wurde den Tieren eine 2-tägige Erholungszeit zugestanden. In diesem Zeitraum erfolgten lediglich regelmäßige klinische Untersuchungen, um Operationskomplikationen wie Nahtinsuffizienzen und Wundinfektionen frühzeitig zu erkennen.

Bei Auftreten unzumutbarer und versuchsgefährdender Operationskomplikationen wurde das betroffene Tier aus ethischen Gründen getötet. Bei Notwendigkeit wurde der Tod in Isoflurannarkose durch Dekapitation herbeigeführt.

2.3.2 Uninephrektomie

Die Entfernung der rechten Niere (Uninephrektomie) bei Versuchsbeginn (Tag 0) erfolgte unter Einhaltung des allgemeinen Operationsprotokolls. Nach erfolgreicher Narkotisierung des

zu operierenden Tieres wurde zunächst das Operationsfeld im Bereich der rechten Flanke mit einem Haarschneider (GT104/GH204, Aesculap, Germany) großflächig rasiert, und anschließend eine Hautdesinfektion (Cutasept F, Bode, Germany) durchgeführt.

Das Tegument wurde über einen ca. 20 mm langen Hautschnitt entlang der rechten Flanke des Tieres eröffnet. Über einen ca. 10 mm langen Schnitt durch die muskuläre Bauchdecke wurde die Bauchhöhle eröffnet, und die linke Niere aus dem Retroperitoneum mobilisiert und freipräpariert. Anschließend wurden Nierenarterie, -vene sowie Harnleiter nahe am Nierenhilum mit einer weichen Klemme abgeklemmt und proximal der Klammer über eine Ligatur (Mersilene 2-0, Ethicon, Belgium) definitiv verschlossen. Die Niere wurde anschließend abgesetzt und die Klammer entfernt.

Zwecks Wundverschluss wurde die Bauchdecke über eine fortlaufende Naht (Mersilene 2-0, Ethicon, Belgium) wieder verschlossen, und der Hautschnitt mit Wundklammern (Wundklammern Michel 11x2MM, Braun, Germany) gedeckt und die Narkose ausgeleitet. Die Operationsdauer betrug insgesamt etwa 10 Minuten.

2.3.3 Subkutane Implantation von DOCA-Pellets

Die Implantation des DOCA-Pellets (Deoxycorticosterone Acetate, Innovative Research of America, USA) am Tag 14 erfolgte entsprechend dem allgemeinen Operationsprotokoll. Nach erfolgreicher Narkotisierung wurde zunächst der Nackenbereich mit einem Haarschneider (GT104/GH204, Aesculap, Germany) großflächig rasiert und eine Hautdesinfektion (Cutasept F, Bode, Germany) im Bereich des Operationsfeldes durchgeführt.

Über einen ca. 10 mm messenden Hautschnitt wurde das Tegument im Bereich des Nackens eröffnet und in der Subkutis stumpf eine Tasche freipräpariert. In diese subkutane Tasche wurde folgend das DOCA-Pellet implantiert und der Hautschnitt mittels Wundklammern (Wundklammern Michel 11x2MM, Braun, Germany) verschlossen und die Narkose ausgeleitet.

2.3.4 Subkutane Implantation von Ang II-Minipumpen

Die Implantation der osmotischen Minipumpen (Micro-osmotic Pump 1002, Alzet, USA) am Tag 21 erfolgte gemäß dem allgemeinen Operationsprotokoll. Nach erfolgreicher Narkotisierung wurde zunächst der Nackenbereich mit einem Haarschneider (GT104/GH204, Aesculap, Germany) großflächig rasiert und eine Hautdesinfektion (Cutasept F, Bode, Germany) im Bereich des Operationsfeldes durchgeführt.

Wenn möglich wurden zunächst die Klammern der vorhergehenden Implantation der DOCA-Pellets entfernt. Über einen ca. 10mm messenden Hautschnitt wurde das Tegument im Nacken eröffnet und in der Subkutis stumpf eine Tasche neben dem Implantationsort des DOCA-Pellets freipräpariert. In diese subkutane Tasche wurde dann das DOCA-Pellet implantiert

und der Hautschnitt mittels Wundklammern (Wundklammern Michel 11x2MM, Braun, Germany) verschlossen und die Narkose ausgeleitet. Die Operationsdauer betrug insgesamt etwa 5 Minuten.

Die subkutane Implantation von osmotischen Minipumpen oder Medikamentenpellets ist ein einmaliger und verhältnismäßig schonender Eingriff. Die osmotische Minipumpe sowie das Pellet ersparen den Tieren die bedeutend belastendere tägliche subkutane Injektion der zu verabreichenden Substanz.

2.3.5 Organentnahme

Die Organentnahme bei Versuchsende (Tag 35) erfolgte unter Berücksichtigung des allgemeinen Operationsprotokolls. Da es sich um eine terminale Operation handelte, wurde jedoch auf postoperative Analgesie verzichtet.

Zwecks Organentnahme wurden die Tiere adäquat in Isoflurannarkose versetzt, die Bauchdecke mittels Haarschneider (GT104/GH204, Aesculap, Germany) großflächig rasiert und folgend eine Hautdesinfektion (Cutasept F, Bode, Germany) im Bereich des Operationsfeldes durchgeführt. Über eine mediane Laparotomie von der Symphyse bis zum Sternum wurde die Bauchhöhle eröffnet.

1. **Blutentnahme:** Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde unter Benutzung eines Operationsmikroskopes (Discovery.V8 Stereo, Zeiss, Germany) die Aorta abdominalis im Bereich ihrer Bifurkation freipräpariert, und unter mikroskopischer Sicht mit einer Stahlkanüle (Sterican 30Gx1/2“, Braun, Germany) punktiert. Mit einer 1 ml-Spritze (BD Plastipak 1ml, Becton Dickinson, Spain) wurden jeweils zwischen 500-1000 µl arterielles Blut entnommen. Um eine Koagulation des Blutes zu verhindern, wurden die Spritzen vorher mit Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, Ratiopharm, Germany) versetzt. Anschließend wurde das entnommene Blut in 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Reagiergefäß 1,5 ml, PP, Sarstedt, Germany) überführt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.
2. **Nierenentnahme:** Nach der Blutentnahme wurde die linke Niere freipräpariert, am Nierenhilum abgesetzt und die Nierenkapsel stumpf entfernt. Nach Wiegen des Nierengewichtes wurde mittels Skalpell (Surgical Disposable Scalpel, Braun, Germany) im Bereich des Nierenhilum eine Scheibe für die Histologie abgeschnitten und in ein mit 5 ml 4%iger Formalinlösung (Formaldehydlösung 37% säurefrei, Merck, Germany) gefülltes 10 ml-Röhrchen (Röhre 10 ml, 92x15,2mm, PP, Sarstedt, Germany) überführt. Die verbleibenden Nierenpole wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Reagiergefäß 1,5 ml, PP, Sarstedt, Germany) gegeben und vorübergehend auf Eis gelegt. Unter Kühlung wurde die Nierenpapille mittels Skalpell entfernt, das übrige Nierengewebe mechanisch zerkleinert, in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Reagiergefäß 1,5 ml, PP, Sarstedt, Germany) überführt und in flüssigem

Stickstoff schockgefroren. Das Nierengewebe diente später der Gewinnung von RNA und wurde bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

- Herzentnahme:** Anschließend wurde der Thorax entlang des Sternums eröffnet, das Herz freipräpariert und an der Herzbasis abgesetzt. Nach Wiegen des Herzgewichtes wurde mittels Skalpell (Surgical Disposable Scalpel, Braun, Germany) auf Kammerebene eine Scheibe für die Histologie abgeschnitten und in ein mit 5 ml 4% iger Formalinlösung (Formaldehydlösung 37% säurefrei, Merck, Germany) gefülltes 10ml-Röhrchen (Röhre 10 ml, 92x15,2 mm, PP, Sarstedt, Germany) überführt. Der Herzapex wurde in ein 1,5ml-Reagiergefäß überführt und vorübergehend auf Eis gelagert. Unter Kühlung wurde das Herzgewebe mittels Skalpell (Surgical Disposable Scalpel, Braun, Germany) mechanisch zerkleinert, in neue 1,5ml-Reaktionsgefäße (Reagiergefäß 1,5 ml, PP, Sarstedt, Germany) überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Herzgewebe diente später der Gewinnung von RNA und wurde bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

2.4 Blutdruckmessung

Der systolische arterielle Blutdruck wurde nicht-invasiv mittels Schwanzplethysmographie am wachen Tier ermittelt. Um die Versuchstiere an die Blutdruckmessung zu gewöhnen, wurden zunächst an drei aufeinanderfolgenden Tagen Probemessungen durchgeführt und die erhaltenen Testergebnisse verworfen.

Die Blutdruckmessung erfolgte mit einem dafür konzipierten Blutdruckmessapparat (Process Control BloodPressure 20900-series, TSE Systems, Germany). Dafür wurde eine für den Mäuseschwanz konzipierte Blutdruckmanschette (Gummimembran 6,5 mm lichte Weite, TSE Systems, Germany) über den Schwanz bis zum Ansatz gestreift und kaudal der Manschette der Piezosensor des Blutdruckmessapparates befestigt. Durch behutsame Wärmezufuhr über die beheizte Bodenplatte wurde die Körpertemperatur der Mäuse um ca. 0,5 °C erhöht und dadurch eine reflektorische Dilatation der Schwanzarterie, mit welcher Mäuse ihren Wärmehaushalt regulieren, ausgelöst. Die arterielle Pulswelle der Schwanzarterie konnte dadurch mit dem auf dem Schwanz aufgesetzten Piezosensor registriert und optisch über ein Oszilloskop (HM507 Analog Digital Scope, HAMEG Instruments, Germany) sichtbar gemacht werden. Analog dem Riva-Rocci-Prinzip wurde die Schwanzarterie am Schwanzansatz durch Aufpumpen der Blutdruckmanschette über den systolischen Blutdruck hinaus komprimiert. Durch Ablassen des Manschettendruckes mit definierter Geschwindigkeit von ca. 5 mmHg/s konnte der systolische Blutdruck anhand des Wiederauftretens der Pulswelle abgelesen werden.

Bei jedem Tier wurde die Blutdruckmessung in kurzen Abständen jeweils dreimal durchgeführt und von den erhobenen Blutdruckwerten der Mittelwert gebildet. Messungen erfolgten

zu Versuchsbeginn und anschließend wöchentlich bis zum Versuchsende. Der Blutdruckverlauf einer jeden Versuchsgruppe wurde mit Hilfe einer Excel-Tabelle (MS Office for Mac 2008, USA) berechnet und in einem Balkendiagramm (GraphPad Prism 5.0 for Mac) graphisch dargestellt.

2.5 Körpergewichtsmessung

Bei allen an den Versuchen teilnehmenden Mäusen wurde zu Versuchsbeginn und -ende sowie während des Versuchsverlaufes jeweils wöchentlich das Körpergewicht mit einer Waage (Scout Pro Spu202, Ohaus, USA) erhoben. Bei Mäusen mit Aszites erfolgte bei Versuchsende zusätzlich eine Messung nach Ablass des Bauchwassers. Aus den Werten der Körpergewichtsmessungen wurde zur Auswertung anhand einer Excel-Tabelle (MS Office for Mac 2008, USA) der Gewichtsverlauf errechnet und graphisch dargestellt (GraphPad Prism 5.0 for Mac). Bei Mäusen mit Aszites wurde sowohl das Körpergewicht inklusive als auch exklusive Bauchwasser berücksichtigt.

2.6 Bestimmung des relativen Nierengewichtes

Bei allen an den Versuchen teilnehmenden Mäusen wurde nach der unilateralen Nephrektomie zu Versuchsbeginn das absolute Gewicht der entfernten (rechten) Niere mittels Waage (Scout Pro Spu202, Ohaus, USA) gemessen. Um das Nierengewicht auf etwaige Unterschiede im Habitus zu korrigieren, wurde anschließend der Quotient des absoluten Nierengewichtes (mg) zum Körpergewicht (g) gebildet, um das auf das Körpergewicht normalisierte relative Nierengewicht (mg/g) zu erhalten. Das absolute Gewicht der linken Niere wurde zu Versuchsende bei allen an den Versuchen teilnehmenden Mäusen während der Organentnahme mit einer Waage (Scout Pro Spu202, Ohaus, USA) bestimmt und auf das Körpergewicht bei Versuchsende normalisiert. Die Auswertung der relativen Nierengewichte erfolgte über eine Excel-Tabelle (MS Office for Mac 2008, USA), die graphische Darstellung durch ein Balkendiagramm (GraphPad Prism 5.0 for Mac).

2.7 Bestimmung des relativen Herzgewichtes

Analog zur Bestimmung des relativen Herzgewichtes wurde bei allen Mäusen bei Organentnahme zu Versuchsende mit einer Waage (Scout Pro Spu202, Ohaus, USA) das absolute Herzgewicht gewogen. Um etwaige Unterschiede im Habitus berücksichtigen zu können, wurde jeweils der Quotient aus absolutem Herzgewicht (mg) und Körpergewicht (g) gebildet und dadurch das relative Herzgewicht (mgHerz/gKG) errechnet. Die Auswertung der relativen Herzgewichte erfolgte über eine Excel-Tabelle (MS Office for Mac 2008, USA), die graphische Darstellung durch ein Balkendiagramm (GraphPad Prism 5.0 for Mac).

2.8 Proteinuriediagnostik

2.8.1 Gewinnung von Mausurin zur Analyse

Zur Gewinnung einer für weitere Analysen ausreichend großen Urinprobe wurden die Mäuse über einen Zeitraum von sechs Stunde in Stoffwechsellkäfigen gehalten. Die Böden dieser Stoffwechsellkäfige bestanden jeweils aus einer 96-Well-Platte (Microtest Plate 96-Well, Sarstedt, USA) welche zum Auffangen des Urins während der Sammelperiode diente. Während der Sammelperiode hatten die Mäuse freien Zugang zu Trinkwasser. Am Ende der Sammelperiode wurde der nicht mit Faeces verunreinigte Urin in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Reagiergefäß 1,5 ml, PP, Sarstedt, Germany) überführt und nach Zentrifugation (10 min; 12.000 rpm; 4 °C) in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Germany) bis zur weiteren Analyse bei -20 °C eingefroren.

2.8.2 Quantifizierung der Albuminausscheidung im Urin (ELISA)

Goldstandard für die Quantifizierung einer Albuminurie ist die Gewinnung von 24h-Sammelurin als Probenmaterial. Durch gleichzeitige Bestimmung von Albumin und Kreatinin in der Urinprobe und Bildung des Albumin/Kreatinin-Quotienten kann jedoch auf die lange Sammelperiode verzichtet werden. Deshalb wurde ein 6 h-Sammelurin gewonnen und aus dieser Probe die Albuminkonzentration (mg/dl) mittels ELISA sowie die Kreatininkonzentration (mg/dl) im Zentrallabor des UKE bestimmt.

Semiquantitative Bestimmung von Protein im Urin mittels Urinsticks

Zur groben Abschätzung der Proteinkonzentration in den gewonnenen Urinproben wurde der Urin mittels Urinsticks (Multistix 10 SG, Bayer, Germany) auf Proteine untersucht. Dafür wurden 20 µl der Urinprobe auf das entsprechende Reaktionsfeld des Teststreifens pipettiert und nach 1 min abgelesen. Der Test beruht auf dem Prinzip des Proteinfehlers von pH-Indikatoren und erfasst vornehmlich Albumin. Zur Einschätzung der Proteinkonzentration wurde die Farbe des Testfeldes mit einem Referenzstandard verglichen und dadurch dem entsprechenden Wert zugeordnet.

Herstellung von Urinverdünnungen

Der zuverlässige Messbereich des verwendeten ELISA liegt im Bereich einer Albuminkonzentration von ca. 7,8 ng/ml bis 500 ng/ml. Die Proteinausscheidung im Urin von nierengeschädigten Mäusen kann jedoch Werte bis 10^8 ng/ml annehmen, was eine entsprechende Vorverdünnung des Urins zur Gewährleistung einer exakten Messung notwendig machte. Der erforderliche Verdünnungsfaktor wurde für jede Urinprobe anhand der semiquantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Urinsticks abgeschätzt. Die zu den Teststreifenergebnissen korrespondierenden Verdünnungsfaktoren wurden anhand Tabelle 1, welche

empirisch in Vorversuchen ermittelten wurde, festgestellt und die Urinproben entsprechend mit Sample Diluent (ELISA Starter Accessory Package, Bethyl Laboratories, USA) verdünnt.

Teststreifen- ergebnis	Verdünnungs- faktor	Urinprobe (μ l)		Sample Diluent (μ l)
Negativ/Spur	1 : 100	10 μ l	+	990 μ l
+	1 : 1.000	100 μ l der 1:100-Verdünnung	+	900 μ l
++	1 : 10.000	10 μ l der 1:100-Verdünnung	+	990 μ l
+++	1 : 25.000	200 μ l der 1:10.000-Verdünnung	+	300 μ l
++++	1 : 100.000	100 μ l der 1:10.000-Verdünnung	+	900 μ l

Tabelle 1 Urinverdünnung

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Die Quantifizierung der Albuminkonzentration im Urin wurde als Double-Antibody-Sandwich-ELISA durchgeführt. Der ELISA gehört zu den Immunoassay-Verfahren und ermöglicht den Nachweis spezifischer Proteine mit dafür spezifischen Antikörpern. Verwendet wurde das kommerziell erhältliche Mouse Albumin ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories, USA). Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers.

Im ersten Schritt wurden die Messvertiefungen einer 96-Well-Immunosorbent-Platte mit für Mausalbumin spezifischen, monoklonalen Erstantikörpern (Goat anti-Mouse Albumin-affinity purified 1mg/ml, Bethyl, USA) gesättigt („coating“). Die folgende Inkubationsphase von 12 Stunden bei 4 °C ermöglichte die Adsorption des Albuminerstantikörpers an die Welloberfläche. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die überschüssige Erstantikörperlösung durch dreimalige Spülung mit der beigefügten Wash Solution entfernt. Anschließend wurden die Wells mit Postcoat Solution über 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen der Welloberfläche zu blockieren. Idealerweise sollten danach nur noch die Antigenbindungsstellen der Erstantikörper zur Bindung von Albumin in der Lage sein. Überschüssige Postcoat Solution wurde folgend in drei Waschschritten mit Wash Solution entfernt.

Anschließend wurden jeweils 100 μ l der Standardreihe sowie der zu untersuchenden Urinverdünnungen in die zugeordneten Wells pipettiert und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert um die Bindung der Albumine an die gebundenen Erstantikörper zu ermöglichen. Für jede Probe erfolgte eine Doppelbestimmung.

Als Referenz wurde eine Standardreihe mit bekannter Albuminkonzentration hergestellt. Dafür wurde 2 μ l des im Kit beigefügten Mouse Reference Serum (Mouse Reference Serum 45mg/ml, Bethyl, USA) mit 9 ml Sample Diluent versetzt um eine Albuminkonzentration von 10.000 ng/ml zu erhalten. Ausgehend von dieser Verdünnung wurde gemäß Tabelle 2 eine Standardreihe mit einem Konzentrationsbereich von 7,8 ng/ml bis 10.000 ng/ml hergestellt.

Standard	Albuminkonzentration (ng/ml)	Albuminstandard		Sample Diluent
0	10.000	2 µl Mouse Reference Serum	+	9 ml
1	500	0,5ml der 10.000ng/ml-Verdünnung	+	9,5 ml
2	250	0,5ml der 500ng/ml-Verdünnung	+	0,5 ml
3	125	0,5ml der 250ng/ml-Verdünnung	+	0,5 ml
4	62,5	0,5ml der 125ng/ml-Verdünnung	+	0,5 ml
5	31,25	0,5ml der 62,5ng/ml-Verdünnung	+	0,5 ml
6	15,625	0,5ml der 31,25ng/ml-Verdünnung	+	0,5 ml
7	7,8	0,5ml der 15,625ng/ml-Verdünnung	+	0,5 ml

Tabelle 2 Standardreihe

Nach Ablauf der Inkubationsphase wurden die ungebundenen Bestandteile der Urinprobe durch dreimalige Waschungen mit Wash Solution aus den Wells entfernt. Folgend wurde der Zweitantikörper Goat anti-Mouse Albumin-HRP conjugate (Goat anti-Mouse Albumin-HRP conjugate, 1 mg/ml, Bethyl, USA) mit Sample Diluent 1:50.000 verdünnt. Dieser Zweitantikörper ist wie der Erstantikörper spezifisch für Mausalbumin, jedoch zusätzlich mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) versehen. In jedes Well wurden 100 µl der Zweitantikörperverdünnung mit einer 8-Kanal-Pipette pipettiert und für 60 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Während dieser Inkubationsphase bindet der Zweitantikörper die vom Erstantikörper immobilisierten Albumine, wodurch Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe („sandwiches“) entstehen. Überschüssige Zweitantikörper wurden anschließend durch fünfmalige Waschungen mit Wash Solution aus den Wells entfernt.

Als Substrat für die Meerrettichperoxidase wurde die im Kit beigefügt TMB/H₂O₂-Lösung verwendet. Jeweils 100 µl Substratlösung wurden mittels 8-Kanal-Pipette in jedes Well pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert. Die Reaktion von TMB/H₂O₂ mit der Meerrettichperoxidase führt zur Bildung eines blauen Chromogens. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Farbreaktion durch jeweils 100 µl einer 2M H₂SO₄-Lösung (Merck, Germany) pro Well gestoppt. Der Reaktionsstopp mit H₂SO₄ induziert einen Farbumschlag zu Gelb, dessen Farbintensität bei 450 nm im Photometer gemessen werden kann. Der Substratumsatz wurde anschließend photometrisch bei 450 nm quantifiziert (Photometer MRXII, Dynatech Laboratories, USA). Als Referenz wurde dabei eine Kalibrierungskurve einer Serie bekannter Albuminkonzentrationen herangezogen. Die Auswertung der errechneten Albuminkonzentrationen sowie ihre graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe einer Excel-Tabelle (MS Office for Mac 2008, USA) sowie eines Balkendiagramms (GraphPad Prism 5.0 for Mac).

2.8.3 Messung der Kreatininkonzentration im Mausurin

Die im Stoffwechselkäfig gewonnenen Urinproben wurden bei -20 °C gelagert und nach Versuchsende gemeinsam ausgewertet. Vor der Messung wurden die gefrorenen Urine im

Kühlschrank aufgetaut und 10 min bei 12000 rpm und 4 °C in einer Zentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Germany) zentrifugiert. Dadurch wurden etwaige zellulären Bestandteile und Verunreinigungen pelletiert. Die Messung der Kreatininkonzentration erfolgte im Zentrallabor des UKE. Dafür wurde jeweils ein Aliquot von 200 µl der zu messenden Urinprobe zur Verfügung gestellt. Zur Auswertung der gewonnenen Ergebnisse dienten eine Excel-Tabelle (MS Office for Mac 2008, USA) und ein Balkendiagramm (GraphPad Prism 5.0 for Mac).

2.8.4 Uringelektrophorese zur Charakterisierung der Proteinurie

Mittels LDS-Gelelektrophorese wurden die im Urin vorhandenen Proteine gemäß ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Jeweils 2 µl Urinprobe wurde dafür mit 10 µl Aqua dest. und 4 µl 4xLDS (NuPAGE LDS Sample Buffer 4x, Invitrogen, USA) versetzt und anschließend über 10 min bei 72 °C im Wasserbad inkubiert. Folgend wurde ein 4-12 %iges Bis-Tris-Gel (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen, USA) mit 5 µl eines Proteinmarkers (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen, USA) sowie jeweils 15 µl der vorbehandelten Proben beschickt. Die Gelelektrophorese (Novex Mini-Cell, Invitrogen, USA) erfolgte mit 120 mA über 1 h, als Laufpuffer wurde MOPS (Morpholinopropanol Sulfonic acid, Serva, Germany) verwendet. Nach Ablauf der Elektrophoresezeit wurde das Gel entnommen und dreimalig über 5 min mit jeweils 20 ml Aqua dest. in einer Wanne auf der Wippe gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung der Proteinbanden durch Inkubation der Gele in jeweils 20 ml Coomassie Brilliant Blue (GelCode Blue Stain Reagent, Pierce, USA) über 30 min in einer Wanne auf der Wippe. Danach wurden die Gele dreimalig mit jeweils 20 ml Aqua dest. gewaschen, in eine Klar-sichtfolie eingetütet und eingescannt.

2.9 Plasmaparameter

2.9.1 Gewinnung von Heparinplasma aus Mausblut

Bei der Organentnahme wurde durch Punktion der Aorta abdominalis mit einer 1ml-Spritze (BD Plastipak 1ml, Becton Dickinson, Spain) ca. 0,5 bis 1 ml arterielles Vollblut aspiriert. Die Spritzen wurden zuvor mit Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, Ratiopharm, Germany) gespült, um eine Koagulation zu verhindern. Anschließend wurde das entnommene Blut auf je ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Reagiergefäß 1,5ml, PP, Sarstedt, Germany) überführt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Germany) über 10 min bei 3500 rpm und 4 °C wurde das Plasma von den korpuskulären Blutbestandteilen getrennt. Das im Überstand befindliche Plasma konnte danach abpipettiert und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Reagiergefäß 1,5ml, PP, Sarstedt, Germany) überführt werden. Die Plasmaproben wurden bis zur Messung von Kreatinin, Harnstoff, Cholesterin und Triglyceriden im Zentrallabor bei -20 °C weggefroren.

2.9.2 Harnstoff, Kreatinin und Cystatin-C

Die Konzentrationen von Harnstoff, Kreatinin und Cystatin-C wurden bei Versuchsende aus Heparinplasma der Versuchstiere mit einem Analyseautomaten (Hitachi 717, Roche, Germany) im Zentrallabor des UKE bestimmt. Dafür wurden die zu messenden Plasmaproben bei Raumtemperatur aufgetaut und jeweils ein Aliquot von 200 µl dem Zentrallabor des UKE zur Verfügung gestellt.

2.9.3 Cholesterin und Triglyceride

Gesamtcholesterin und Triglyceride wurden bei Versuchsende aus Heparinplasma der Versuchstiere mit einem Analyseautomaten (Hitachi 717, Roche, Germany) im Zentrallabor des UKE bestimmt. Dafür wurden die zu messenden Plasmaproben bei Raumtemperatur aufgetaut und jeweils ein Aliquot von 200 µl dem Zentrallabor des UKE zur Verfügung gestellt.

2.10 Histologie

2.10.1 Fixierung und Einbettung

Die bei der Organentnahme gewonnenen Nieren- und Herzschnitte wurden in mit jeweils 5 ml 4% iger Formalinlösung gefüllten 10 ml-Röhrchen über 24 h bei 4 °C zur Fixation inkubiert. Die 4 %ige Formalinlösung wurde aus 37 %iger Formalinlösung (Formaldehydlösung 37% säurefrei, Merck, Germany) durch Verdünnung mit Sörensen-Phosphat-Puffer hergestellt. Für die Herstellung des Sörensen-Phosphat-Puffer wurden 3,029 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und 14,1365 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Germany) abgewogen in 1000 ml Aqua bidest. gelöst und durch Zugabe von 2M HCl (Merck, Germany) ein pH von 7,4 eingestellt. Die 4% ige Formalinlösung wurde stets bei 4 °C in Dunkelheit gelagert, um der potentiellen Oxidation von Formaldehyd zu Formalinsäure vorzubeugen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Formalinlösung abgegossen und die Organproben mit jeweils 5 ml PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline, Lonza, Belgium) über 30 min auf der Wippe gewaschen. Nach insgesamt drei Waschschrritten wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die folgende Einbettung, Schnitt und Färbung der Organproben erfolgte im histologischen Labor der III.Medizinischen Klinik des UKE.

2.10.2 PAS-Färbung (Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung)

Die PAS-Reaktion ist eine histochemische Standardfärbung zur Darstellung kohlenhydrathaltiger Makromoleküle wie Polysacchariden, Mukopolysacchariden, Muko- und Glykoproteinen sowie Glykolipiden.

Zunächst wurden die entparaffinierten und rehydratisierten Gewebeschnitte über 15 min in 1% iger Perjodsäure (Merck, Germany) inkubiert. Perjodsäure oxidiert freie Hydroxylgruppen (Glykolgruppen) von Kohlenhydraten zu Aldehydgruppen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden Reste der Perjodsäure unter fließendem Leitungswasser abgewaschen und die Schnitte mit Aqua dest. gespült. Anschließend wurden die Gewebeschnitte über 40 min in Schiff'schem-Reagenz inkubiert. Schiff'sches-Reagenz enthält fuchsinschwefelige Säure welche mit den durch Perjodsäureoxidation entstandenen Aldehydgruppen reagiert. Dabei entsteht eine magenta-rote Farbe. Reste des Schiff'schen-Reagenz wurden anschließend durch Spülen mit fließendem Leitungswasser entfernt. Als kontrastreiche Kernfärbung diente eine Hämatoxylinfärbung nach Böhmer, welche Zellkerne blau darstellt. Dafür wurden die Gewebeschnitte über 90 s in Hämatoxylin getaucht und dann unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Folgend diente einer aufsteigende Alkoholreihe mit 70 %igem, 95 %igem und 100 %igen Ethanol sowie Xylol (Merck, Germany) der Dehydratisierung. Die gefärbten Schnitte wurden abschließend mit Deckgläsern eingedeckt.

2.10.3 F4/80-Färbung

Die F4/80-Färbung diente der Darstellung von Monozyten/Makrophagen im Interstitium der Nierenschnitte. Murine Monozyten/Makrophagen exprimieren spezifisch das F4/80-Antigen, ein ca. 160 kDa schweres Glykoprotein, welches durch den dafür spezifischen Antikörper MCAP497 gebunden werden kann.

Zur Färbung wurden die Nierenschnitte zunächst deparaffiniert und danach mit PBS gewaschen. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte daraufhin über 15 min bei 37 °C in 0,05% Trypsin-EDTA (Gibco, USA) inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Schnitte zwecks Stopp der Trypsinreaktion kurz in 100 %iges Ethanol getaucht und folgend mit PBS gewaschen. Die Blockade unspezifischer Bindungstellen erfolgte durch Inkubation über 30 min mit einem Blockpuffer (2% Pferdeserum, 1% BSA, 0,1% Fischgelantine, 0,1% Triton X-100, 0,05% Tween 20, 0,1M PBS). Anschließend wurden die Schnitte über 1h mit dem Primärantikörper (1:50 rat anti-mouse F4/80 MCAP497, Serotec, UK) inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde für 30 min eine Sekundärantikörperlösung (1:500 biotinylated donkey anti-rat IgG, Jackson, USA) auf die Schnitte gegeben. Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte über 30 min mit einer Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Lösung (1:100 Streptavidin-AP, Vector, USA) inkubiert. Streptavidin ist ein Protein aus *Streptomyces avidinii* und besitzt große Affinität zu Biotin. Der Streptavidin-AP-Komplex bindet demnach an die Biotin gekoppelten Sekundärantikörper, was über die Reaktion der alkalische Phosphatase sichtbar gemacht werden kann. Nach Waschen mit PBS erfolgte dafür die Farbentwicklung mit einer Neufuchsin-haltigen Entwicklerlösung. Die an Streptavidin gekoppelten alkalischen Phosphatasen spalten von dem in der Entwicklerlösung enthaltenen Naphtol-AS-Bi-Phosphat

Phosphat ab, wonach das Reaktionsprodukt mit Neufuchsin einen unlöslichen Farbkomplex bildet. Das Zytoplasma von Monozyten/Makrophagen erhielt dadurch eine Rotfärbung. Die Reaktion wurde nun durch Waschen mit Aqua dest. gestoppt, und die Schnitte mit Hämalaun nach Böhmer über 1 min gegengefärbt und die Zellkerne dadurch blau dargestellt. Nach weiterem Waschen mit Aqua dest. wurden die fertigen Schnitte mit Deckgläsern eingedeckt.

2.10.4 CD3-Färbung

CD3 ist ein Transmembranprotein von T-Zellen und findet sich in Assoziation zum T-Zell-Rezeptor. Im Rahmen der Antigenerkennung durch den T-Zell-Rezeptor ist der CD3-Komplex an der Signaltransduktion beteiligt. CD3 ist spezifisch für T-Zellen, die CD3-Färbung dient demnach der Darstellung von T-Zellen in Gewebeschnitten.

Die Gewebeschnitte wurden zunächst deparaffiniert und anschließend mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden die Schnitte anschließend über 25 min in Citratpuffer gekocht und über 10 min auf Eiswasser wieder abgekühlt. Nach Waschen mit Aqua dest. wurden die Schnitte 30 min lang mit einer Blocklösung (1:20 goat serum in PBS, Vektor, USA) zur Blockade der unspezifischen Bindungen versetzt. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen CD3 (1:20 rabbit polyclonal anti-mouse CD3, DAKO, USA) über 12 h bei 4 °C. Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte über 30min mit einem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper gegen Kaninchen-IgG (1:200 biotinylated goat anti-rabbit IgG, Vector, USA) inkubiert. Es folgten erneut Waschschrte mit PBS. Anschließend wurden die Schnitte mit einer Streptavidin-AP-Lösung (1:100 Streptavidin-AP, Vector, USA) inkubiert und mit PBS gewaschen. Zur Farbentwicklung diente ein Neufuchsin-haltigen Entwicklerlösung woraufhin sich das Zytoplasma von T-Zellen rot darstellte. Nach ausreichender Färbung wurde die Farbrektion in Aqua dest. gestoppt und eine Kernfärbung nach Böhmer für 90 s durchgeführt. Die Zellkerne erhielten dadurch eine blaue Färbung. Nach Waschen mit PBS wurden die fertigen Schnitte mit Deckgläsern eingedeckt.

2.10.5 Neutrophilen-Färbung

Zur Darstellung der Neutrophilen im Niereninterstitium wurde der Neutrophilenmarker Ly6G immunhistochemisch angefärbt.

Vor der Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst deparaffiniert und anschließend mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte in Protease 24 über 15 min bei 37 °C inkubiert und die Proteasereaktion im Anschluss mit 100 %igem Ethanol gestoppt. Zur Blockade der unspezifischen Bindungsstellen diente die Inkubation über 30 min mit einer Blocklösung (5% Pferdeserum in PBS). Über 12 h folgte bei 4 °C die Inkubation mit dem gegen Ly6G gerichteten Primärantikörper (1:25 rat anti-mouse Neutrophile (Ly6G), Hycult, Netherlands). Nach

Waschen mit PBS wurde für 30 min die Sekundärantikörperlösung (1:200 biotinylated donkey anti-rat IgG, Vector, USA) auf die Schnitte gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit einer Streptavidin-AP-Lösung (1:100 Streptavidin-AP, Vector) inkubiert und nach Waschen mit PBS die Farbreaktion nach Zugabe einer Neufuchsin-haltigen Entwicklerlösung durchgeführt. Nach 30 min wurde die Farbreaktion durch Waschen mit Aqua dest. gestoppt und eine Kernfärbung mit Hämalaun nach Böhmer durchgeführt. Nach weiterem Waschen mit Aqua dest. wurden die fertigen Schnitte mit Deckgläsern eingedeckt.

2.10.6 Nierenmorphologie

Die PAS-gefärbten Nierenschnitte dienten u.a. der Charakterisierung der Nierenarchitektur. Dafür wurden in 200 facher Vergrößerung durch ein Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Germany) pro Tier jeweils fünf Ausschnitte im Bereich des Nierenkortex fotografiert und die entstandenen Bilder computerunterstützt mit einem Punkteraster überlagert. Anschließend wurde die Anzahl der Punkte ausgezählt, welche im Tubulusepithel, Tubuluslumen, Glomerulus oder Interstitium lokalisiert waren. Anhand der erhobenen Werte wurde unter Zuhilfenahme einer Excel-Tabelle (MS Office for Mac 2008, USA) die Ausbreitung des Niereninterstitiums bestimmt und in einem Balkendiagramm dargestellt (GraphPad Prism 5.0 for Mac). Das interstitielle Volumen ist so objektiv quantifizierbar.

2.10.7 Quantifizierung der Glomerulosklerose

Anhand der PAS-gefärbten Nierenschnitte wurden die glomerulären Schädigungen bzw. deren lichtmikroskopisches Korrelat, die Glomerulosklerose, beurteilt. Dies diente der qualitativen und quantitativen Beurteilung der glomerulären Schäden.

Die Glomerulosklerose entspricht eine Vernarbung innerhalb der Nierenkörperchen. Dafür charakteristisch ist die Expansion der mesangialen Matrix unter Ansammlung PAS-positiver Kollagene und der damit verbundenen Zunahme der Rotfärbung. Mit Hilfe eines Lichtmikroskopes (Axioskop, Zeiss, Germany) wurden in 200 facher Vergrößerung pro Tier jeweils 20 Glomeruli gescreent und diese unter Zuhilfenahme des Glomerulosklerosescores (Tabelle 3) gemäß ihres Schädigungsgrades eingeteilt.

Glomerulusschaden	Ausmaß der geschädigten Tuftfläche	Glomerulosclerosescore
keine	0	0
leicht	1/3	1
mittelschwer	2/3	2
schwer	3/3	3

Tabelle 3 Glomerulosklerosescore

Gesunde Glomeruli wurden dabei mit 0 Scorepunkten beurteilt. Leichten Schäden, definiert als glomerulosklerotische Veränderungen welche maximal 1/3 des glomerulären Tufts betreffen, wurde ein Score von 1 zugeteilt. Mittelschwere Schäden wurden entsprechend als Schädigung von 2/3 der Tuftfläche definiert und mit einem Glomeruloskleroscore von 2, schwere Schäden, welche den gesamten glomerulären Tuft einbezogen, mit 3 bewertet. Aus den pro Tier erhobenen 20 Einzelwerten wurde jeweils der Mittelwert gebildet, und diese mittels einer Excel-Tabelle (MS Office for Mac 2008, USA) sowie einem Balkendiagramm (GraphPad Prism 5.0 for Mac) graphisch dargestellt.

2.10.8 Glomerulummorphometrie

Die Bestimmung des mittleren Glomerulusvolumens erfolgte lichtmikroskopisch anhand der bei Versuchsende hergestellten PAS-gefärbten Nierenschnitte. In 200 facher Vergrößerung durch ein Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Germany) wurden pro Tier im Bereich der Nierenrinde die Flächen von 20 verschiedenen Nierenkörperchen computerunterstützt ausgemessen. Die Berechnung des Glomerulusvolumens erfolgte gemäß der Methode von Weibel und Gomez (Weibel et al., 1979). Dafür wurde angenommen, dass die gemessenen Glomerulusflächen Kreisflächen entsprechen, was näherungsweise der Form eines Nierenkörperchens gerecht wird. Anhand dieser angenommenen Kreisflächen wurde anschließend das jeweils zugehörige Kugelvolumen berechnet und dieses mit dem Glomerulusvolumen gleichgesetzt. Um das mittlere Glomerulusvolumen zu erhalten, wurde von den Einzelwerten der Mittelwert gebildet und diese mit einer Excel-Tabelle (MS Office for Mac 2008, USA) sowie einem Balkendiagramm (GraphPad Prism 5.0 for Mac) graphisch dargestellt.

2.10.9 Quantifizierung von intratubulären Proteinpräzipitaten

Die PAS-gefärbten Nierenschnitte dienten auch der Quantifizierung PAS-positiver Präzipitate, für welche angenommen wurde, dass es sich um Proteinablagerungen innerhalb der Tubuli handelte. Unter Betrachtung mit einem Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Germany) in 200 facher Vergrößerung wurde die Anzahl der Proteinpräzipitate über einen Nierenschnitt verteilt mit Hilfe eines Rasterfelds ausgezählt und mit einer angeschlossenen Kamera (Axio-cam, Zeiss, Germany) dokumentiert. Pro Nierenschnitt wurden jeweils 10 Rasterfelde ausgezählt und aus diesen Zählungen der Mittelwert bestimmt. Die mittlere Anzahl der gefundenen Proteinpräzipitate wurde anschließend mit einer Excel-Tabelle (MS Office for Mac 2008, USA) sowie einem Balkendiagramm (GraphPad Prism 5.0 for Mac) graphisch dargestellt.

2.10.10 Bestimmung der Fläche intratubulärer Proteinpräzipitate

Die Bestimmung der mittleren Fläche intratubulärer Proteinpräzipitate erfolgte lichtmikroskopisch anhand der bei Versuchsende hergestellten PAS-gefärbten Nierenschnitte. In 200 fa-

200 facher Vergrößerung durch ein Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Germany) wurden pro Tier, wenn vorhanden, im Bereich der Nierenrinde die Flächen von bis zu 20 verschiedenen intratubulären Proteinpräzipitaten computerunterstützt ausgemessen. Aus den Einzelwerten wurde anschließend der Mittelwert gebildet und anschließend die Prävalenz der Proteinpräzipitate pro Rasterfeld in einer Excel-Tabelle (MS Office for Mac 2008, USA) sowie einem Balkendiagramm (GraphPad Prism 5.0 for Mac) graphisch dargestellt.

2.10.11 Quantifizierung der Infiltration von Entzündungszellen

Die Infiltration von Monozyten, T-Zellen und Neutrophilen in die Nieren der Versuchstiere wurde anhand immunhistochemischer Färbungen quantifiziert.

F4/80-gefärbte Nierenschnitte dienten der Auszählung von Monozyten/Makrophagen im Niereninterstitium. Dazu wurde die Anzahl der Monozyten/Makrophagen im Niereninterstitium über einen Nierenschnitt verteilt lichtmikroskopisch (Axioskop, Zeiss, Germany) mit Hilfe eines Rasterfelds ausgezählt und mit einer angeschlossenen Kamera (Axiocam, Zeiss, Germany) dokumentiert. Definitionsgemäß wurden als Monozyten/Makrophagen diejenigen Zellen gewertet, welche einen nierenförmigen Zellkern besaßen, der von einem deutlich rotgefärbten Zytoplasmasaum umrandet wurde. Pro Nierenschnitt wurden jeweils fünf Rasterfelde ausgezählt und aus diesen Zählungen der Mittelwert bestimmt. Die so erhobenen Befunde wurden mit Hilfe einer Excel-Tabelle (MS Office for Mac 2008, USA) und einem Balkendiagramm graphisch dargestellt.

CD3-gefärbte Nierenschnitte dienten der Beurteilung der T-Zell-Infiltration in das Niereninterstitium. Unter Betrachtung mit einem Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Germany) wurde die Anzahl der T-Zellen im Niereninterstitium über einen Nierenschnitt verteilt mit Hilfe eines Rasterfelds ausgezählt und mit einer angeschlossenen Kamera (Axiocam, Zeiss, Germany) dokumentiert. Definitionsgemäß wurden als T-Zellen diejenigen Zellen gewertet, welche einen rundlichen Zellkern besaßen, der von einem deutlich rotgefärbten Zytoplasmasaum umrandet wurde. Pro Nierenschnitt wurden jeweils fünf Rasterfelde ausgezählt und aus diesen Zählungen der Mittelwert bestimmt. Eine Excel-Tabelle (MS Office for Mac 2008, USA) sowie ein Balkendiagramm dienten der graphischen Darstellung der erhobenen Befunde.

Die Neutrophilenfärbung diente der Beurteilung der Infiltration von Neutrophilen in das Niereninterstitium. Dazu wurde die Anzahl der Neutrophilen im Niereninterstitium über einen Nierenschnitt verteilt lichtmikroskopisch (Axioskop, Zeiss, Germany) mit Hilfe eines Rasterfelds ausgezählt und mit einer angeschlossenen Kamera (Axiocam, Zeiss, Germany) dokumentiert. Definitionsgemäß wurden als Neutrophile diejenigen Zellen gewertet, welche einen stab- oder segmentkernigen Zellkern besaßen, der von einem deutlich rotgefärbten Zytoplasmasaum umrandet wurde. Pro Nierenschnitt wurden jeweils fünf Rasterfelde ausgezählt, aus

diesen Zählungen der Mittelwert bestimmt und mittels Excel-Tabelle (MS Office for Mac 2008, USA) und Balkendiagramm (GraphPad Prism 5.0 for Mac) graphisch dargestellt.

2.11 Genexpression

2.11.1 Isolierung von RNA aus dem Nierenkortex

RNA ist sehr anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse. Die zusätzliche 2'-Hydroxylgruppe im Ribosering macht RNA im Vergleich zu DNA viel anfälliger für hydrolytischen Abbau. Ferner droht Abbau durch ubiquitär vorkommende RNasen welche sehr stabil und auch durch Autoklavierung nicht vollständig inaktivierbar sind. Um RNase-Kontaminationen zu vermeiden, wurde bestmöglich steril gearbeitet und die Proben immer auf Eis gehandhabt. Zelluläre RNasen wurden während der Homogenisierung durch Guanidinthiocyanat inaktiviert und die Proben im weiteren Verlauf mit RNasin behandelt.

Der mechanische Aufschluss des Nierengewebes erfolgte in mit 80 %igem Ethanol (J.T.Baker, Holland) ausgesprühten Douncern. In diesen wurde pro Nierenkortexprobe je 5ml GTC-Lyse-puffer vorgelegt und die bei -70 °C gefrorenen Nierenkortexprobe dazugegeben. Zur Herstellung des GTC-Lyepuffers wurden die unten genannten Komponenten in ein mit 80% igem Ethanol (J.T.Baker, Holland) ausgesprühtes Becherglas gegeben und auf einer Heizplatte unter Verwendung eines Rührfisches aufgelöst. Die Lösung wurde anschließend in einem Erlenmeyerkolben überführt, und mit Aqua ad iniectabilia (Baxter, Belgium) bis zu einem Volumen von 200 ml aufgefüllt. Der GTC-Ansatz wurde in einer sterilen Zellkulturflasche bei 4 °C bis 3 Monate gelagert und verwendet. Vor definitiver Verwendung wurde der GTC-Lysepuffers mit β -Mercaptoethanol versetzt.

GTC-Lysepuffer

88	g	Guanidiniumthiocyanat 4M	(Guanidine thiocyanate, Serva, Germany)
1	g	N-Lauroylsarcosin 0,5%	(N-Lauroylsarcosine, Sigma, USA)
150	ml	Aqua ad iniectabilia	(Baxter, Belgium)
5	ml	NaCitrat 1M pH 7	(tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Roth, Germany)
210	μ l	β -Mercaptoethanol	(2-Mercaptoethanol 98%, Sigma, USA)

Das Gewebe wurde im Douncer mit einem mit 80 %igem Ethanol (J.T.Baker, Holland) gereinigten Stößel mechanisch zermörsert und das Homogenisat anschließend mit einer Pipette auf ein 50 ml-Reaktionsgefäß (PP-Test-tubes 50ml sterile, Greiner, Germany) überführt und über 1 h auf Eis inkubiert. Guanidiniumthiocyanat ist ein chaotropes Salz, welches effektiv Proteine denaturiert. Es dient der Zellyse und inaktiviert ferner zelluläre RNasen. β -Mercaptoethanol und N-Laurylsarcosin verhindern die Degradation der RNA.

Aus dem Gewebehomogenisat wurde anschließend mittels Phenol-Chloroform-Extraktion die Nukleinsäure isoliert. Zur Herstellung des Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches wurden unten genannte Substanzen in angegebener Menge in einem sterilen 50ml-Reaktionsgefäß (PP-Test-tubes 50ml sterile, Greiner, Germany) gemischt.

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch

5 ml	Phenol	(Rothi-Aqua-Phenol, Roth, Germany)
500 µl	Na-Acetat 2M pH4	(Sodium Acetate, Roth, Germany)
1000 µl	Chloroform Isoamylalkohl 1:50	(Chloroform, Isoamylalkohol, Merck, Germany)

Jeder Nierenkortexprobe wurden 6,5 ml des Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches zugeführt, der Probeninhalt über 15 s mittels Whartex gemischt und über 15 min auf Eis inkubiert. Phenol und Chloroform denaturieren Proteine, welche anschließend in der Interphase zwischen Phenolphase und wässriger Nucleinsäurelösung ausfallen. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation beschleunigt. Dazu wurde das Gemisch auf ein Zentrifugenröhrchen überführt und über 30 min bei 9500 rpm und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Germany). Der wässrige, nukleinsäurehaltige Überstand wurde danach in ein neues Zentrifugenröhrchen abpipettiert.

Die folgende Alkoholfällung diente sowohl der weiteren Reinigung als auch der Konzentrierung der Nukleinsäurelösung. Grundlage der Alkoholfällung ist, dass DNA und RNA in Gegenwart monovalenter Kationen in Ethanol unlösliche Präzipitate bilden. Deshalb wurde der Nukleinsäurelösung im Rahmen der Phenol-Chloroform-Extraktion Natriumacetat zugeführt. Die alkoholische Komponente wurde anschließend in Form von jeweils 7,5 ml Isopropanol zugeführt und der Fällungsansatz über Nacht bei -20 °C inkubiert. Durch Zentrifugation über 45 min bei 9500 rpm und 4 °C (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Germany) wurden die Nukleinsäurepräzipitate pelletiert, und der Überstand verworfen.

Die Nukleinsäurepellets wurden anschließend durch Waschen mit 80 %igem Ethanol (J.T. Baker, Holland) von mitgefallenem Salz gereinigt. Dazu wurden die Nukleinsäurepellets in jeweils 1 ml 80% igem Ethanol resuspendiert, die Lösung auf ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Reagiergefäß 1,5ml, PP, Sarstedt, Germany) überführt und gut gemischt. Durch Zentrifugation über 10 min bei 12000 rpm und 4 °C wurde die Nukleinsäure erneut pelletiert und der Überstand verworfen. Das Nukleinsäurepellet wurde anschließend wiederholt in 1 ml 80% igem Ethanol resuspendiert, gemischt und abzentrifugiert. Insgesamt erfolgten vier Waschschrte.

An den letzten Waschschrte anschließend wurde das Nukleinsäurepellet in einer Vakuumzentrifuge (DNA SpeedVac, Savant, USA) über 10 min getrocknet. Das Vakuum führt zur Siedepunktserniedrigung des Ethanols und beschleunigt dessen Verdunstung. Dieser Vorgang

führt zur weiteren Einengung und Konzentrierung der Nukleinsäure.

Die Nukleinsäurepellets wurden nun in mit RNAsin-versetztem Aqua ad iniectabilia resuspendiert und über 1 h in Eis auf der Wippe inkubiert. Dazu wurden jeweils 1 µl RNAsin (RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor 200U/µl, Invitrogen, USA) auf 100 µl Aqua ad iniectabilia (Baxter, Belgium) vermischt und ein Resuspensionsvolumen zwischen 50 bis 100 µl pro Probe veranschlagt. RNAsin ist ein aus humaner Plazenta gewonnener kompetitiver Inhibitor der RNasen-A, B und C. Durch Zugabe sollte die Degradation der RNA verhindert werden.

2.11.2 Qualitative und quantitative Analyse der Nukleinsäurelösung

Die Bestimmung von Qualität und Quantität der gewonnenen Nukleinsäure erfolgte über eine UV-Absorptionsmessung. Von den Proben wurde dafür eine 1:100-Verdünnung mit Aqua ad iniectabilia hergestellt und zur Messung in eine Quarzküvette überführt. Die Messung der Extinktion (E) erfolgte bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$ in einem Fotometer (GeneQuant pro, Gene Quant, England).

Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäure liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm, was auf den aromatischen Ringen ihrer Purine und Pyrimidine beruht. Ausgehend von der Extinktion bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ wurde gemäß dem Lambert-Beer-Gesetz die Nukleinsäurekonzentration der jeweiligen Lösung berechnet. Dem Lambert-Beer-Gesetz liegt die Gesetzmäßigkeit zugrunde, dass die Extinktion (E) der Nukleinsäurelösung proportional der Nukleinsäurekonzentration (c), der Schichtdicke (d) der Lösung sowie einem molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) ist. Bei der Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration kann jedoch nicht zwischen DNA und RNA unterschieden werden, da sich Desoxyribonukleotide und Ribonukleotide nicht in ihren Purin- und Pyrimidinbasen unterscheiden.

Im Gegensatz zu Nukleinsäure beruht das Absorptionsmaximum von Proteinen auf dem aromatischer Aminosäuren wie Phenylalanin sowie Tyrosin und liegt bei einer Wellenlänge von 280 nm. Der Quotient der optischen Dichten von 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) gilt deshalb als Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Bei Kontaminierung der Nukleinsäurelösung mit Proteinen ist der Quotient signifikant kleiner.

2.11.3 DNase-I-Verdau

Da die gewonnenen Nukleinsäureproben sowohl RNA als auch DNA enthielten, sollte durch Verdau mit DNase-I DNA aus den Proben entfernt werden. DNase-I ist eine Endonuclease, welche sequenzunabhängig Phosphodiesterbindungen innerhalb von DNA-Molekülen schneidet und diese dadurch zersetzt. Um eine optimale Enzymaktivität zu gewährleisten,

wurde in den DNase-I-Verdau nur jeweils 1 µg Nukleinsäure eingesetzt. Anhand der photometrisch errechneten Nukleinsäurekonzentrationen wurde aus den gewonnenen Nukleinsäurelösungen deshalb zunächst eine Probenverdünnung einer Konzentration von 1 µg/µl mit Aqua ad iniectabilia (Baxter, Belgium) hergestellt.

Pro Probe wurde 24 µl Aqua ad iniectabilia (Baxter, Belgium) sowie 3 µl 10×Buffer (10x DNase1 Buffer, Ambion, USA) und 2 µl DNase-I (rDNase1, Ambion, USA) in einem 0,5 ml-Reaktionstube (Reagiergefäß 0,5ml, PP, Sarstedt, Germany) vorgelegt und mit 1 µl der Probenverdünnung einer Konzentration von 1 µg/µl versetzt. Der Verdau erfolgte anschließend während eines Inkubationszeitraumes von 30 min bei 37 °C im Wasserbad. DNase-I ist hocheffizient, weshalb schon kleine Enzymmenge sowie eine kurze Reaktionszeit einen ausreichenden DNA-Verdau gewährleisten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 5 µl Inaktivierungsreagenz (DNase Inactivation Reagent, Ambion, USA) gestoppt. Das Inaktivierungsreagenz enthält EDTA, Natriumacetat und SDS. DNase-I benötigt Mg^{2+} für ihre Aktivität. Eine Komplexbildung dieser Mg^{2+} durch Zugabe von EDTA induziert deshalb einen Reaktionsstopp. Nach Zugabe des Inaktivierungsreagenz wurden die Proben über 3 min bei Raumtemperatur inkubiert.

DNase-I und Inaktivierungsreagenz wurden durch anschließende Zentrifugation über 1 min bei 10000 rpm und 4 °C (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Germany) pelletiert und der RNA-haltige Überstand in ein neues 0,5 ml-Reaktionstube (Reagiergefäß 0,5ml, PP, Sarstedt, Germany) überführt.

2.11.4 cDNA-Synthese (RT-PCR)

Für die Quantifizierung der RNA mittels RTQ-PCR musste die gewonnene RNA zunächst in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dieser Vorgang wird als Reverse Transkription (RT-PCR) bezeichnet und durch Reverse Transkriptasen (RTasen) katalysiert. Für die cDNA-Synthese wurden pro Probe jeweils 5 µl Aqua ad iniectabilia (Baxter, Belgium), 2 µl Hexamer-Primer (Random Primer 3µg/µl, Invitrogen, Canada) und 2µl dNTPs (100µM dNTP Set PCR Grade, Invitrogen, Canada) in einem 0,5ml-Reaktionstube (Reagiergefäß 0,5ml, PP, Sarstedt, Germany) vorgelegt und 15 µl der zu untersuchenden RNA-Probe dazugegeben. Die verwendeten Hexamer-Primer entsprechen einem Gemisch aus Hexanukleotiden unterschiedlicher Sequenz, welche zufällig mit RNA hybridisieren und dadurch die Synthese aller RNA-Abschnitte ermöglichen. Das anschließende Erhitzen der Proben über 5min auf 65°C diente der Aufschmelzung der Sekundärstruktur der RNA, die folgende Abkühlung der Anlagerung („annealing“) der Hexamer-Primer an die RNA.

Zu jedem Reaktionsansatz wurde anschließend jeweils 8 µl 5×FSB (5x First Strand Buffer, Invitrogen, Canada), 4 µl DTT (0,1M Dithiothreitol, Invitrogen, Canada) und 2 µl RNAsin (RNase-

OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor 200U/μl, Invitrogen, USA) sowie 2 μl M-MLV-RTase (M-MLV Reverse Transcriptase 200U/μl, Invitrogen, Canada) pipettiert. Die verwendete M-MLV-RTase stammt aus dem Retrovirus M-MLV und ist eine RNA-abhängig DNA-Polymerase mit der Fähigkeit einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA umzuschreiben. Die folgende Inkubation der Proben über 50 min bei 37 °C ermöglicht die Verlängerung der Primer („extension“) durch die M-MLV-RTase. Die gewählte Inkubationstemperatur von 37 °C entspricht dem Arbeitsoptimum der M-MLV-RTase. Durch Zugabe des RNase-Inhibitors RNAsin sollte zusätzlich das Risiko der RNA-Degradierung vermindert werden. Zum Abschluss wurden die Proben über 15 min auf 70 °C erhitzt und danach auf 4 °C abgekühlt. Die gewonnene cDNA wurde bis zur Weiterbenutzung bei 4 °C weggefroren.

2.11.5 RTQ-PCR (Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction)

Als „template“ für die RTQ-PCR diente die zuvor synthetisierte cDNA. Eingesetzt wurde diejenige Menge an cDNA, welche aus der cDNA-Synthese von 1 μg Gesamt-RNA erhalten wurde. Für die RTQ-PCR wurde die cDNA nach entsprechendem Protokoll mit den für das zu untersuchende Gen komplementären Oligonukleotidprimer und einer thermostabilen DNA-Polymerase in einem geeignetem Puffersystem inkubiert. Pro Probe wurden dafür als Mastermix jeweils 6,25 μl SYBR Green + Taq (SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix, Sigma, Germany) sowie 1,25 μl FW-Primer (1μM, Invitrogen, Canada), 1,25 μl RW-Primer (1μM, Invitrogen, Canada) und 2 μl Aqua ad iniectabilia (Baxter, Belgium) und 0,25 μl 50×ROX (50xROX, Sigma, Germany) veranschlagt.

Für die Messung wurden jeweils 11μl Mastermix und 1,5 μl der gewünschten cDNA-Probe in das Well einer 96-Well-Platte (MicroAmp, Applied Biosystems, USA) pipettiert, und diese zur Messung in einen Real Time Cycler (7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems, USA) überführt. Das verwendete RTQ-PCR-Programm bestand aus Denaturierungsschritt, Annealingschritt und folgendem Elongationsschritt. Die Denaturierung der DNA erfolgt über 30 s bei 94 °C. Durch Senkung der Temperatur für 30 s auf 55 °C wurde die Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Primer an die getrennten DNA-Einzelstränge ermöglicht. Durch Erhöhung der Temperatur für 90 s auf 72 °C wurde das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase erreicht, welche daraufhin die Primer-tragenden Einzelstränge zu Doppelsträngen komplementierte. Insgesamt beinhaltet das Programm meist 30 Schritte. Sowohl die Durchführung als auch die Auswertung erfolgten computerunterstützt (ABI PRISM, Applied Biosystems, USA).

Für die Quantifizierung wurde die Kinetik der PCR-Reaktion ausgenutzt. In der frühen Phase einer PCR-PCR findet weitgehend eine exponentielle Amplifikation der DNA-Fragmente statt. SYBR-Green-I wird dabei unspezifisch in dsDNA eingebaut, weshalb das davon ausgehende

Floureszenzsignal mit jedem Zyklus zunimmt. Da die Bindung von SYBR-Green-I an DNA unspezifisch ist, kann jedoch nicht zwischen korrektem PCR-Produkt oder Artefakt unterschieden werden. Die Zykluszahl, bei der sich das Floureszenzsignal erstmals deutlich vom Hintergrund abhebt, wird als CT-Wert („cycle treshhold“) bezeichnet. CT-Werte dürfen dabei nur im exponentiellen Bereich der Amplifikation ermittelt werden. Korrekt ermittelte CT-Werte können zur Quantifizierung der im Reaktionsansatz vorhandenen cDNA-Menge herangezogen werden. Dabei gilt, je geringer der CT-Wert desto höher der cDNA-Gehalt der Probe. Die Auswertung erfolgte nach der Delta-Delta-CT-Methode. Zusätzlich zum untersuchenden Gen wurde dafür noch die Expression des „housekeeping genes“ 18 S quantifiziert. Von 18 S wird angenommen, dass es in konstanter Menge exprimiert wird, weshalb der CT-Wert der 18 S-Amplifikation als Orientierungspunkt für die ursprünglich vorhandene Templatemenge benutzt werden kann. Die Menge an spezifischem Produkt wurde anschließend auf das „housekeeping gene“ bezogen.

2.12 Konzentration von Myeloperoxidase (MPO) im Plasma

Die Konzentration der im Plasma gelösten Myeloperoxidase wurde mittels Sandwich-ELISA (Mouse MPO ELISA Kit HK210, Hycult, Netherlands) quantifiziert. Die Durchführung erfolgt gemäß der Anleitung des Herstellers.

Als Probenmaterial diente Mausplasma, welches mit dem im Kit beigefügten Dilution Buffer (Hycult; Netherlands) in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:8 verdünnt wurde. Als Referenz diente eine Standardreihe (Hycult; Netherlands) für in Dilution Buffer gelöste Myeloperoxidase mit einem Messbereich von 1 bis 250 ng/ml. Die Beschickung der mit Primärantikörper gegen murine Myeloperoxidase gesättigten 96-Well-Platte (Hycult; Netherlands) erfolgte in Doppelbestimmung mit jeweils 100 µl der Proben von Standardreihe sowie Mausplasma. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur wurde das übrige Probenmaterial durch drei Waschschrte mit jeweils 200 µl Wash Buffer (Hycult; Netherlands) pro Well, welche mit einer Multikanalpipette aufgetragen wurden, entfernt. Anschließend wurde jedes Well mit jeweils 100 µl einer biotinylierten Sekundärantikörperlösung (Hycult; Netherlands) versetzt und über 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Antikörperlösung wurde in drei Waschschrten mit jeweils 200 µl Wash Buffer pro Well entfernt. Im Anschluss wurde jeweils 100 µl einer Streptavidin-Peroxidase-Konjugat-Lösung (Hycult; Netherlands) in jedes Well pipettiert und über 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 200 µl Wash Buffer wurde in jedem Well jeweils 100 µl einer TMB-Substrat-Lösung (Hycult; Netherlands) vorgelegt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde die Farbreaktion mit jeweils 100 µl einer 2M Zitrat-Lösung (Hycult; Netherlands) gestoppt und die Intensität der Färbung in einem Photometer (MRXII, Dynatech Laboratories, USA) bei 450 nm ausgelesen. Die Konzen-

tration der in den Proben gelösten Myeloperoxidase wurde anhand der Standardreihe unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors errechnet und in einer Excel-Tabelle (MS Office for Mac 2008, USA) bzw. Balkendiagramm (GraphPad Prism 5.0 for Mac) dargestellt.

2.13 NO-Bioverfügbarkeit

Endogenes Stickstoffmonoxid (NO) wird ausgehend von L-Arginin durch NO-Synthasen (NOS) synthetisiert. Stickstoffmonoxid selber ist sehr kurzlebig und damit schwer direkt messbar. Um die Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) indirekt zu quantifizieren wurde den Tieren intraperitoneal L-[Guanidino-(15N₂)]-Arginin injiziert und am Folgetag mittels gaschromatographischer Massenspektrometrie (GC-MS) die Häufigkeiten von 15N-Isotopen im Plasma bestimmt.

2.14 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde PASW Statistics (SPSS) 18.0 für Mac benutzt. Da die angewandten Tests jeweils eine Normalverteilung der Stichprobenvariablen voraussetzen und Laborwerte, die nicht negativ werden können, meist „schief“ verteilt sind, wurden die erhobenen Werte logarithmisch transformiert um eine Normalverteilung herzustellen. Datensätze, die nur einmalig zu Versuchsende erhoben wurden, wurden mit einer einseitigen ANOVA mit paarweisen Vergleichen analysiert um alle vier Gruppen miteinander vergleichen zu können. Datensätze, bei denen darüber hinaus auch zu Versuchsanfang Ausgangswerte ermittelt werden konnte, wurden mit einer ANCOVA mit paarweisen Vergleichen auf unterschiedliche Ausgangswerte bereinigt ausgewertet. Die Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier wurden unter Verwendung des Log-Rank-Tests miteinander verglichen. Auf multiples Testen wurde nicht korrigiert. Die Wahrscheinlichkeit des Fehlers erster Art wurde mit $\alpha = 0,05$ angenommen, als Signifikanzniveau dementsprechend ein $p = 0,05$ festgelegt.

Teil III Ergebnisse

- 3.1 Blutdruck
 - 3.2 Mortalität
 - 3.3 Körpergewichtsverlauf
 - 3.4 Relative Nierengewichte
 - 3.5 Nierenhistologie
 - 3.6 Proteinuriediagnostik
 - 3.7 Blutfettwerte
 - 3.8 Renale Genexpression
 - 3.9 Nierenfunktion
 - 3.10 NO-Bioverfügbarkeit
 - 3.11 Herzveränderungen
 - 3.12 Konzentration der Myeloperoxidase
-

Die folgenden Ergebnisse wurden in vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsdurchgängen erhoben. Bei Versuchsende entsprach der Probenumfang, wenn nicht anders erwähnt, für die WT-Kontrollgruppe N=9, für die MPO-KO-Kontrollgruppe N=10 sowie für die WT-Hochdruck-gruppe N=18 und MPO-KO-Hochdruckgruppe N=18.

3.1 Blutdruck

Die Blutdruckverläufe der verschiedenen Versuchsgruppen über den gesamten Versuchsverlauf sind in Tabelle 4 einzusehen und in Abbildung 6 graphisch dargestellt.

Systolischer Blutdruck SBP (mmHG)		1.Woche	2.Woche	3.Woche	4.Woche	5.Woche
		Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert
Kontrollen	WT	103	105	105	101	98
Kontrollen	MPO-KO	102	104	107	106	104
DOCA+Ang-II	WT	103	103	106	122	144
DOCA+Ang-II	MPO-KO	104	104	106	125	150

Tabelle 4 Blutdruckverläufe

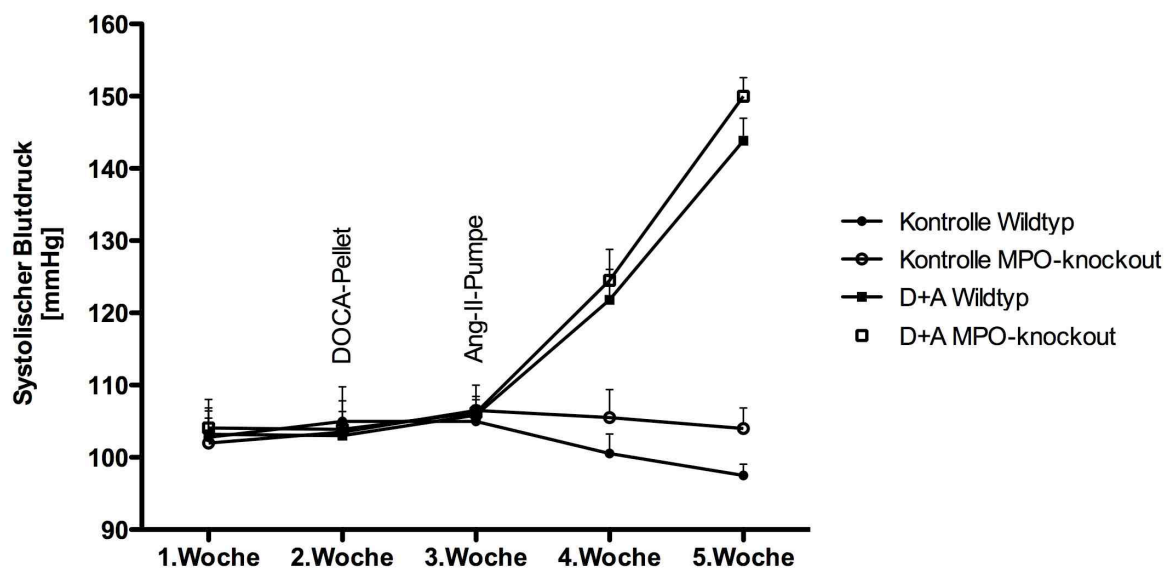


Abbildung 6 Blutdruckverläufe MPO-Defizienz beeinflusst bei C57BL/6J-Mäusen unter Kontrollbedingungen die systolischen Blutdrücke im Vergleich zu WT-Mäusen nicht signifikant. Auch bei Induktion einer arteriellen Hypertonie mit DOCA und Ang II unterscheidet der Blutdruckanstieg bei MPO-defizienten Mäusen sich nicht signifikant von dem gleichbehandelter WT-Mäuse.

Zu Versuchsbeginn konnten bezüglich des systolischen Blutdruckes keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden. Anhaltspunkte für einen bei Versuchsbeginn schon vorhandenen arteriellen Bluthochdruck bestanden für keine der Versuchsgruppen.

Auch in der 2. Woche unterschieden sich die verschiedenen Versuchsgruppen nicht signifikant bezüglich ihrer systolischen Blutdrücke. Diese Blutdruckmessung erfolgte jeweils etwa eine Woche nach der unilateralen Nephrektomie. Die Entfernung der rechten Niere hatte dementsprechend keine signifikante Auswirkung auf die systolischen Blutdrücke.

Die Blutdruckmessung in der 3. Woche erfolgte etwa eine Woche nach Implantation der

DOCA-Pellets, sofern die Tiere einer Hochdruckgruppe zugeordnet waren. Signifikante Unterschiede bezüglich der systolischen Blutdrücke zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen bestanden weiterhin nicht. Die alleinige Implantation der DOCA-Pellets war dementsprechend nicht in der Lage, die systolischen Blutdrücke der Tiere in den Hochdruckgruppen entscheidend zu beeinflussen.

In der 4. Woche, also etwa eine Woche nach Implantation der Ang II-Minipumpen, wurden erstmal in beiden Hochdruckgruppen erhöhte Blutdrücke gemessen. Die systolischen Blutdrücke der beiden Hochdruckgruppen stiegen im Vergleich zu den vorherig ermittelten Werten signifikant an.

Zu Versuchsende (5. Woche), d.h. etwa zwei Wochen nach Implantation der Ang II-Minipumpen, waren die systolischen Blutdrücke in beiden Hochdruckgruppen weiter angestiegen. Für die WT-Hochdruckgruppe wurde im Mittelwert ein systolischer Blutdruck von 144 mmHg sowie für die MPO-KO-Hochdruckgruppe von 150 mmHg ermittelt. Der Blutdruckanstieg erfolgt in beiden Hochdruckgruppen gleich und nicht signifikant voneinander unterschiedlich. In beiden Kontrollgruppen wurden dagegen physiologische, normotensive systolische Blutdrücke bestätigt, ein signifikanter Unterschied zwischen WT-Mäusen und MPO-KO-Mäusen unter Kontrollbedingungen bestand nicht.

3.2 Mortalität

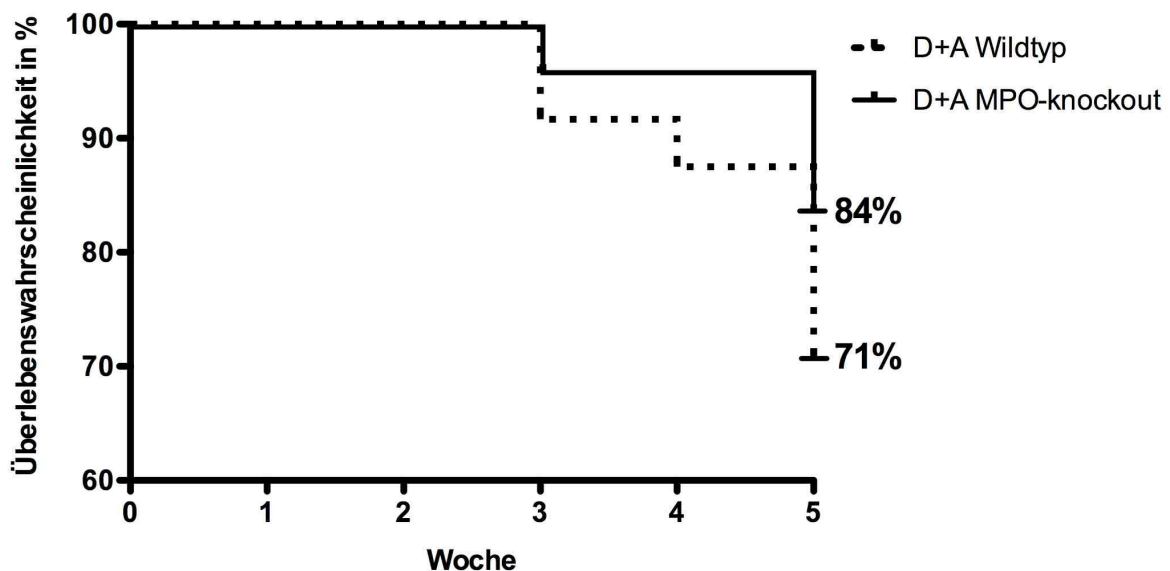


Abbildung 7 Kaplan-Meier-Überlebenswahrscheinlichkeit MPO-Defizienz geht bei Induktion des Bluthochdruckes nicht mit einer erhöhten Mortalität einher. Die unterschiedlichen Überlebenswahrscheinlichkeiten der beiden Hochdruckgruppen waren nicht signifikant.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten und Befunde wurden in insgesamt vier voneinander unabhängigen Versuchsdurchgängen erhoben. Zusammengefasst wurden 9

WT-Mäuse sowie 10 MPO-KO-Mäuse in die entsprechenden Versuchsdurchgänge aufgenommen, um in ihrer Gesamtheit die WT- bzw. MPO-KO-Kontrollgruppe zu bilden. Die Sterblichkeit lag in beiden Kontrollgruppen bei Null. Der WT-Hochdruckgruppe wurden insgesamt 26 WT-Mäuse zugeordnet, von denen 8 Tiere vorzeitig verstarben und damit 71% das Versuchsende erlebten. Die MPO-KO-Hochdruckgruppe bestand zusammengenommen aus 22 MPO-KO-Mäusen, von denen 4 Tiere vorzeitig verstarben, also 84% das Versuchsende erlebten (Abbildung 7). Die Überlebenswahrscheinlichkeiten der beiden Hochdruckgruppen unterschieden sich nicht signifikant.

3.3 Körpergewichtsverlauf

Der Körpergewichtsverlauf der verschiedenen Versuchsgruppen über den gesamten Versuchsverlauf ist in Tabelle 5 einzusehen und in Abbildung 8 graphisch dargestellt.

Körpergewichte (g)		1.Woche	2.Woche	3.Woche	4.Woche	5.Woche	
		Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	
Kontrollen	WT	28,0	27,9	28,0	28,6	28,3	ohne Aszites
Kontrollen	MPO-KO	27,2	26,9	27,0	27,2	27,4	
DOCA+Ang-II	WT	25,8	26,3	25,7	23,0	21,7	
DOCA+Ang-II	MPO-KO	28,3	27,5	26,2	24,7	26,1	
							23,5

Tabelle 5 Körpergewichtsverlauf

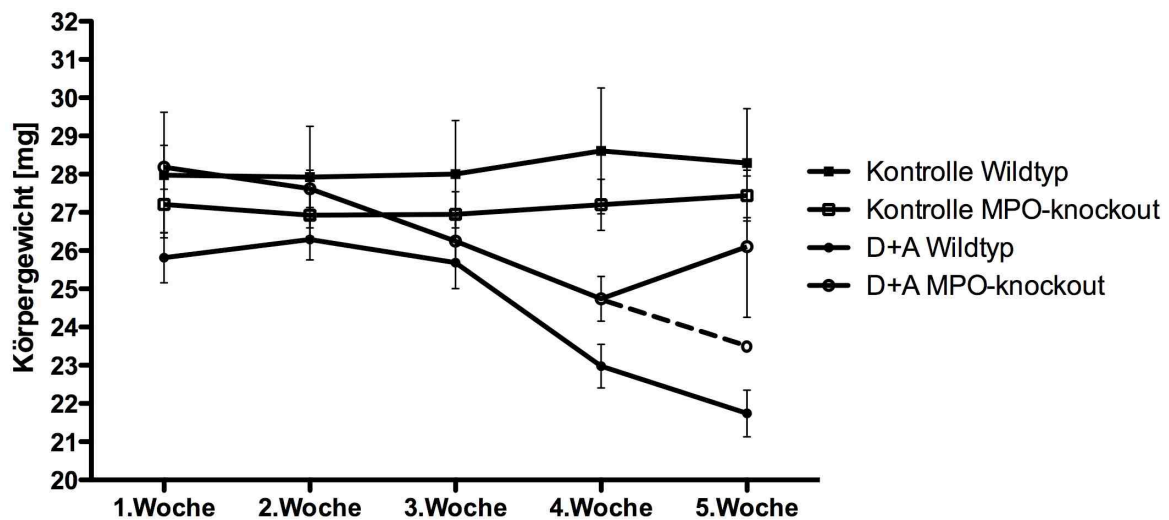


Abbildung 8 Körpergewichtsverlauf MPO-defiziente Mäuse mit C57BL/6J-Hintergrund unterscheiden sich unter Kontrollbedingungen bezüglich ihrer Gewichtsentwicklung nicht von gleichbehandelten WT-Mäusen. Die Belastung mit DOCA und Ang II geht sowohl bei WT-Mäusen als auch MPO-KO-Mäusen mit einer signifikanten Abnahme des Körpergewichtes einher. Exklusiv wurde jedoch beobachtet, dass MPO-Defizienz bei C57BL/6J-Mäusen nach Induktion der arteriellen Hypertonie mit DOCA und Ang II mit Ausbildung von Proteinmangelödemen und Aszites einherging.

Zu Versuchsbeginn unterschieden sich die Tiere der verschiedenen Versuchsgruppen hinsichtlich ihrer Körpergewichte nicht signifikant. Die Körpergewichte der Tiere beider Kontrollgruppen blieben während des Versuchverlaufes unverändert, was einer gesunden Entwicklung entspricht. Signifikante Unterschiede in den Gewichtsverläufen beider Kontrollgruppen im Vergleich bestanden nicht.

Im Gegensatz dazu sanken die Körpergewichte der Tiere der WT-Hochdruckgruppe im Mittelwert um 4,1g ab, eine Abmagerung welche mit $p < 0,001$ signifikant ist. Der Gewichtsverlust begann jeweils in der 3.Woche, also erst nach der Implantation des DOCA-Pellets. Wahrscheinlichster Grund für diese Gewichtsabnahme war der Proteinverlust über die zunehmend geschädigte Niere sowie fortgeschritten eine generalisierte Kachexie im Rahmen der Nierenschädigung.

Der Gewichtsverlauf der Mäuse der MPO-KO-Hochdruckgruppe verlief abweichend von dem der WT-Hochdruckgruppe zunächst bis zur 4.Woche abnehmend, um in der 5.Woche wieder anzusteigen (siehe gestrichelte Linie in Abbildung 8). Im Vergleich zum Versuchsanfang betrug die Gewichtsabnahme bis zur 4.Woche im Mittelwert 3,5g und ist mit $p < 0,001$ signifikant. Wie bei den gleichbehandelten WT-Mäusen erfolgte der Gewichtsverlust erst nach der Implantation des DOCA-Pellets in der 3.Woche. Grundsätzlich verschieden war jedoch der folgende Wiederanstieg der Körpergewichte der MPO-KO-Mäusen in der 5.Woche bis zum Versuchsende. Die hinter diesem Phänomen stehende Erklärung lag in der bei vielen Mäusen der MPO-KO-Hochdruckgruppe schon klinisch auffällig gewordene Ausbildung von Aszites. Aus diesem Grunde wurde zusätzlich eine Körpergewichtsmessung nach Ablass des Bauchwassers vorgenommen. Die Mäuse der MPO-KO-Hochdruckgruppe hatten im Vergleich zum Versuchsanfang entsprechend im Mittelwert 4,7g reines Körpergewicht eingebüßt. Der Verlust von reinem Körpergewicht der MPO-KO-Mäuse war also nicht von dem der WT-Hochdruckgruppe verschieden. Wahrscheinlichste Erklärung für den biphasischen Gewichtsverlauf der MPO-KO-Hochdruckgruppe ist, dass die zunehmende Nierenschädigung zum massiven Verlust von Proteinen über den Urin führte. Ein massiver Proteinverlust über den Urin führt zur Erniedrigung des kolloidosmotischen Druckes im Blut. Folge ist eine Flüssigkeitsverschiebung in den interstitiellen Raum, unter Entstehung von hypalbuminämischen Ödemen und Aszites. Dieses Phänomen wurde exklusiv bei den Mäusen der MPO-KO-Hochdruckgruppe beobachtet.

3.4 Relative Nierengewichte

Die bei Versuchsbeginn sowie Versuchsende berechneten relativen Nierengewichte und ihre Differenzen sind in Tabelle 6 und Abbildung 9 dargestellt.

Die relativen Nierengewichte der zu Versuchsbeginn entfernten rechten Nieren unterschieden sich

den sich in den verschiedenen Versuchsgruppen nicht signifikant voneinander. Die relativen Nierengewichte der zu Versuchsende entfernten linken Nieren waren dagegen in allen Versuchsgruppen signifikant höher als die der bei Versuchsbeginn gewogenen rechten Nieren.

Relatives Nierengewicht (mgNiere/gKG)		Rechte Niere (Versuchsbeginn)			Linke Niere (Versuchsende)			Differenz
		Mittelwert	Sem	N	Mittelwert	Sem	N	
Kontrollen	WT	6,6	0,12	9	7,8	0,25	9	1,2
Kontrollen	MPO-KO	6,4	0,25	10	7,8	0,20	10	1,4
DOCA+Ang-II	WT	6,6	0,17	23	8,3	0,25	17	1,6
DOCA+Ang-II	MPO-KO	7,4	0,24	22	9,8	0,50	18	2,2

Tabelle 6 Relatives Nierengewicht

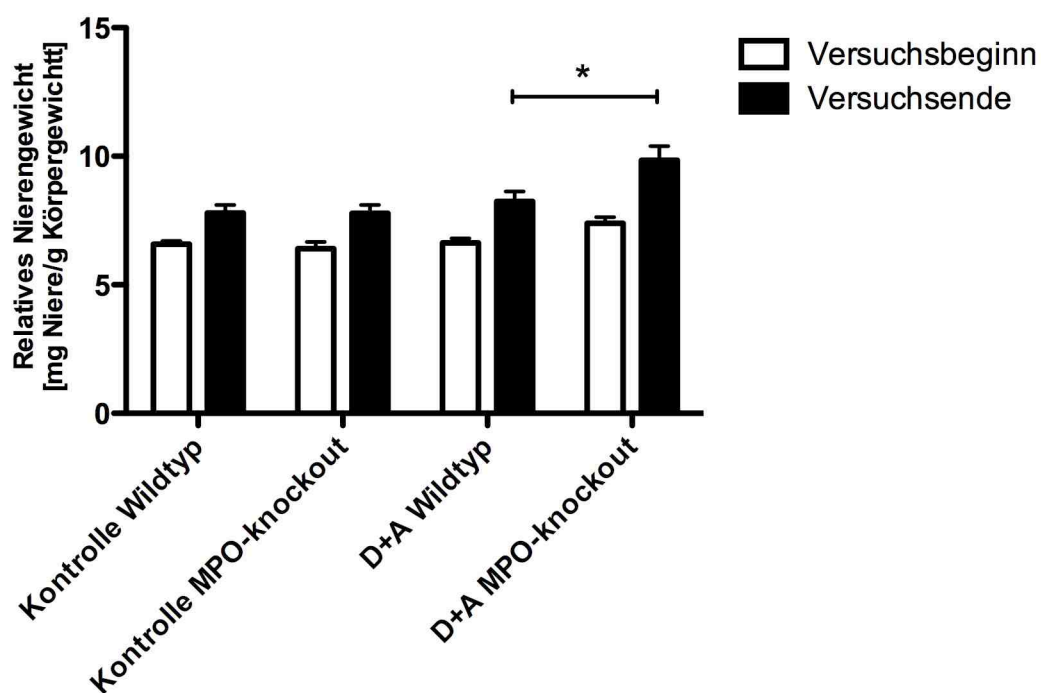


Abbildung 9 Relative Nierengewichte Unilaterale Nephrektomie führt bei sowohl MPO-defizienten als auch gleichbehandelten WT-Mäusen zu einer signifikanten Zunahme des relativen Nierengewichtes der verbleibenden Niere. Die Zunahme des relativen Nierengewichtes ist bei hypertensiven MPO-defizienten C57BL/6J-Mäusen im Vergleich zu allen anderen Gruppen signifikant am größten.

Die linken Nieren in der WT-Kontrollgruppe wurden im Mittelwert um 1,2 mgNiere/gKG höher gewogen als die der rechten Niere ($p < 0,01$), die linken Nieren der MPO-Kontrollgruppe im Mittelwert um 1,4 mgNiere/gKG ($p < 0,01$). Die beiden Kontrollgruppen unterschieden sich hinsichtlich der Gewichtszunahme der linken Nieren nicht signifikant voneinander.

Die linken Nieren der WT-Hochdruckgruppe waren bei Versuchsende um im Mittelwert 1,6 mgNiere/gKG schwerer als die rechten Nieren ($p < 0,001$), die der MPO-KO-Hochdruckgruppe um im Mittelwert 2,2 mgNiere/gKG ($p < 0,001$). Die Nieren der Tiere der MPO-KO-Hochdruckgruppe waren zudem 1,2 fach ($p < 0,01$) schwere als die der WT-Hochdruckgruppe.

3.5 Nierenhistologie

3.5.1 Histologische (lichtmikroskopische) Betrachtung

In Abbildung 10 sind die nach Versuchsende hergestellten Nierenschnitte in PAS-Färbung bei 200 facher Vergrößerung dargestellt. Pro Versuchsgruppe wurde jeweils von einem Versuchstier ein repräsentativer Ausschnitt der Nierenrinde ausgewählt.

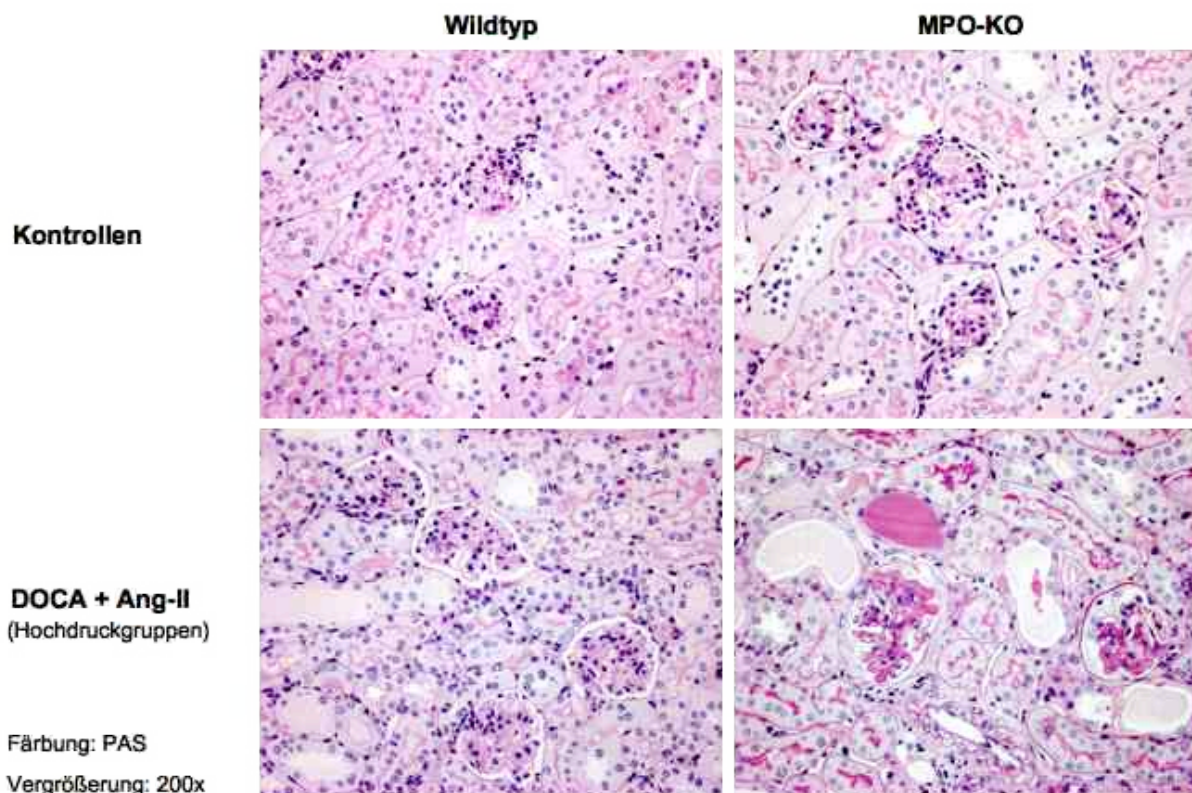


Abbildung 10 Nierenhistologie MPO-Defizienz geht bei C57BL/6J-Mäusen basal nicht mit lichtmikroskopisch erkennbaren Nierenveränderungen einher. Nach Induktion einer arteriellen Hypertonie mittels DOCA und Ang II entstehen in diesen Mäusen jedoch nephrosklerotische Nierenschäden, welche lichtmikroskopisch im Vergleich zu gleichbehandelten WT-Mäusen stärker ausgeprägt sind.

Sowohl die Nieren der WT-Kontrollgruppe als auch die der MPO-KO-Kontrollgruppe konnten als histologisch „gesund“ befundet werden. Bei der Beurteilung der Glomeruli wurde besonderes Augenmerk auf das Vorkommen von Ansammlungen PAS-positiven Materials innerhalb der Glomeruli gelegt, welche nur in Ausnahmefällen und dann nur schwach ausgeprägt gefunden wurden. Dies entspricht jedoch dem Normalzustand. Bei der Befundung des Tubulusapparates sowie Sammelrohrsystems wurden speziell Tubulusgröße, Höhe und Erscheinungsbild des Tubulusepithels und dessen Bürstensaum sowie das Vorhandensein von Präzipitaten innerhalb des Tubuluslumens in Augenschein genommen. In beiden Kontrollgruppen konnten keine pathologische Tubulusdilatationen, Atrophien des Tubulusepithels oder intraluminäre Präzipitate festgestellt werden. Die genannten Strukturen schienen ferner in ein normal ausgeprägt wirkendes Niereninterstitium eingebettet zu sein. Hinweise auf interstitiel-

le Verbreiterungen durch inflammatorische oder fibrosklerotische Prozesse bestanden keine. Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Nieren aus den Hochdruckgruppen waren dagegen die für Nephrosklerose charakteristischen Nierenveränderungen erkennbar. In der WT-Hochdruckgruppe wurden insbesondere intraglomeruläre Ansammlungen PAS-positiven Materiales im Sinne einer beginnenden Glomerulosklerose auffällig. Die glomeruläre Sklerose erschien fokal und segmental. Zudem wurden Tubulusdilatationen bei beginnender Tubulusatrophie sowie vereinzelt intraluminär auch PAS-positive Präzipitate angetroffen. Anhaltspunkte für eine interstitielle Veränderung bestanden jedoch nicht.

Die Nieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe fielen im Vergleich zu denen der WT-Hochdruckgruppe schon lichtmikroskopisch durch stärker ausgeprägtere Nierenschäden auf. Von beginnender Glomerulosklerose bis hin zu vollständigem sklerotischen Umbau des glomerulären Tuft imponierten alle Stadien der glomerulären Zerstörung. Wie auch in der WT-Hochdruckgruppe, erschien die glomeruläre Sklerose fokal und segmental. Die ableitenden Tubulusschlingen schienen vielerorts stark dilatiert und das zugehörige Tubulusepithel atrophisch verschmälert. In vielen der dilatierten Tubuli hatten sich zudem PAS-positive Präzipitate abgelagert. Bei diesen intraluminären Präzipitaten handelte es sich am wahrscheinlichsten, als Ausdruck der bei Nierenschäden vermehrt mit dem Urin ausgeschiedenen Plasmaproteinen, um Proteinablagerungen. Ferner schienen die interstitiellen Zwischenräume vielerorts durch Bindegewebsansammlungen sowie Infiltrate von Entzündungszellen verbreitert. Insgesamt entsprechen diese Befunde den in der Literatur gefundenen Beschreibungen des Vollbildes einer Nephrosklerose (Meyrier, 1999; Marcantoni et al., 2007).

3.5.2 Nierenmorphologie

Die Nierenmorphologie wurde anhand PAS-gefärbter Nierenschnitte, welche nach Versuchsende hergestellt wurden, eingehender charakterisiert. Tabelle 7 und Abbildung 11 zeigen die relative Ausdehnung des Niereninterstitiums.

Hinsichtlich der Morphologie der Nierenrinde unterschieden sich die beiden Kontrollgruppen nicht signifikant voneinander.

Die Architektur der Nierenrinden von Tieren der beiden Hochdruckgruppen war dagegen im Vergleich zu den Kontrolltieren verändert. In der WT-Hochdruckgruppe wurde im Vergleich zur korrespondierenden Kontrollgruppe eine mit $p < 0,01$ signifikante Vergrößerung der Tubuluslumina beobachtet. Diese Tubulusdilatation erfolgte auf Kosten der Tubulusepithelien, deren Anteil signifikant verkleinert war ($p < 0,05$). Das Interstitium fand sich dagegen nicht signifikant verbreitert. Auch bei den Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe wurde im Vergleich zur korrespondierenden Kontrollgruppe eine signifikante Vergrößerung der Tubuluslumina ($p < 0,001$) bei signifikanter Verkleinerung der Tubulusepithelien ($p < 0,001$) gefun-

den. Darüber hinaus fand sich in der MPO-KO-Hochdruckgruppe eine weitere pathologische Veränderung. Das Interstitium wurde im Vergleich zu allen übrigen Versuchsgruppen signifikant verbreitert vorgefunden. Diese Interstitiumsverbreiterung war im Vergleich zur gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe signifikant verschieden ($p < 0,001$).

Nierenmorphologie		Relative Ausdehnung des Niereninterstitiums in % des Punkterasters		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	27,2	1,05	9
Kontrollen	MPO-KO	22,4	1,99	10
DOCA+Ang-II	WT	25,8	1,05	16
DOCA+Ang-II	MPO-KO	37,6	1,94	18

Tabelle 7 Relative Ausdehnung des Niereninterstitiums

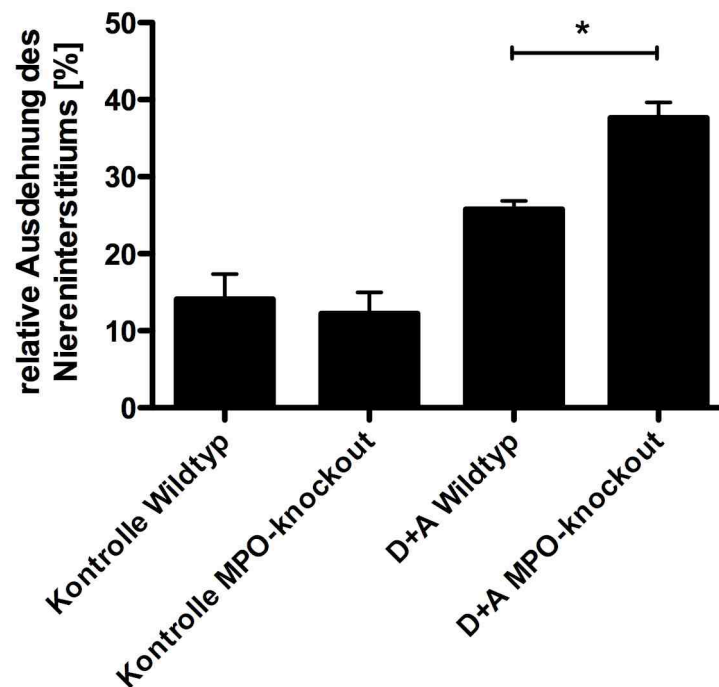


Abbildung 11 Relative Ausdehnung des Niereninterstitiums MPO-Defizienz geht in C57BL/6J-Mäusen basal nicht mit signifikanten Veränderungen der Nierenmorphologie einher. Nach Induktion einer arteriellen Hypertonie mit DOCA und Ang II entstehen jedoch die für Nephrosklerose bekannten Veränderungen wie Tubulusdilatationen, Tubulusatrophie und Interstitiumsverbreiterung. Diese Veränderungen fallen bei MPO-defizienten im Vergleich zu gleichbehandelten WT-Mäusen signifikant größer aus.

Zusammengenommen entsprechen die bei den Tieren der beiden Hochdruckgruppen gefundenen Befunde den für die Nephrosklerose typischen Nierenveränderungen. In deren Rahmen werden regelrecht Tubulusdilatationen bei gleichzeitiger Atrophie des Tubulusepithels sowie eine Akkumulation von Extrazellulärmatrix im Interstitium mit konsekutiver Interstitiumsverbreiterung gefunden (Meyrier et al., 1999). Die Verbreiterung des Interstitiums ist ein sehr guter und objektiver Parameter der Nierenschädigung.

3.5.3 Glomerulosklerose

Das Ausmaß der glomerulären Schädigung ist in Tabelle 8 und Abbildung 12 quantitativ anhand der Ausbildung von Glomerulosklerose für die verschiedenen Versuchsgruppen bei Versuchsende dargestellt.

Glomerulusveränderungen		Glomerulosklerose Scorepunkte		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	0,10	0,03	9
Kontrollen	MPO-KO	0,14	0,02	10
DOCA+Ang-II	WT	0,39	0,06	16
DOCA+Ang-II	MPO-KO	0,84	0,09	18

Tabelle 8 Glomerulosklerose

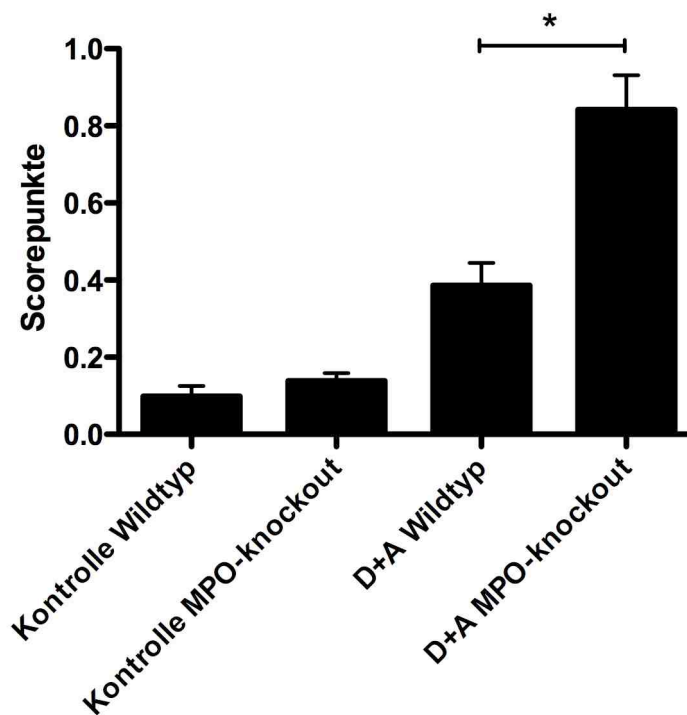


Abbildung 12 Glomerulosklerose MPO-Defizienz geht basal bei C57BL/6J-Mäusen nicht mit Ausbildung einer Glomerulosklerose einher. Unter Belastung mit DOCA und Ang II entstehen in diesen Mäusen jedoch glomerulosklerotische Hochdruckschäden, deren Ausprägung signifikant höher ausfällt als bei gleichbehandelten WT-Mäusen.

Die Glomerulosklerose entspricht einer Vernarbung innerhalb der Nierenkörperchen. Bei Versuchsende wurden in beiden Kontrollgruppen keine Anhaltspunkte für eine maßgebliche Nierenschädigung gefunden. Die Nierenrinden dieser Tiere enthielten überwiegend gesunde Glomeruli und nur vereinzelt glomerulosklerotisch veränderte Glomeruli. Dies entspricht dem Normalzustand, denn auch in einer gesunden Niere werden vereinzelt schwach glomerulosklerotisch veränderte Glomeruli gefunden. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen bestanden nicht.

Die Glomeruli der Tiere der beiden Hochdruckgruppen ließen bei Versuchsende dagegen eine zunehmende Glomerulosklerose erkennen. In der WT-Hochdruckgruppe wurde im Mittelwert ein Score von 0,39 ermittelt. Diese Schädigung war mit $p < 0,01$ signifikant vom korrespondierenden Befund der WT-Kontrollgruppe unterschiedlich. Für die MPO-KO-Hochdruckgruppe wurde im Mittelwert ein Score von 0,84 ermittelt. Dieser Befund war mit $p < 0,001$ sowohl von der MPO-Kontrollgruppe als auch von der WT-Hochdruckgruppe signifikant unterschiedlich. Wie schon in den histologischen Bildern demonstriert, war die glomeruläre Schädigung demnach in der MPO-Hochdruckgruppe sehr viel stärker ausgeprägt als die der WT-Hochdruckgruppe.

3.5.4 Glomerulusvolumen

Da die Charakterisierung der Nierenmorphologie mittels Punkteraster nicht die notwendige Sensitivität besitzt, um die nur geringfügig ausgeprägten Größenveränderungen von Glomeruli feststellen zu können, wurden zusätzlich die entsprechenden Glomerulusvolumina direkt nach der Methode von Weibel und Gomez (Weibel et al., 1979) ausgemessen. In Tabelle 9 und Abbildung 13 sind die mittleren Glomerulusvolumina der verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt.

Glomerulusmorphometrie		Glomerulusvolumen um ³		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	211.992	6.858	9
Kontrollen	MPO-KO	210.750	8.158	10
DOCA+Ang-II	WT	252.048	9.376	16
DOCA+Ang-II	MPO-KO	287.113	10.053	18

Tabelle 9 Glomerulusvolumen

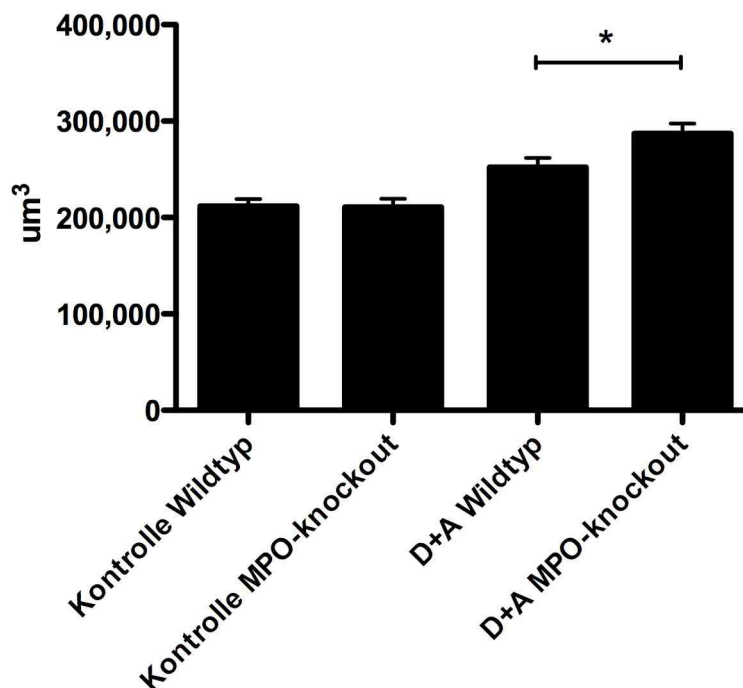


Abbildung 13 Glomerulusvolumen MPO-Defizienz geht bei C57BL/6J-Mäusen basal nicht mit einem vergrößerten Glomerulusvolumen einher. Die Induktion einer arteriellen Hypertonie mit DOCA und Ang II führt in diesen Mäusen jedoch zu einer glomerulären Hypertrophie, welche im Vergleich zu gleichbehandelten Mäusen signifikant größer ausfällt.

Die in beiden Kontrollgruppen gemessenen Glomerulusvolumina entsprachen den in der Literatur (Schrijvers et al., 2002) beschriebenen Volumina normaler Glomeruli. Ein signifikanter Unterschied bezüglich des glomerulären Volumens zwischen den beiden Kontrollgruppen bestand nicht.

Für die Nierenkörperchen der Tiere der WT-Hochdruckgruppe wurde ein mittleres Glomerulusvolumen von $252.048 \mu\text{m}^3$ berechnet. Die Zunahme des Glomerulusvolumens innerhalb der WT-Hochdruckgruppe war im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe mit $p < 0,05$ signifikant. Dieser Befund entspricht einer glomerulären Hypertrophie und wurde für durch DOCA und Ang II induzierte Nierenschäden bereits beschrieben (Kirchhoff et al., 2007). Auch das mittlere Glomerulusvolumen der Nierenkörperchen der MPO-KO-Hochdruckgruppe wurde mit $287.113 \mu\text{m}^3$ als erhöht gemessen. Dieser Befund war im Vergleich zur MPO-KO-Kontrollgruppe signifikant höher ($p < 0,001$). Die glomeruläre Hypertrophie übertraf zudem die der WT-Hochdruckgruppe ($p < 0,01$).

3.5.5 Anzahl und Fläche intratubulärer Proteinpräzipitate

In Tabelle 10 und Abbildung 14a/b sind die Ergebnisse der Auszählung der intratubulären Proteinpräzipitate sowie Ausmessung der zugehörigen Proteinzyylinderflächen dargestellt.

Proteinzyylinder		Proteinzyylinder Anzahl pro Rasterfeld			Proteinzyylinderfläche um ³		
		Mittelwert	Sem	N	Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	0	0,0	9	0	0	9
Kontrollen	MPO-KO	0	0,0	10	0	0	10
DOCA+Ang-II	WT	2	0,7	16	2932	446	16
DOCA+Ang-II	MPO-KO	6	0,8	18	6358	356	18

Tabelle 10 Anzahl und Fläche intratubulärer Proteinpräzipitate

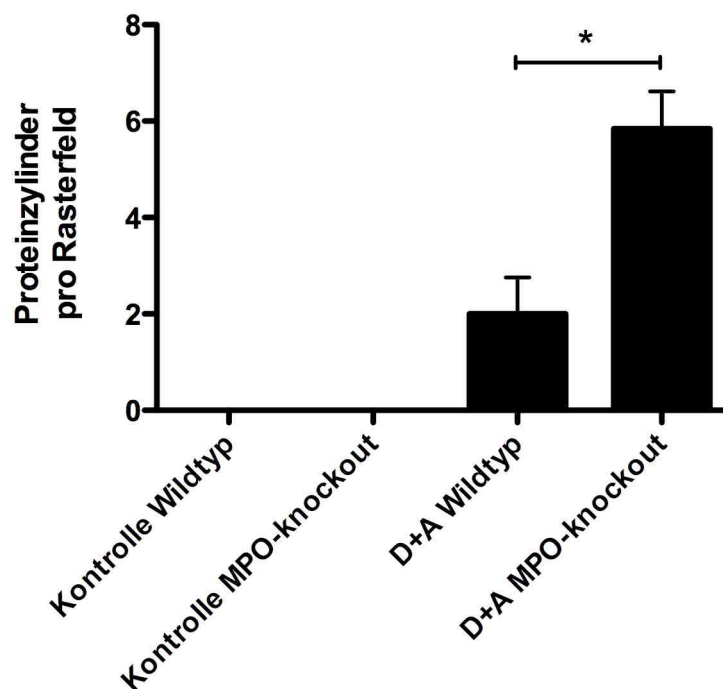


Abbildung 14a Proteinzyylinderfläche

In den beiden Kontrollgruppen wurden keine PAS-positiven Ablagerungen innerhalb des Tubulusapparates gefunden. Dieser Befund entspricht dem gesunder Nieren, da physiologischerweise die glomeruläre Filtration von Plasmaproteinen zu gering ist, um ein Ausfallen von Proteinen innerhalb der Tubuli zu verursachen.

In den Nieren der WT-Hochdruckgruppe wurden dagegen im Mittelwert 2 intratubuläre Proteinpräzipitate pro Rasterfeld gefunden. Die mittlere Fläche dieser Proteinpräzipitate wurde mit 2932 μm^3 berechnet. Für die MPO-KO-Hochdruckgruppe wurde im Mittelwert eine Prävalenz von 6 intratubulären Proteinablagerungen pro Rasterfeld ausgezählt. Die mittlere Fläche dieser Proteinpräzipitate lag bei 6358 μm^3 . Dieser Befund war signifikant zur gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe unterschiedlich ($p < 0,001$).

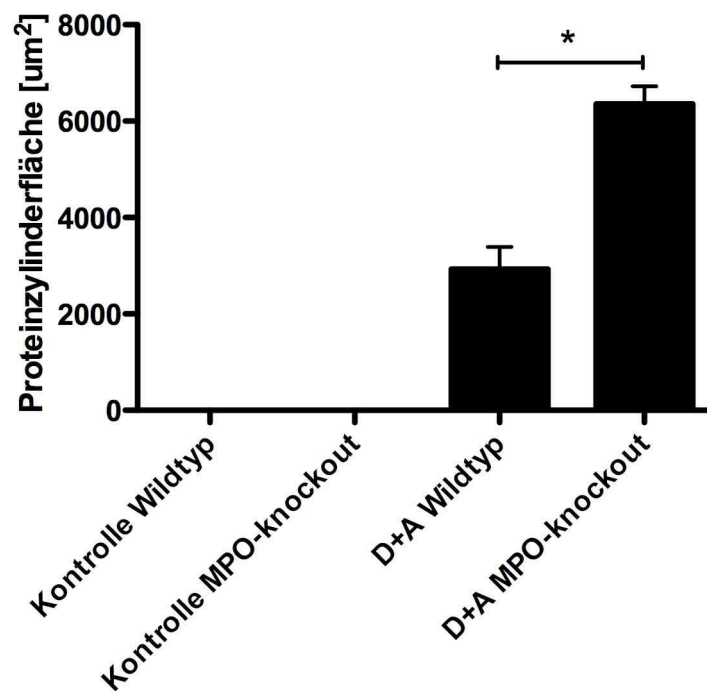


Abbildung 14b MPO-Defizienz geht basal bei C57BL/6J-Mäusen nicht mit einer Bildung von intratubulären Proteinablagerungen einher. Im Gegensatz zu gleichbehandelten WT-Tieren wurde nach Induktion einer arteriellen Hypertonie mit DOCA und Ang II bei diesen Mäusen jedoch ein signifikant höherer Anstieg sowohl der Prävalenz als auch der Größe von Proteinpräzipitaten innerhalb der Tubuli beobachtet.

Zusammengenommen wurden bei Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe im Vergleich zu WT-Hochdrucktieren nicht nur signifikant mehr, sondern auch signifikant größere Proteinpräzipitate in den Tubuli gefunden ($p < 0,001$). Proteinpräzipitate innerhalb des Tubuluslumens gelten als morphologisches Korrelat einer Proteinurie. Ursächlich dafür ist eine Schädigung des glomerulären Filters, wodurch zunehmend Plasmaproteine in den Primärharn übertreten und ab Überschreitung ihres Löslichkeitsproduktes im Tubuluslumen ausfallen. Die Prävalenz intratubulärer Proteinpräzipitate kann demnach als grober Anhaltspunkt für den Ausprägungsgrad einer Nierenschädigung dienen. Histologisch kann dementsprechend bei Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe von einer ausgeprägteren glomerulären Proteinfiltration und damit Proteinurie ausgegangen werden.

3.5.6 Infiltration von Monozyten/Makrophagen in die Niere

In Tabelle 11 sowie Abbildung 15 sind die Prävalenzen von Monozyten/Makrophagen im Interstitium der Nierenrinde pro Rasterfeld dargestellt.

Im Niereninterstitium von Tieren der beiden Kontrollgruppen wurden nur vereinzelt Monozyten/Makrophagen angetroffen. Beide Kontrollgruppen vergleichend bestand kein signifikanter Unterschied in der Prävalenz von Monozyten/Makrophagen im Interstitium.

Im Niereninterstitium von Tieren der WT-Hochdruckgruppe wurden dagegen im Durchschnitt

10 Monozyten/Makrophagen mehr als in der korrespondierenden WT-Kontrollgruppe gefunden ($p < 0,001$). Analog dazu waren im Niereninterstitium der Tiere der MPO-KO-Hochdruckgruppe durchschnittlich 29 Monozyten/Makrophagen mehr als in der korrespondierenden MPO-KO-Kontrollgruppe ($p < 0,001$) sowie 18 Monozyten/Makrophagen mehr als in der WT-Hochdruckgruppe ($p < 0,001$) vorhanden.

Infiltration von Entzündungszellen		Monozyten im Interstitium		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	8	0,68	9
Kontrollen	MPO-KO	9	0,52	10
DOCA+Ang-II	WT	19	0,94	16
DOCA+Ang-II	MPO-KO	37	2,71	18

Tabelle 11 Monozyten im Niereninterstitium

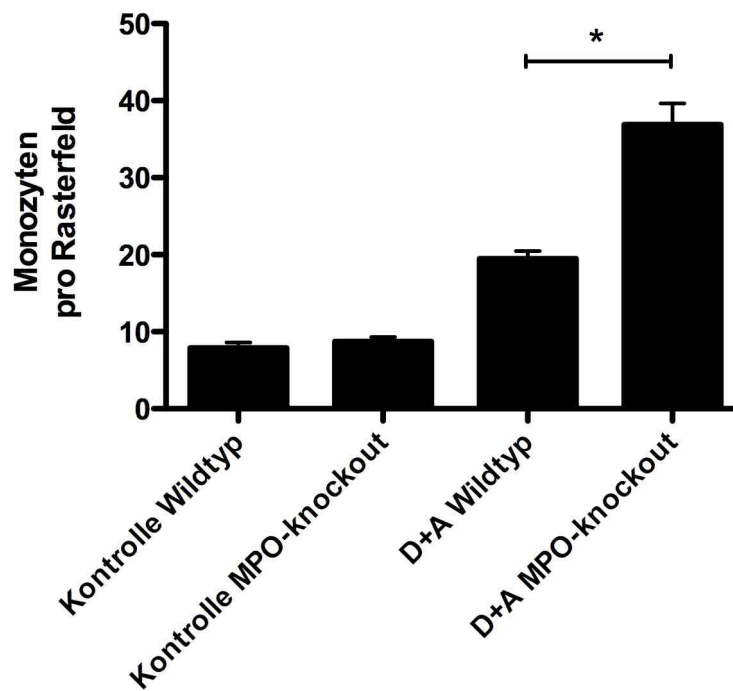


Abbildung 15 Monozyteninfiltration MPO-Defizienz führt bei C57BL/6J-Mäusen basal nicht zur gesteigerten Infiltration von Monozyten/Makrophagen in das Niereninterstitium. Nach Induktion einer arteriellen Hypertonie mit DOCA und Ang II ist bei diesen Mäusen im Vergleich zu gleichbehandelten WT-Mäusen jedoch eine signifikant größere Anzahl von Monozyten/Makrophagen im Niereninterstitium anzutreffen.

Die Infiltration von Monozyten/Makrophagen kann als Anhaltspunkt für die Entzündungsaktivität und damit auch die Ausprägung der Nierenschädigung interpretiert werden. Dass es im Rahmen nephrosklerotischer Prozesse zur Infiltration von Entzündungszellen in die geschädigte Niere kommt, ist in der Literatur bekannt (Meyrier, 1999). Die gesteigerte Infiltration von Monozyten/Makrophagen in die Nieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe lässt demnach eine höhere Entzündungsaktivität als bei der gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe vermuten.

3.5.7 Infiltration von T-Zellen in die Niere

Die Prävalenzen der T-Zellen im Interstitium der Nierenrinde pro Rasterfeld für die verschiedenen Versuchsgruppen sind in Tabelle 12 und Abbildung 16 dargestellt.

Infiltration von Entzündungszellen		T-Zellen im Interstitium		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	9	0,8	9
Kontrollen	MPO-KO	9	1,1	10
DOCA+Ang-II	WT	14	1,0	16
DOCA+Ang-II	MPO-KO	24	2,3	18

Tabelle 12 T-Zellen im Niereninterstitium

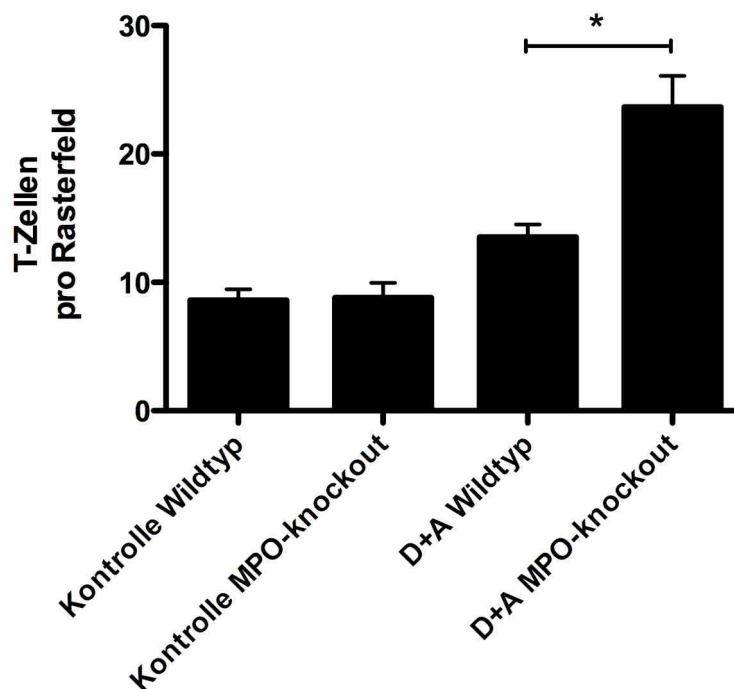


Abbildung 16 T-Zell im Niereninterstitium MPO-Defizienz führt bei C57BL/6J-Mäusen basal nicht zur gesteigerten Infiltration von T-Zellen in das Niereninterstitium. Nach Induktion einer arteriellen Hypertonie mit DOCA und Ang II ist bei diesen Mäusen jedoch im Vergleich zu gleichbehandelten WT-Mäusen eine signifikant größere Anzahl von T-Zellen im Niereninterstitium vorhanden.

Die beiden Kontrollgruppen unterschieden sich bezüglich der Prävalenz der T-Zellen nicht signifikant.

Bei den Tieren der WT-Hochdruckgruppe wurden dagegen im Durchschnitt 5 T-Zellen pro Rasterfeld mehr als in der korrespondierenden WT-Kontrollgruppe angetroffen. Bei der Auszählung der T-Zellen im Niereninterstitium von Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe wurden durchschnittlich 15 T-Zellen mehr als in der korrespondierenden MPO-KO-Kontrollgruppe ($p < 0,001$) sowie 10 T-Zellen mehr als in der gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe ($p < 0,001$) gezählt.

Analog zur Infiltration von Monozyten/Makrophagen kann die Anzahl der T-Zellen im Intersti-

tium als Anhaltspunkt für die Entzündungsaktivität und damit auch für die Ausprägung der Nierenschädigung interpretiert werden. Die gesteigerte Infiltration von T-Zellen in die Nieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe lässt eine höhere Entzündungsaktivität als bei Tieren der gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe vermuten.

3.5.8 Infiltration von Neutrophilen in der Niere

Die Ergebnisse der Auszählungen der Neutrophilen im Niereninterstitium der Versuchstiere sind in Tabelle 13 und Abbildung 17 abgebildet.

Infiltration von Entzündungszellen		Neutrophile im Interstitium		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	0,10	0,03	9
Kontrollen	MPO-KO	0,16	0,06	10
DOCA+Ang-II	WT	0,14	0,07	16
DOCA+Ang-II	MPO-KO	0,19	0,04	18

Tabelle 13 Neutrophile im Niereninterstitium

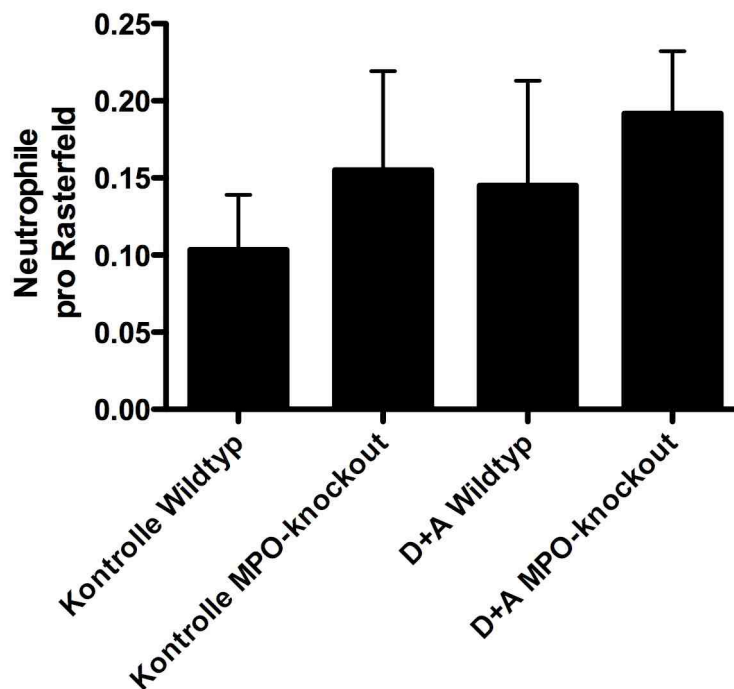


Abbildung 17 Neutrophileninfiltration MPO-Defizienz geht bei C57BL/6J-Mäusen weder basal noch unter Belastung mit DOCA und Ang II mit einer erhöhten Infiltration von Neutrophilen in die Niere einher.

In allen vier Versuchsgruppen waren Neutrophile im Interstitium nur spärlich anzutreffen. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bezüglich der Neutrophileninfiltration bestanden nicht. Es ist daher anzunehmen, dass die Infiltration von Neutrophilen bei der Pathogenese Hypertonie-induzierter Nierenschäden wenn überhaupt nur eine untergeordnete Rolle spielt.

3.6 Proteinuriediagnostik

3.6.1 Diagnostischer Wert der Proteinuriediagnostik

Der gesunde Glomerulusfilter besitzt größen- und ladungsselektive Eigenschaften und hält Proteine mit einem Molekulargewicht über 60k Da zurück. Niedermolekulare Proteine werden dagegen physiologischerweise glomerulär filtriert, jedoch zu über 90% aus dem Primärharn wieder rückresorbiert, so dass nur geringe Mengen an Proteinen in den Endharn gelangen.

Bei Schädigung des Glomerulusfilters treten dagegen zunehmend hochmolekulare Proteine mit einem Molekulargewicht über 60 kDa in den Primärharn über. Je nach Schädigungsgrad entsteht dadurch zunächst eine selektive glomeruläre Proteinurie mit vornehmlichem Verlust des Leitproteins Albumin (67 kDa). Überschreitet die filtrierte Menge an Albumin die Rückresorptionskapazität des proximalen Tubulus, so steigt konsekutiv die Albuminausscheidung im Urin. Mit fortschreitender Schädigung entwickelt sich eine unselektive glomeruläre, Proteinurie, wobei auch größere Proteine wie Transferrin (80 kDa) oder IgG (144 kDa) in das Filtrat übertreten. Die pathologische Ausscheidung von Proteinen unter 50 kDa wie α -Mikroglobulin (31 kDa) spricht dagegen für eine tubuläre Schädigung bei ansonsten intaktem Glomerulusfilter.

Die Höhe der Albuminausscheidung korreliert direkt mit dem Risiko für Nieren- und Herz-Kreislauferkrankungen und geht mit einer erhöhten Mortalität einher (de Zeeuw et al., 2006). Gemäß der Definition der Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) von 2002 ist eine über mehr als 3 Monate bestehende Albuminurie Definitionskriterium des chronischen Nierenversagens.

3.6.2 Urinsticks

Zur groben Beurteilung der Proteinkonzentration in den bei Versuchsende gewonnenen Urinproben diente die semiquantitative Einschätzung mittels Urinsticks (Multistix 10 SG, Bayer, Germany). Abbildung 18 zeigt exemplarisch den Befund der Urinsticksuntersuchung von Versuchsdurchgang 4.

Proteine waren im Urin der Tiere beider Kontrollgruppen nur in Spuren vorhanden. Die Urine von Tieren der WT-Hochdruckgruppe waren dagegen in der Lage, das Proteinfeld pathologisch anzufärben. Das Färbeverhalten entsprach dem einer mittelgradig ausgeprägten Proteinurie. Im Vergleich dazu fiel die Intensität der Färbung von Testfeldern, die mit Urinen von Mäusen der MPO-Hochdruckgruppe beträufelt wurden, sehr viel stärker aus. Dieser Befund lässt eine hochgradig ausgeprägte Proteinurie annehmen.

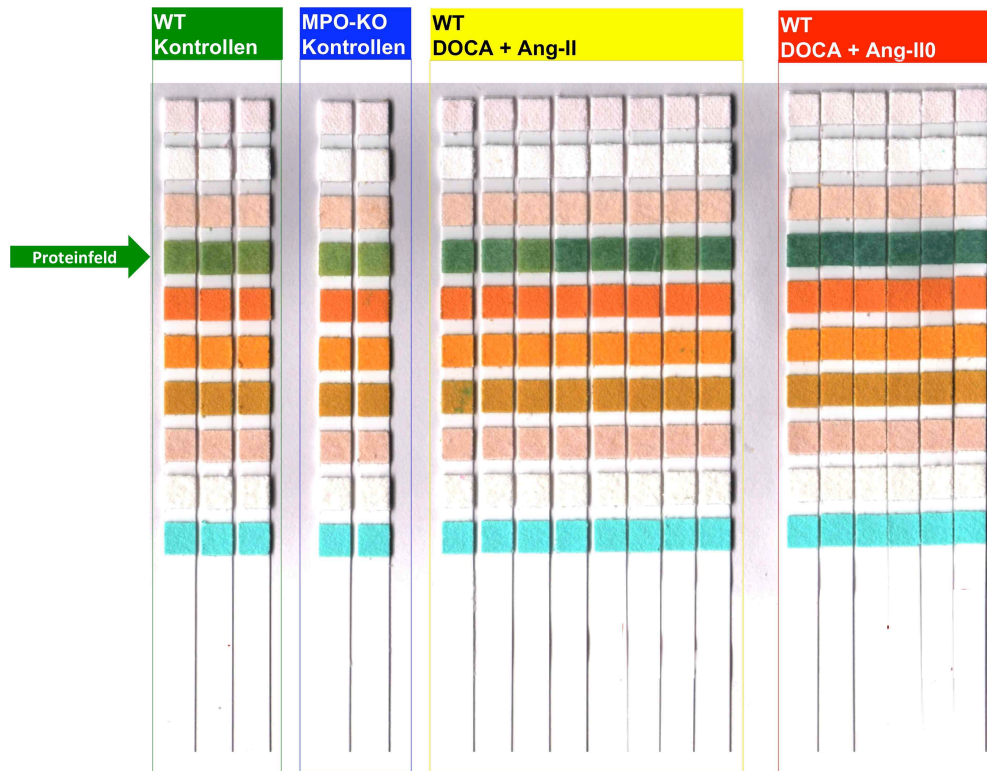


Abbildung 18 Urinsticks bei Versuchsende (Versuchsdurchgang Nr.4) MPO-Defizienz führt bei C57BL/6J-Mäusen basal nicht zu einer mittels Urinsticks detektierbaren Proteinurie. Nach Induktion einer arteriellen Hypertonie mit DOCA und Ang II lässt bei diesen Mäusen jedoch die Färbung des Proteintestfeldes im Vergleich zu gleichbehandelten WT-Mäusen schon im Urinsticks eine höhere Proteinausscheidung vermuten.

3.6.3 Ergebnisse der Albumin/Kreatinin-Bestimmung im Urin

In Tabelle 14 sind die bei Versuchsbeginn sowie Versuchsende erhobenen Albumin/Kreatinin-Quotienten zu sehen und in Abbildung 19 graphisch dargestellt.

Albumin/Kreatinin-Quotient im Urin		Versuchsbeginn			Versuchsende		
		Mittelwert	Sem	N	Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	0,06	0,01	9	0,06	0,01	9
Kontrollen	MPO-KO	0,09	0,02	10	0,12	0,04	10
DOCA+Ang-II	WT	0,18	0,06	20	60,09	10,30	18
DOCA+Ang-II	MPO-KO	0,31	0,13	19	285,23	38,42	18

Tabelle 14 Albumin/Kreatinin-Quotienten im Urin

Zu Versuchsbeginn konnten bezüglich der Albumin/Kreatinin-Quotienten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden. Anhaltspunkte für eine bei Versuchsbeginn schon vorhandene Albuminurie bestand demnach in keiner der Versuchsgruppen.

Auch bei Versuchsende wurden in beiden Kontrollgruppen keine pathologisch erhöhten Albumin/Kreatinin-Quotienten gefunden (Abbildung 19). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen bestanden nicht.

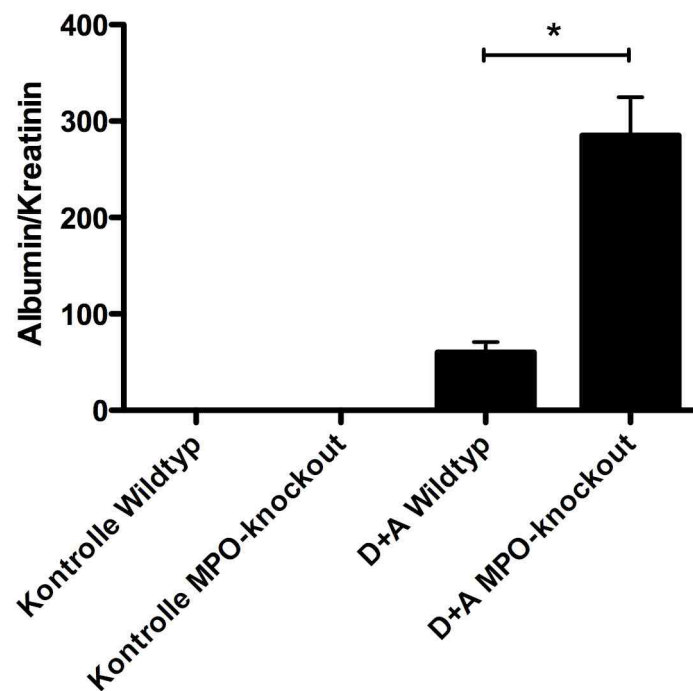


Abbildung 19 Albumin/Kreatinin-Quotienten (Versuchsende) MPO-Defizienz geht in C57BL/6J-Mäusen basal nicht mit einer erhöhten Albuminausscheidung im Urin einher. Nach Induktion einer arteriellen Hypertonie mit DOCA und Ang II findet sich bei diesen Mäusen jedoch im Vergleich zu gleichbehandelten WT-Mäusen eine signifikant größere Albuminurie, was einen schwereren Glomerulusschaden impliziert.

In den Urinen der Tiere der WT-Hochdruckgruppe wurde dagegen ein Albumin/Kreatinin-Quotient im Mittelwert von 60,09 bzw. für die MPO-KO-Hochdruckgruppe von 285,23 ermittelt. Beide Werte waren im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollgruppen mit $p < 0,01$ (WT-Kontrollgruppe vs. WT-Hochdruckgruppe) bzw. $p < 0,001$ (MPO-KO-Kontrollgruppe vs. MPO-KO-Hochdruckgruppe) signifikant erhöht.

Der Tatbestand einer Makroalbuminurie, welche schwerwiegende Nierenschäden impliziert, war in beiden Hochdruckgruppen erfüllt. Die Albuminurie fiel dabei bei Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe im Vergleich zu denen der WT-Hochdruckgruppe signifikant höher aus ($p < 0,001$).

3.6.4 Ergebnisse der Uringelektrophorese

Die Gelelektrophorese der bei Versuchsende gewonnenen Urine diente sowohl dem Nachweis als auch der Differenzierung der im Urin ausgeschiedenen Proteine anhand ihres Molekulargewichtes und damit der qualitativen Einordnung der Proteinurie.

In Abbildung 20 ist exemplarisch das Ergebnis der Gelelektrophorese der Urine, welche zu Versuchsende von Versuchsdurchgang 4 gewonnen wurden, dargestellt.

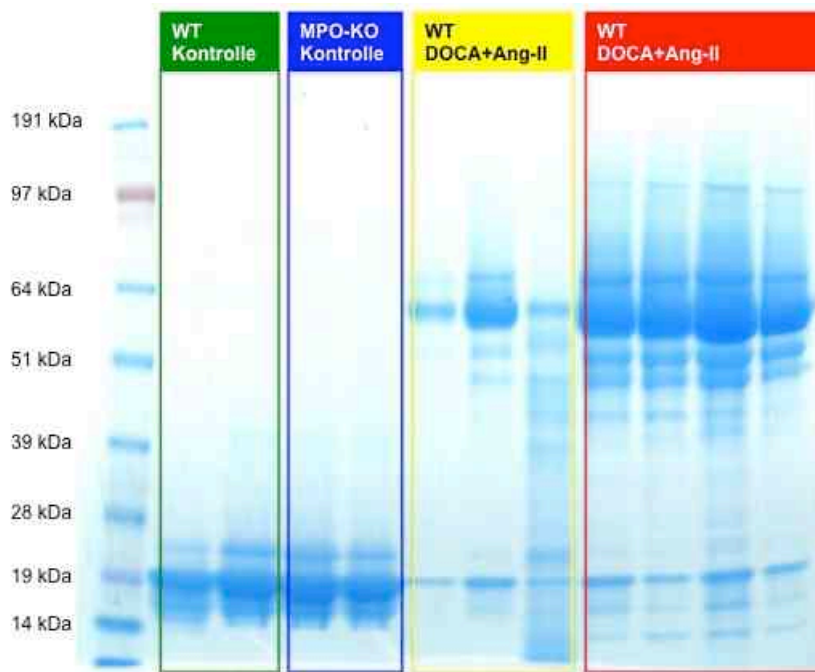


Abbildung 20 Uringelektrophorese bei Versuchsende (Versuchsdurchgang Nr. 4) MPO-Defizienz geht in C57BL/6J-Mäusen basal nicht mit einer erhöhten Ausscheidung von Proteinen im Urin einher. Bei Induktion einer arteriellen Hypertonie durch DOCA und Ang II entwickelt sich in diesen Mäusen im Vergleich zu gleichbehandelten WT-Mäusen jedoch nicht nur eine ausgeprägtere Albuminurie, sondern auch Ausscheidung von höhermolekularen Proteinen was insgesamt eine schwerere Glomerulusschädigung vermuten lässt.

In den Urinen von Tieren der beiden Kontrollgruppen konnten bei Versuchsende lediglich Proteine mit einem Molekulargewicht unter 25 kDa nachgewiesen werden. Dieser Befund entspricht dem Normalzustand, da in der gesunden Niere physiologischerweise niedermolekulare Proteine glomerulär filtriert und nur teilweise rückresorbiert werden. Vor dem Hintergrund dieses Befundes kann in beiden Kontrollgruppen die Intaktheit von sowohl Glomerulusfilter als auch Tubulussystem angenommen werden.

Im Gegensatz zu den Kontrollgruppen waren bei beiden Hochdruckgruppen hochmolekulare Proteine im Urin nachweisbar. In den Urinen der WT-Hochdruckgruppe fanden sich vornehmlich auffällige angefärbte Proteinbanden im Bereich von 64 kDa. Da Albumin ein Molekulargewicht von ca. 67 kDa besitzt und im Plasma von allen Proteinen die höchste Konzentration einnimmt, kann angenommen werden, dass es sich bei den angefärbten Banden um im Urin ausgeschiedene Albumine handelt. Diese Annahme wurde durch das Ergebnis der absoluten Quantifizierung der Albuminurie mittels ELISA, welche den Hochdruckgruppen eine ausgeprägte Albuminurie attestieren konnte, unterstützt. Die pathologische Ausscheidung von Proteinen mit einem Molekulargewicht um 64 kDa im Urin impliziert einen Glomeruluschaden mit selektiver glomerulärer Proteinurie. Insgesamt gilt dies als ein für hypertensive Glomerulosklerose charakteristischer Befund (Boesken, 1979).

Das Färbemuster der durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine in den Urin der Tiere der MPO-KO-Hochdruckgruppe unterschied sich stark von dem der WT-Hochdruck-

gruppe. Im Urin der MPO-KO-Tiere fanden sich stärker ausgeprägte Proteinbanden im Bereich von 64 kDa sowie multiple pathologische Proteinbanden im Bereich von 39-64 kDa. Diese Feststellung lässt eine stark ausgeprägte Albuminurie annehmen, welche auch quantitativ mittels ELISA bestätigt werden konnte. Ferner waren zusätzlich Proteine mit einem Molekulargewicht um 97 kDa im Urin nachweisbar. Zusammengefasst lassen diese Befunde eine glomeruläre Schädigung mit dem Vorhandensein einer unselektiven glomerulären Proteinurie vermuten.

Bei der Interpretation der genannten Befunde ist zu beachten, dass die Gelelektrophorese der Urine, sowie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, keine qualitative Aussage über die Höhe der Proteinurie zulässt da von allen Tieren ohne Berücksichtigung der Nierenfunktion die gleiche Menge Urin eingesetzt wurde. Die bei den Kontrollgruppen gefundenen Banden zwischen 15 und 25 kDa wurden entsprechend in den beiden Hochdruckgruppen schwächer ausgeprägt gefunden. Ursächlich dafür dürfte die bei diesen Tieren beobachtete Polyurie sein, was zu einer stärkeren Verdünnung der Proteine im Urin führt. Zur exakten quantitativen Bestimmung der Höhe der Proteinurie wurde die Albuminurie mittels ELISA bestimmt und auf das Urinkreatinin korrigiert.

3.7 Blutfettwerte

Für die Bestimmung der Blutfettwerte standen Heparinplasmaproben aus vier unabhängig durchgeführten Versuchsdurchgängen zur Verfügung. Bei Versuchsende entsprach der Probenumfang für die WT-Kontrollgruppe N=9, für die MPO-KO-Kontrollgruppe N=10, sowie für die WT-Hochdruckgruppe N=17, und für die MPO-KO-Hochdruckgruppe N=18.

3.7.1 Diagnostischer Wert der Dyslipidämie

Ein Charakteristikum der großen Proteinurie bilden Veränderungen des Lipidmetabolismus, welche sich in abnormalen Verhältnissen der Apolipoproteinen sowie Lipidplasmaspiegeln widerspiegeln. Typischerweise werden dabei erhöhte Serumspiegel von Triglyceriden und Cholesterin gefunden (Vaziri et al., 2003). Die genauen pathophysiologischen Hintergründe für die Entstehung der Dyslipidämie bei einer großen Proteinurie sind jedoch noch unverständlich.

In frühen Studien wurde vermutet, dass der wichtigste Faktor für die Entstehung der sekundären Dyslipidämie der Ausprägungsgrad der Proteinurie ist (Attman et al., 1993). Für dieses Phänomen verantwortlich gemacht wurde eine erhöhte Synthese und Sekretion der Lipoproteinen VLDL und LDL in der Leber. Dieser Hypothese zufolge stimuliert die reduzierte Serumkonzentration von Albumin bzw. der reduzierte onkotische Druck im Plasma die hepati-

sche Synthese von Albumin sowie anderer Proteine wie Lipoproteine, wodurch wiederum die sekundäre Dyslipidämie entsteht.

Neuere Studien halten dagegen andere Mechanismen für wahrscheinlicher. Hinweise darauf liefert der Befund, dass sich bei Patienten mit nephrotischem Syndrom die endothelständige Lipoproteinlipase sowie die hepatische Lipase herunterreguliert finden (Liang et al., 1997). Beide Enzyme katalysieren bekannterweise die Delipidation von triglyceridreichen Lipoproteinen. Andere Studien fanden Hinweise darauf, dass Patienten mit nephrotischem Syndrom an einer erworbenen Defizienz des LDL-Rezeptors leiden (Vaziri et al., 2003), mit der Folge eines reduzierten rezeptorvermittelten Abbaus von LDL. Insgesamt implizieren diese Befunde eine gestörte Clearance von Chylomikronen und VLDL und LDL, welche entscheidend für den Anstieg der Serumtriglyceride verantwortlich zu sein scheint (Trevisan et al., 2006). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Hypoalbuminämie zur Hochregulation der HMG-CoA-Reductase führt (Vaziri et al., 2003). In diesem Kontext wurde auch herausgefunden, dass sich bei Patienten mit nephrotischem Syndrom die ACAT (Acyl Coenzym A Cholesterol Acyltransferase) in Hepatozyten hochreguliert findet. Zusammengefasst deuten diese Befunde auf eine gesteigerte Freisetzung von Cholesterin aus Hepatozyten und konsekutive Hypercholesterinämie.

Unabhängig von ihrem genauen Entstehungsmechanismus wird angenommen, dass zwischen der Progression chronischer Nierenerkrankungen und der dabei gefundenen sekundären Dyslipidämie eine Korrelation besteht. In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass hohe Spiegel von Triglyceriden und Cholesterin bei Menschen unabhängige Risikofaktoren für die Progression von Nierenerkrankungen darstellen. Die Dyslipidämie scheint dabei nicht nur eine Komplikation des chronischen Nierenversagens zu sein. Studien konnten zeigen, dass Hypertriglyceridämien schon in frühen Stadien des Nierenversagens und damit häufig noch vor dem Anstieg von Serumkreatinin nachweisbar sind (Fliser et al., 1998). Dass Abnormalitäten im Lipidstatus schon in frühen Stadien von Nierenerkrankungen vorhanden sein können, lässt spekulieren dass Dyslipidämien nicht nur zur Progression kardiovaskulärer sondern auch renaler Erkrankungen beitragen (Trevisan et al., 2006). Studien anhand von Tiermodellen haben gezeigt, dass Hypercholesterinämie die Progression von Nierenerkrankungen beschleunigt (Abrass, 2004). In Ratten induziert fettreiche Nahrung z.B. die Infiltration von Makrophagen und Bildung von Schaumzellen mit konsekutiver Entwicklung einer Glomerulosklerose (Hattori et al., 1999). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Makrophagen oxidierte Lipide phagozytieren und sich anschließend zu Schaumzellen verwandeln. Diese Schaumzellen sezernieren wiederum Zytokine, welche weitere Makrophagen anlocken. Dadurch könnte eine Dyslipidämie direkt zur Progression entzündlich-fibrotischer Nierenveränderungen beitragen.

3.7.2 Cholesterin

Bei Versuchsende wurde das Gesamtcholesterin im Heparinplasma der Versuchstiere bestimmt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 15 sowie Abbildung 21 einzusehen.

Blutfette im Heparinplasma (Teil 1)		Cholesterin (mg/dl)		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	85	3	9
Kontrollen	MPO-KO	99	5	10
DOCA+Ang-II	WT	206	23	17
DOCA+Ang-II	MPO-KO	362	39	18

Tabelle 15 Cholesterin im Heparinplasma

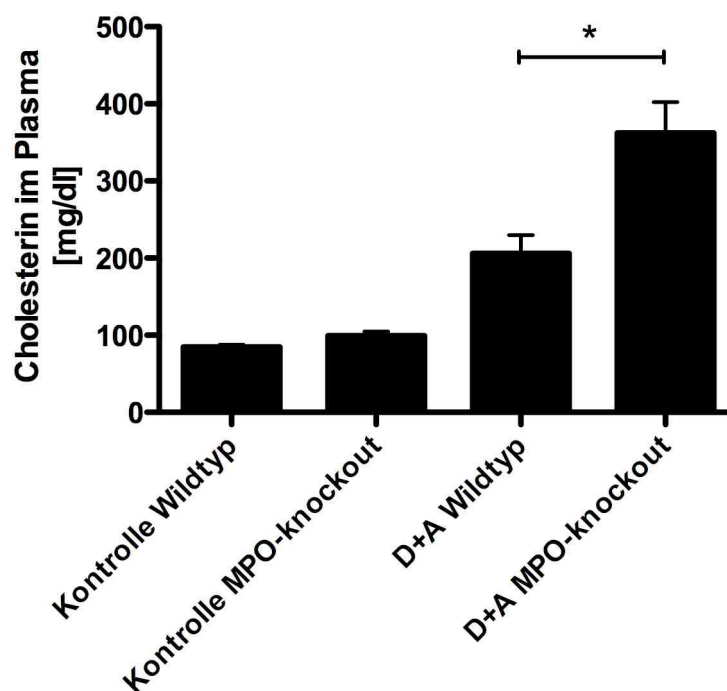


Abbildung 21 Cholesterin im Heparinplasma MPO-Defizienz geht basal in C57BL/6J-Mäusen nicht mit erhöhten Cholesterinspiegeln im Heparinplasma einher. Bei MPO-KO-Mäusen findet sich dagegen nach Induktion einer arteriellen Hypertonie durch DOCA und Ang II im Vergleich zu gleichbehandelten WT-Mäusen eine signifikant höhergradige Hypercholesterinämie. Dieser Befund erklärt sich durch die ausgeprägtere Proteinurie dieser Tiere.

Für Tiere der WT-Kontrollgruppe wurde im Heparinplasma im Mittelwert ein Cholesterinspiegel von 85 mg/dl, für die der MPO-KO-Kontrollgruppe von 99 mg/dl bestimmt. Diese Werte entsprechen den in der Literatur gefundenen Angaben für Normcholesterinämie bei Mäusen (Verdegue et al., 2007). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen konnten nicht gefunden werden.

Bei Tieren der WT-Hochdruckgruppe waren die Cholesterinspiegel im Vergleich zur korrespondierenden WT-Kontrollgruppe im Mittel 2,4-fach höher ($p < 0,05$). Dieser Befund lässt eine im Rahmen der großen Proteinurie entstandene sekundäre Hypercholesterinämie

annehmen. Bei den Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe waren die Cholesterinspiegel im Vergleich zur korrespondierenden MPO-KO-Kontrollgruppe 3,7 fach ($p < 0,001$) sowie im Vergleich zur gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe 1,8 fach ($p < 0,001$) erhöht. Dieser Befund lässt eine ausgeprägtere sekundäre Dyslipidämie und damit einen höheren Schweregrad der zugrundeliegenden Nierenschädigung vermuten.

3.7.3 Triglyceride

In Tabelle 16 und Abbildung 22 sind die Mittelwerte der Bestimmung der Triglyceridspiegel im Heparinplasma der Versuchstiere bei Versuchsende dargestellt.

Blutfette im Heparinplasma (Teil 2)		Triglyceride (mg/dl)		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	128	14	9
Kontrollen	MPO-KO	157	12	10
DOCA+Ang-II	WT	170	20	17
DOCA+Ang-II	MPO-KO	355	48	18

Tabelle 16 Triglyceride im Heparinplasma

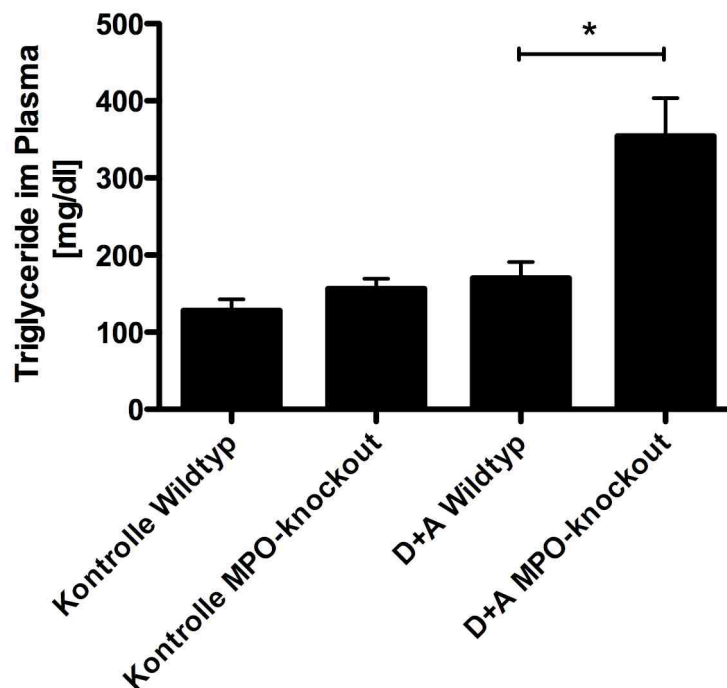


Abbildung 22 Triglyceride im Heparinplasma MPO-Defizienz geht basal in C57BL/6J-Mäusen nicht mit signifikant erhöhten Triglyceridspiegeln im Heparinplasma einher. Nur bei diesen Mäusen, nicht jedoch den gleichbehandelten WT-Mäusen, führte die Induktion einer arteriellen Hypertonie durch DOCA und Ang II zu einer signifikanten Hypertriglyceridämie.

Die Tiere der beiden Kontrollgruppen unterschieden sich bezüglich der Triglyceridspiegel nicht signifikant voneinander. Für die WT-Hochdruckgruppe wurde im Mittelwert ein Triglyceridkonzentration von 170 mg/dl im Heparinplasma ermittelt. Im Vergleich zur

korrespondierenden WT-Kontrollgruppe deutet dies zwar tendenziell auf einen höheren Triglyceridspiegel, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Im Heparinplasma von Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe wurde dagegen im Mittelwert ein Triglyceridspiegel von 355 mg/dl bestimmt. Die Triglyceridkonzentration war dementsprechend im Vergleich zur korrespondierenden MPO-KO-Kontrollgruppe im Mittel 2,3 fach erhöht ($p < 0,001$), im Vergleich zur gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe 2 fach höher ($p < 0,001$). Als Ursache für diesen Befund kann analog zur sekundären Hypercholesterinämie im Rahmen der großen Proteinurie eine sekundäre Hypertriglyceridämie angenommen werden.

3.8 Renale Genexpression

Über die Aktivierung und Deaktivierung der Transkription spezifischer Gene können Zellen ihre Funktionen regulieren. Die Genexpression ist dabei meist direkt proportional zur Menge der transkribierten mRNA des betreffenden Genes. Die mRNA dient während der Translation an Ribosomen als „template“ für die Synthese des entsprechenden Proteins. Aus diesem Grunde korreliert die Konzentration der mRNA auch gut mit der Konzentration des zugehörigen Proteins. In der vorliegenden Arbeit wurden die Expressionen verschiedener Gene im Bereich des Nierenkortex untersucht. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Expression von inflammatorischen Chemokinen (MCP-1, TNF- α , IP-10) und Marker der interstitiellen Nierenfibrose (PAI-1, TGF- β 1, Kollagen-Typ-I/III, Fibronectin).

Ausgewertet wurde ein Probenumfang von in der WT-Kontrollgruppe N=9, MPO-KO-Kontrollgruppe N=10, WT-Hochdruckgruppe N=16 sowie MPO-KO-Hochdruckgruppe N=18. Da die RNA-Isolierung nicht bei allen Tieren mit gleicher Effizienz möglich war, fehlten in der WT-Kontrollgruppe eine Probe sowie in der WT-Hochdruckgruppen zwei zur Auswertung.

3.8.1 MCP-1/CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)

In Tabelle 17 und Abbildung 23 sind die relativen Expressionen des MCP-1 in den Nierenkortexen der Versuchstiere bei Versuchsende aufgezeigt.

Die Tiere der Kontrollgruppen unterschieden sich bezüglich der Expression von MCP-1 im Nierenkortex nicht signifikant voneinander. Bei Tieren der WT-Hochdruckgruppe war die relative Expression von MCP-1 dagegen durchschnittlich 6,4-fach höher als in der korrespondierenden WT-Kontrollgruppe. Bei den Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe wurde durchschnittlich eine 16,7-fache höhere relative Expression von MCP-1 im Nierenkortex im Vergleich zur korrespondierenden MPO-KO-Kontrollgruppe gefunden ($p < 0,001$). Ferner übertraf die MCP-1-Expression der Tiere der MPO-KO-Hochdruckgruppe auch 5,7-fach die der WT-Hochdruckgruppe ($p < 0,001$).

MCP-1 ist ein Vertreter der Chemokine. Chemokine sind chemotaktische Zytokine und werden i.d.R. an Orten von Entzündungsgeschehen von Leukozyten sowie Gewebezellen sezerniert. Sie üben eine chemotaktische Wirkung auf Leukozyten aus und steuern dadurch deren Wanderungsbewegungen im Körper. MCP-1 beeinflusst die Chemotaxis sowie Aktivierung von Monozyten (Matsushima et al., 1989) und zählt in entzündlichen Prozessen zu den wichtigsten Monozyten-chemoattrahierenden Faktoren (Liu et al., 1996). Die Migration von Monozyten aus dem Blutstrom in den subendothelialen, subvaskulären Raum und später auch in das Tubulointerstitium scheint bei der Pathogenese Hypertonie-induzierter nephrosklerotischer Nierenschäden maßgeblich beteiligt zu sein. Die Extravasation von

Monozyten in das Interstitium wird dabei entscheidend durch lokal produziertes MCP-1 stimuliert. Eine gesteigerte Expression von MPC-1 korrelierte demnach mit der Akkumulation von Makrophagen im Interstitium. Ferner konnte gezeigt werden, dass der Grad der Makrophagenakkumulation im Interstitium mit dem der interstitiellen Fibrose korreliert (Chun et al., 2004).

Relative Expression von MCP-1		relative Expression MCP-1		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	1,1	0,2	9
Kontrollen	MPO-KO	2,4	0,8	10
DOCA+Ang-II	WT	7,0	1,7	16
DOCA+Ang-II	MPO-KO	40,1	9,4	17

Tabelle 17 Relative Expression MCP-1

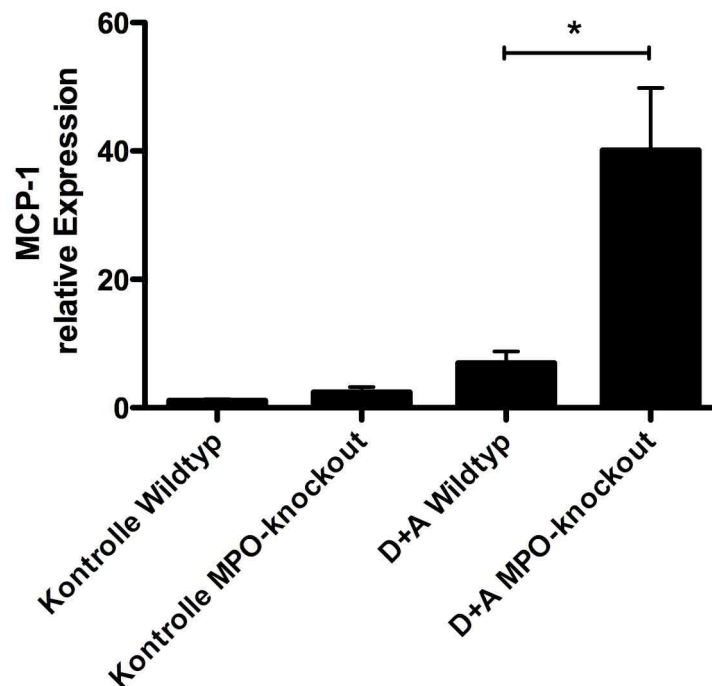


Abbildung 23 Relative Expression MCP-1 MPO-Defizienz geht basal bei C57BL/6J-Mäusen nicht mit einer signifikant erhöhten Expression von MCP-1 im Nierenkortex einher. Die Induktion einer arteriellen Hypertonie durch DOCA und Ang II führt in diesen Mäusen im Vergleich zu gleichbehandelten WT-Mäusen jedoch zu einem signifikanten Anstieg der MCP-1-Expression. Dieser Befund korreliert direkt mit der lichtmikroskopisch quantifizierten gesteigerten Monozytenakkumulation in den Nieren MPO-defizienter Mäuse.

Da MCP-1 im Rahmen von entzündlich-fibrotischen Umbauprozessen Monozyten anlockt, geht ein Anstieg in der MCP-1-Expression i.d.R. mit einer gesteigerten Monozytenextravasation und folgender Gewebereaktion einher. Die konsekutive Monozytenakkumulation konnte in beiden Hochdruckgruppen nach immunhistochemischer Färbung lichtmikroskopisch quantitativ bestätigt werden.

3.8.2 TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)

In Tabelle 18 und Abbildung 24 sind die relativen Expressionen des TNF- α in den Nierenrinden der Versuchstiere bei Versuchsende aufgezeigt.

Relative Expression von TNF-alpha		relative Expression TNF-alpha		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	1,0	0,1	9
Kontrollen	MPO-KO	1,3	0,2	10
DOCA+Ang-II	WT	2,9	0,4	16
DOCA+Ang-II	MPO-KO	5,7	0,9	18

Tabelle 18 Relative Expression TNF- α

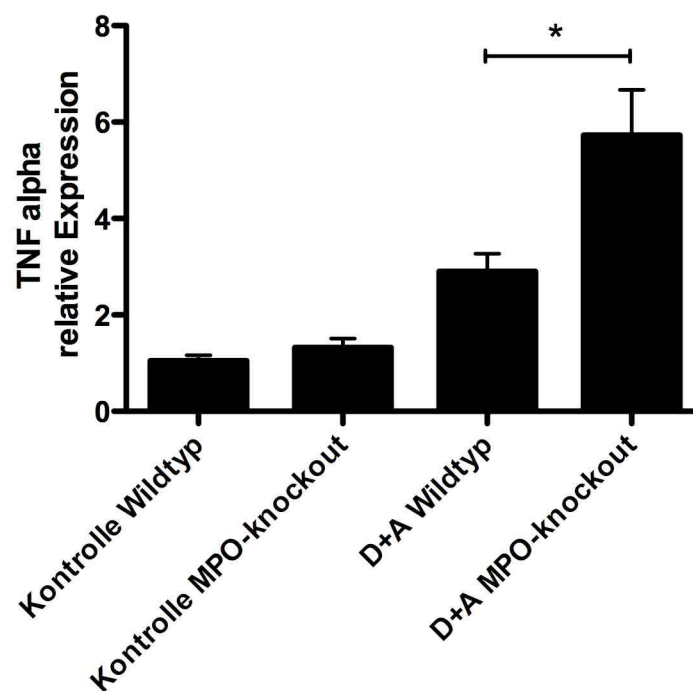


Abbildung 24 Relative Expression TNF- α MPO-Defizienz geht basal bei C57BL/6J-Mäusen nicht mit einer signifikant erhöhten Expression von TNF- α im Nierenkortex einher. Nach Induktion einer arteriellen Hypertonie durch DOCA und Ang II wurde in diesen Mäusen im Vergleich zu gleichbehandelten WT-Mäusen jedoch ein signifikant höherer Anstieg der TNF- α -Expression beobachtet.

Die Tieren der beiden Kontrollgruppen unterschieden sich hinsichtlich der relativen Expression von TNF- α im Nierenkortex nicht signifikant voneinander. Bei den Tieren der WT-Hochdruckgruppe war die relative Expression von TNF- α dagegen durchschnittlich um 2,9-fach höher als in der korrespondierenden WT-Kontrollgruppe. Auch in der MPO-KO-Hochdruckgruppe war die relative Expression von TNF- α im Nierenkortex im Vergleich zur korrespondierenden MPO-KO-Kontrollgruppe höher, und zwar im Mittel 4,4-fach ($p < 0,001$). Die TNF- α -Expression der Tiere der MPO-KO-Hochdruckgruppe übertraf zudem auch 2,0-fach die der gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe ($p < 0,01$).

TNF- α wirkt potent proinflammatorisch und ist ein wichtiger Mediator entzündlicher Gewebeverletzungen. Es wird angenommen, dass TNF- α bei der Pathogenese von akuten und chronischen Nierenerkrankungen eine erhebliche Rolle spielt (Vielhauer et al., 2007). Aus diesem Grund ist ein signifikanter Anstieg in der TNF- α -Expression, wie bei Tieren der beiden Hochdruckgruppe gefunden, deutlicher Hinweis auf einen entzündlichen Prozess. Eine höhere Entzündungsaktivität in den Nieren der Tiere der MPO-KO-Hochdruckgruppe im Vergleich zu denen der gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe ist zu vermuten.

3.8.3 IP-10 (CXCL10)

Die relativen Expressionen von IP-10 in den Nierenrinden der Tiere bei Versuchsende sind in Tabelle 19 und Abbildung 25 einzusehen.

Relative Expression von IP-10		relative Expression IP-10		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	1,0	0,1	9
Kontrollen	MPO-KO	1,4	0,3	10
DOCA+Ang-II	WT	3,5	0,8	16
DOCA+Ang-II	MPO-KO	5,9	0,8	18

Tabelle 19 Relative Expression IP-10

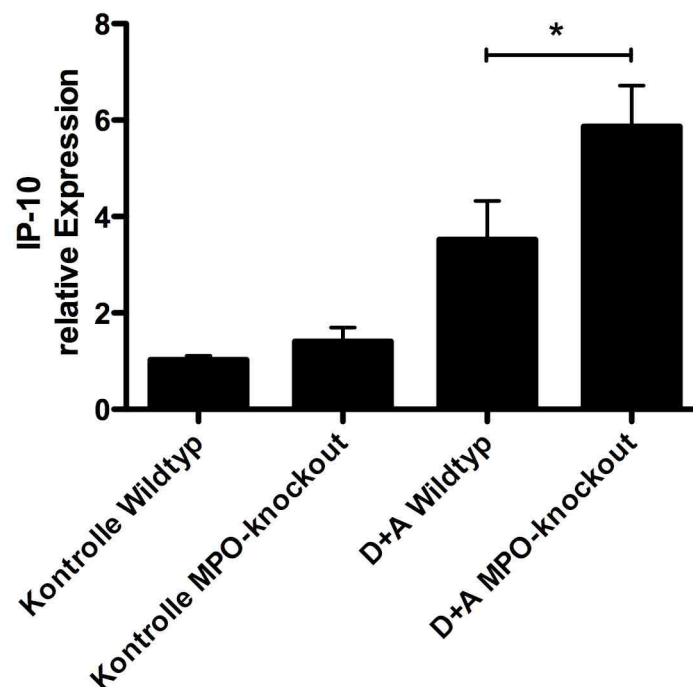


Abbildung 25 Relative Expression IP-10 MPO-Defizienz geht basal bei C57BL/6J-Mäusen nicht mit einer signifikant erhöhten Expression von IP-10 im Nierenkortex einher. Die Induktion einer arteriellen Hypertonie durch DOCA und Ang II führt in diesen Mäusen im Vergleich zu gleichbehandelten WT-Mäusen jedoch zu einem signifikant höheren Anstieg der IP-10-Expression.

Ein signifikanter Unterschied in der Expression von IP-10 im Nierenkortex bestand zwischen den beiden Kontrollgruppen nicht. Bei Tieren der WT-Hochdruckgruppe war die relative Expression für IP-10 dagegen 3,5 fach ($p < 0,05$) höher als bei Tieren der korrespondierenden WT-Kontrollgruppe. Bei den Tiere der MPO-KO-Hochdruckgruppe wurde im Vergleich mit der korrespondierenden MPO-KO-Kontrollgruppe eine 4,2 fach ($p < 0,001$) erhöhte Expression von IP-10 gefunden. Der Anstieg in der Expression von IP-10 war im Vergleich zur gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe im Mittel 1,7 fach ($p < 0,05$) höher.

IP-10 ist ein Chemokin für aktivierte T-Zellen, natürliche Killerzellen und Monozyten. Von anderen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass IP-10 und sein Rezeptor CXCR3 im Kontext progressiver renaler Fibrose hochreguliert werden (Nakaya et al., 2007). Ein signifikanter Anstieg in der IP-10-Expression kann deshalb als Hinweis auf einen fibrotischen Prozess in den Nieren der Tiere der WT-Hochdruckgruppe interpretiert werden. Entsprechend deutet die erhöhte IP-10-Expression bei Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe nicht nur auf einen fibrotischen Nierenprozess hin, sondern auch auf eine stärkeren Ausprägungsgrad im Vergleich zur gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe.

3.8.4 Kollagen Typ-I

Die relativen Expressionen von Kollagen Typ-I in den Nierenrinden der Tiere bei Versuchsende sind in Tabelle 20 und Abbildung 26 einzusehen.

Zwischen den beiden Kontrollgruppen wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich der Expression von Kollagen Typ-I im Nierenkortex gefunden. Bei den Tieren der WT-Hochdruckgruppe war die relative Expression für Kollagen Typ-I im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe dagegen 3,1 fach höher ($p < 0,05$). Auch bei den Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe war die Expression von Kollagen Typ-I im Vergleich zur korrespondierenden MPO-KO-Kontrollgruppe signifikant erhöht, und zwar im Mittel 6,1 fach ($p < 0,001$). Der Anstieg in der Expression von Kollagen Typ-I übertraf zudem 1,8 fach den der gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe ($p < 0,01$).

Kollagene sind Strukturproteine des Bindegewebes und werden in mehrere Typen unterteilt. Die Kollagentypen I und III zählen zu den fibrillären Kollagenen, d.h. ihre Monomere bilden Polymerer, welche als Kollagenfibrillen bezeichnet werden. Kollagen Typ-I ist eine integrale Komponente der meisten Bindegewebe und stellt mengenmäßig das bedeutsamste Kollagen der Säugetiere dar. Es ist Hauptbestandteil des lockeren kollagenen Bindegewebes und kommt ferner in Basalmembranen vor. Die Moleküle des Kollagen Typ-III bilden zarte, netzartig (retikulär) angeordnete Kollagenfibrillen. Diese sind Grundlage für flächige Kollagenetze, welche das Stützkorsett im Parenchym der meisten Organe bilden. Da

Kollagene, insbesondere Kollagen Typ-I, Hauptbestandteile entzündlich-fibrotischer Bindegewebsvermehrungen sind, liefert ein Anstieg der Expression von Kollagen Typ-I einen Hinweis auf fibrotische Umbauprozesse im Rahmen einer interstitiellen Nierenfibrose. Dieser Zusammenhang ist für die Pathogenese von durch DOCA und Ang II induzierten hypertensiven Nierenschäden bekannt (Kirchhoff et al., 2007).

In den Nieren der Tiere der MPO-KO-Hochdruckgruppe können deshalb ausgeprägtere entzündlich-fibrotische Umbauprozesse angenommen werden. Diese Annahme wurde durch das Ergebnis der lichtmikroskopischen Charakterisierung der Nierenmorphologie unterstützt.

Relative Expression von Kollagen Typ-I		relative Expression Kollagen Typ-I		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	1,0	0,1	9
Kontrollen	MPO-KO	0,9	0,1	10
DOCA+Ang-II	WT	3,1	0,4	15
DOCA+Ang-II	MPO-KO	5,5	0,7	18

Tabelle 20 Relative Expression Kollagen Typ-I

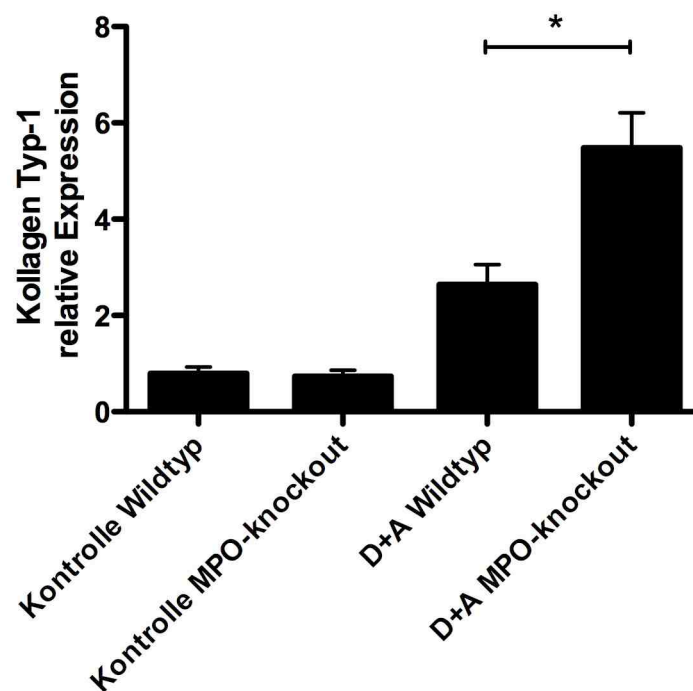


Abbildung 26 Relative Expression Kollagen Typ-I MPO-Defizienz geht basal bei C57BL/6J-Mäusen nicht mit einer signifikant erhöhten Expression von Kollagen Typ-I im Nierenkortex einher. Die Induktion einer arteriellen Hypertonie durch DOCA und Ang II führt in diesen Mäusen im Vergleich zu gleichbehandelten WT-Mäusen jedoch zu einem signifikanten Anstieg der Kollagen-I-Expression.

3.8.5 Kollagen Typ-III

In Tabelle 21 und Abbildung 27 sind die relativen Expressionen von Kollagen Typ-III in den Nierenkortices der Tiere bei Versuchsende dargestellt.

Relative Expression von Kollagen Typ-III		relative Expression Kollagen Typ-III		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	1,1	0,2	9
Kontrollen	MPO-KO	3,7	1,0	10
DOCA+Ang-II	WT	12,1	2,3	15
DOCA+Ang-II	MPO-KO	56,8	18,1	16

Tabelle 21 Relative Expression Kollagen Typ-III

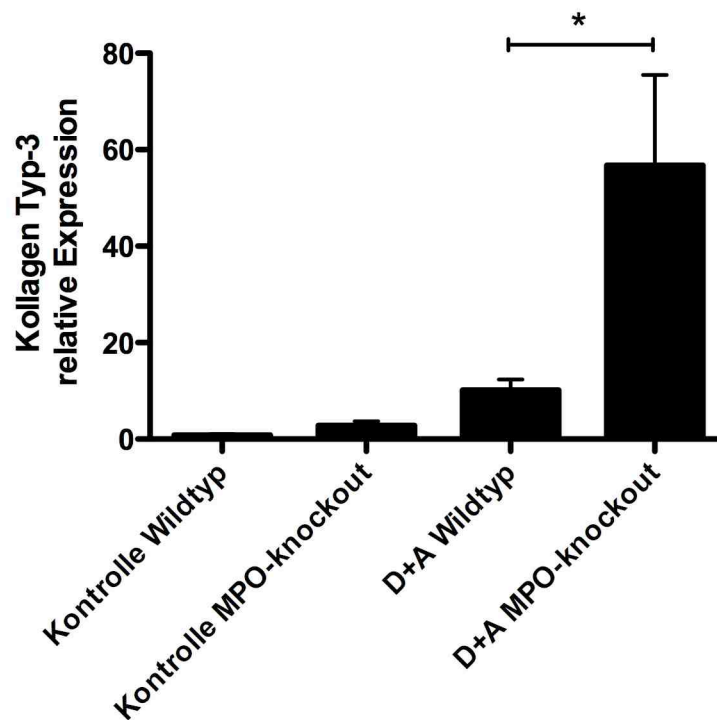


Abbildung 27 Relative Expression Kollagen Typ-III MPO-Defizienz geht basal bei C57BL/6J-Mäusen nicht mit einer signifikant erhöhten Expression von Kollagen Typ-III im Nierenkortex einher. Nach Induktion einer arteriellen Hypertonie durch DOCA + Ang II übertrifft die Kollagen-III-Expression bei diesen Tieren jedoch signifikant die der gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe.

Die beiden Kontrollgruppen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich der relativen Expression von Kollagen Typ-III. Bei den Tieren der WT-Hochdruckgruppe war die relative Expression von Kollagen Typ-III durchschnittlich 12,1 fach höher als bei Tieren der korrespondierenden WT-Kontrollgruppe. Analog zur erhöhten Expression von Kollagen Typ-I spricht dieser Befund für das Vorhandensein von entzündlich-fibrotischen Umbauprozessen.

Die relative renokortikale Expression von Kollagen Typ-III war bei den Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe durchschnittlich 15,4 fach höher als bei Tieren der korrespondierenden MPO-KO-Kontrollgruppe ($p < 0,01$). Der Anstieg in der Kollagen-III-Expression übertraf auch 4,7 fach ($p < 0,01$) den der WT-Hochdruckgruppe. Im Kontext einer ebenfalls signifikant

erhöhten Expression von Kollagen Typ-I lässt dieser Befund sehr viel stärker ausgeprägtere fibrotische Umbauprozesse in den Nieren der Tiere MPO-KO-Hochdruckgruppe vermuten.

3.8.6 PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1)

In Tabelle 22 und Abbildung 28 sind die relativen Expressionen von PAI-1 in den Nierenkortex der Tiere bei Versuchsende dargestellt.

Relative Expression von PAI-1		relative Expression PAI-1		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	1,0	0,1	9
Kontrollen	MPO-KO	1,5	0,2	10
DOCA+Ang-II	WT	10,3	1,6	16
DOCA+Ang-II	MPO-KO	17,9	2,0	18

Tabelle 22 Relative Expression PAI-1

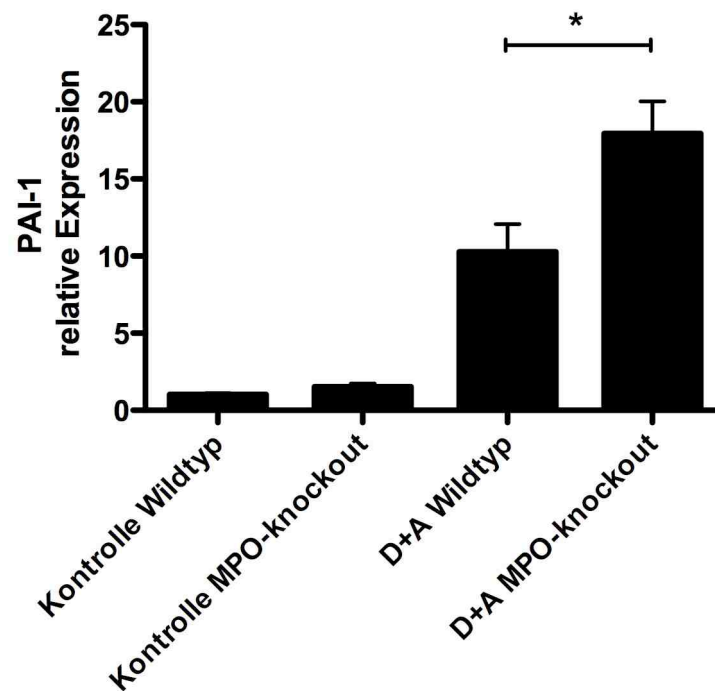


Abbildung 28 Relative Expression PAI-1 MPO-Defizienz geht basal bei C57BL/6J-Mäusen nicht mit einer signifikant erhöhten Expression von PAI-1 im Nierenkortex einher. Nach Induktion einer arteriellen Hypertonie durch DOCA und Ang II übertraf die renokortikale PAI-1-Expression signifikant die der gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe.

Die beiden normotensiven Kontrollgruppen vergleichend wurde kein signifikante Unterschied bezüglich der relativen Expression von PAI-1 in den Nierenkortex gefunden. Bei den Tieren der WT-Hochdruckgruppe wurde dagegen eine durchschnittlich 10,3 fach erhöhte Expression von PAI-1 im Vergleich zur korrespondierenden WT-Kontrollgruppe gefunden ($p < 0,01$). Die relative Expression von PAI-1 war bei den Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe im Mittelwert 11,9 fach höher als bei der korrespondierenden MPO-KO-Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Der Anstieg in der PAI-Expression übertraf zudem signifikant

1,7 fach ($p < 0,01$) den der gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe.

PAI-1 ist ein 50kDa schweres Glykoprotein und der primäre Inhibitor von gewebeständigen Serinproteasen sowie Plasminogenaktivatoren tPA und uPA. Die Funktionen von PAI-1 gehen jedoch weit über die Fibrinolyse hinaus. Es ist bekannt, dass PAI-1 im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen im Niereninterstitium akkumuliert (Zhang et al., 2003). PAI-1 scheint dabei ein starker Promoter für die Entstehung der Nierenfibrose zu sein. Zusammengenommen spricht die Überexprimierung von sowohl der Matrixproteine Kollagen Typ-I, III und Fibronectin als auch PAI-1 in den Nieren der Tiere der beiden Hochdruckgruppe für das Vorhandensein eines entzündlich-fibrotischen Umbauprozesses. In diesem Kontext spricht die höhere Expression von PAI-1 sowie Kollagen Typ-I und III in den Nieren der Tiere der MPO-KO-Hochdruckgruppe für das Vorliegen einer im Vergleich zur WT-Hochdruckgruppe ausgeprägteren entzündlich-fibrotischen Nierenschädigung.

3.8.7 TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1)

In Tabelle 23 und Abbildung 29 sind die relativen Expressionen von TGF- β 1 in den Nierenkortexen der Tiere bei Versuchsende dargestellt.

Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der TGF- β 1-Expression bestand zwischen den beiden normotensiven Kontrollgruppen nicht.

Bei den Tieren der WT-Hochdruckgruppe wurde dagegen eine durchschnittlich 2,5 fach höhere relative Expression von TGF- β 1 im Vergleich zur korrespondierenden WT-Kontrollgruppe gefunden. Auch in der MPO-KO-Hochdruckgruppe war die relative Expression von TGF- β 1 höher als in der korrespondierenden MPO-KO-Kontrollgruppe, und zwar durchschnittlich 2,7 fach ($p < 0,001$). Der Anstieg in der TGF- β 1-Expression fiel auch im Vergleich zur WT-Hochdruckgruppe statistisch signifikant höher aus ($p < 0,05$).

TGF- β 1 ist ein profibrotisches sowie prosklerotisches Zytokin und in der Lage Makrophagen und Fibroblasten zu aktivieren (Wynn, 2008). Es induziert die Apoptose von Podozyten und stimuliert die Ablagerung von Matrixkomponenten (Wolf et al., 2007). TGF- β 1 ist deshalb entscheidend an der Entwicklung der interstitiellen Nierenfibrose, Glomerulosklerose sowie tubulären Atrophie beteiligt. Der bei den hypertensiven MPO-defizienten Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren gefundene höhere Anstieg in der Expression von sowohl TGF- β 1 als auch PAI-1 spricht für das Vorhandensein einer ausgeprägteren fibrotischen Nierenveränderung.

Relative Expression von TGF-beta1		relative Expression TGF-beta1		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	1,1	0,1	9
Kontrollen	MPO-KO	1,6	0,5	10
DOCA+Ang-II	WT	2,7	0,5	16
DOCA+Ang-II	MPO-KO	4,3	0,6	18

Tabelle 23 Relative Expression TGF-β1

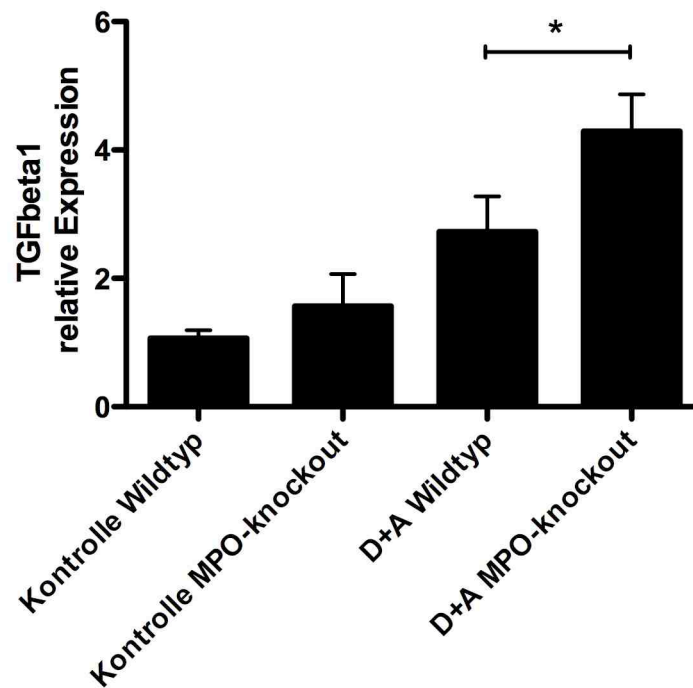


Abbildung 29 Relative Expression TGF-β1 MPO-Defizienz geht basal bei C57BL/6J-Mäusen nicht mit einer signifikant erhöhten Expression von TGF-β1 im Nierenkortex einher. Nach Induktion einer arteriellen Hypertonie durch DOCA und Ang II wurde sowohl in diesen als auch gleichbehandelten WT-Mäusen ein signifikanter Anstieg der TGF-β1-Expression beobachtet, welcher statistisch signifikant bei MPO-defizienten Mäusen ausgeprägter war.

3.8.8 iNOS (induzierbare NO-Synthase)

In Tabelle 24 und Abbildung 30 sind die relativen Expressionen der iNOS in den Nierenrinden der Tiere bei Versuchsende dargestellt.

Die beiden normotensiven Kontrollgruppen vergleichend wurde kein signifikante Unterschied bezüglich der relativen Expression der iNOS in den Nierenkortex gefunden. Auch bei den Tieren der WT-Hochdruckgruppe kein signifikanter Anstieg der iNOS-Expression gemessen. Bei den Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe war dagegen die Expression der iNOS im Vergleich zu den gleichbehandelten WT-Tieren in den Nierenrinden signifikant erhöht. ($p < 0,01$).

Relative Expression von iNOS		relative Expression iNOS		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	1,4	8,1	3
Kontrollen	MPO-KO	0,7	10,0	2
DOCA+Ang-II	WT	2,6	5,0	8
DOCA+Ang-II	MPO-KO	29,9	5,8	6

Tabelle 24 Relative Expression iNOS

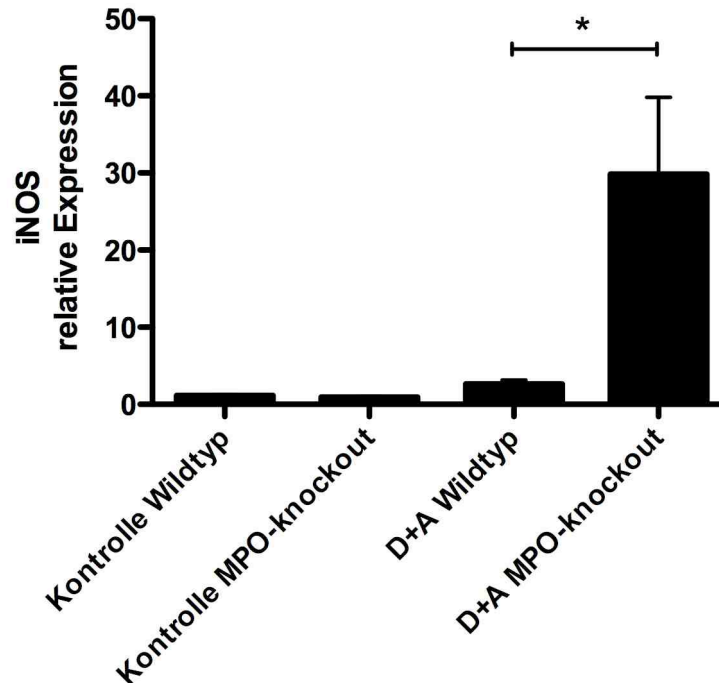


Abbildung 30 Relative Expression iNOS MPO-Defizienz geht basal bei C57BL/6J-Mäusen nicht mit einer signifikant erhöhten Expression der iNOS im Nierenkortex einher. Nach Induktion der arteriellen Hypertonie durch DOCA und Ang II wurde in diesen Mäusen jedoch ein signifikanter Anstieg der iNOS-Expression beobachtet.

3.9 Nierenfunktion

Als Parameter für die glomeruläre Filtrationsrate und damit die Nierenfunktion wurden die Spiegel von Kreatinin, Harnstoff und Cystatin-C im Plasma bzw. Serum bei Versuchsende gemessen. Für die Bestimmung dieser Parameter standen Heparinplasmaproben aus vier unabhängig durchgeführten Versuchsdurchgängen zur Verfügung. Bei Versuchsende entsprach der Probenumfang für die Bestimmung von Kreatinin und Harnstoff in der WT-Kontrollgruppe N=9, der MPO-KO-Kontrollgruppe N=10 sowie der WT-Hochdruckgruppe N=14 und der MPO-KO-Hochdruckgruppe N=18. Zu erwähnen ist deshalb, dass bei einigen Tieren die entsprechenden Werte nicht erhoben werden konnten, da die Aspiration von Blut aus der Bauchorta in diesen Fällen nicht genügend Probenmaterial erbrachte. Insgesamt waren in der WT-Kontrollgruppe eine sowie in der WT-Hochdruckgruppe vier Plasmaproben nicht verfügbar.

3.9.1 Kreatinin

In Tabelle 25 und Abbildung 31 sind die mittleren Kreatininkonzentrationen im Heparinplasma der verschiedenen Versuchsgruppen bei Versuchsende dargestellt.

Nierenfunktion		Kreatinin im Plasma (mg/dl)		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	0,19	0,01	9
Kontrollen	MPO-KO	0,18	0,01	10
DOCA+Ang-II	WT	0,18	0,01	14
DOCA+Ang-II	MPO-KO	0,13	0,01	18

Tabelle 25 Kreatinin im Plasma

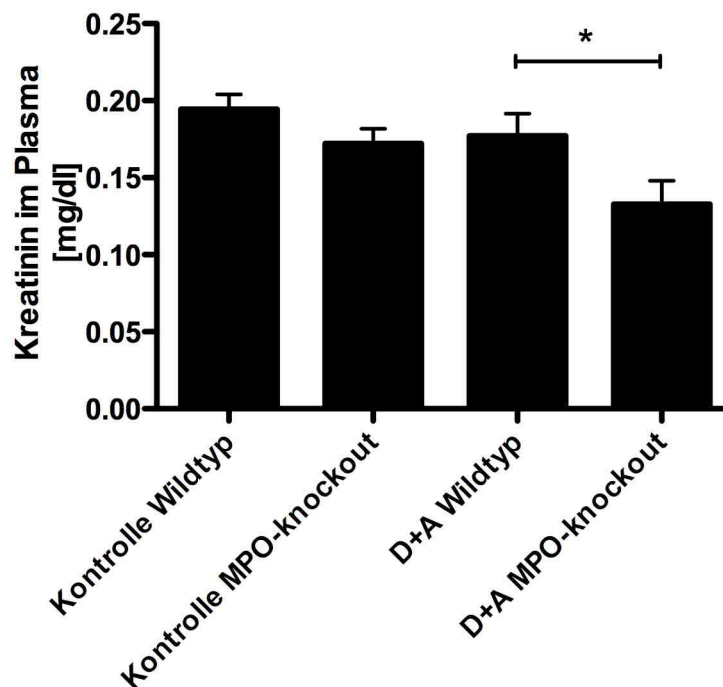


Abbildung 31 Kreatinin im Plasma MPO-Defizienz geht bei C57BL/6J-Mäusen basal nicht mit einem Anstieg des Plasmakreatinins einher. Bei Induktion einer arteriellen Hypertonie mit DOCA und Ang II wurde in diesen Mäusen jedoch paradoxerweise ein Abfall in der Kreatininkonzentration beobachtet. Dies ist Hinweis auf eine Hyperfiltration.

Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Kreatininkonzentration im Heparinplasma bestand zwischen den beiden normotensiven Kontrollgruppen nicht. Auch die Tiere der WT-Hochdruckgruppe unterschieden sich bezüglich der Kreatininkonzentration nicht signifikant vom Kontrollkollektiv. Bei den Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe war der Kreatininspiegel dagegen durchschnittlich 1,4-fach niedriger als in der gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe ($p < 0,05$).

Kreatinin wird routinemäßig im Heparinplasma als Marker für die Nierenfunktion bestimmt.

Da in der WT-Hochdruckgruppe kein signifikanter Anstieg des Kreatinin im Heparinplasma nachzuweisen war, kann spekuliert werden, dass die Nierenfunktion trotz lichtmikroskopisch sichtbarer Schädigung nicht wesentlich beeinträchtigt war. Paradoxe Weise fand sich in der MPO-KO-Hochdruckgruppe trotz lichtmikroskopisch stark ausgeprägter Nierenschädigung eine bessere Nierenfunktion. Grund dafür könnte sein, dass in den MPO-KO-Tieren DOCA + Ang-II zur Hyperfiltration führt. Die Hyperfiltration in den noch intakten Glomeruli übersteigt dabei den Filtrationsverlust der geschädigten Glomeruli.

3.9.2 Harnstoff

In Tabelle 26 und Abbildung 32 sind die mittleren Harnstoffkonzentrationen im Heparinplasma der verschiedenen Versuchsgruppen bei Versuchsende dargestellt. Alle Versuchsgruppen unterschieden sich bezüglich der mittleren Harnstoffkonzentration im Heparinplasma nicht signifikant voneinander.

Nierenfunktion		Harnstoff (mg/dl)		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	40,3	2,7	9
Kontrollen	MPO-KO	37,0	0,5	10
DOCA+Ang-II	WT	49,6	12,9	14
DOCA+Ang-II	MPO-KO	43,1	2,6	18

Tabelle 26 Harnstoff im Plasma

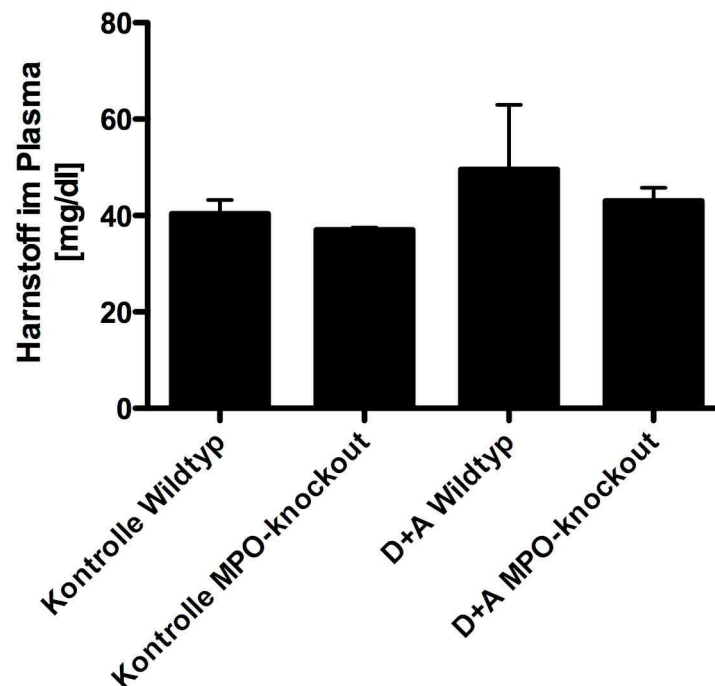


Abbildung 32 Harnstoff im Plasma MPO-Defizienz geht bei C57BL/6J-Mäusen sowohl basal als auch nach Induktion einer arteriellen Hypertonie mit DOCA und Ang II nicht mit signifikanten Veränderungen hinsichtlich des Harnstoffspiegels einher.

3.9.3 Cystatin C

In Tabelle 27 und Abbildung 33 sind die mittleren Konzentrationen von Cystatin C im Heparinplasma der verschiedenen Versuchsgruppen bei Versuchsende dargestellt.

Nierenfunktion		Cystatin C (mg/dl)		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	0,05	0,00	3
Kontrollen	MPO-KO	0,05	0,00	2
DOCA+Ang-II	WT	0,13	0,06	5
DOCA+Ang-II	MPO-KO	0,07	0,01	6

Tabelle 27 Cystatin C im Plasma

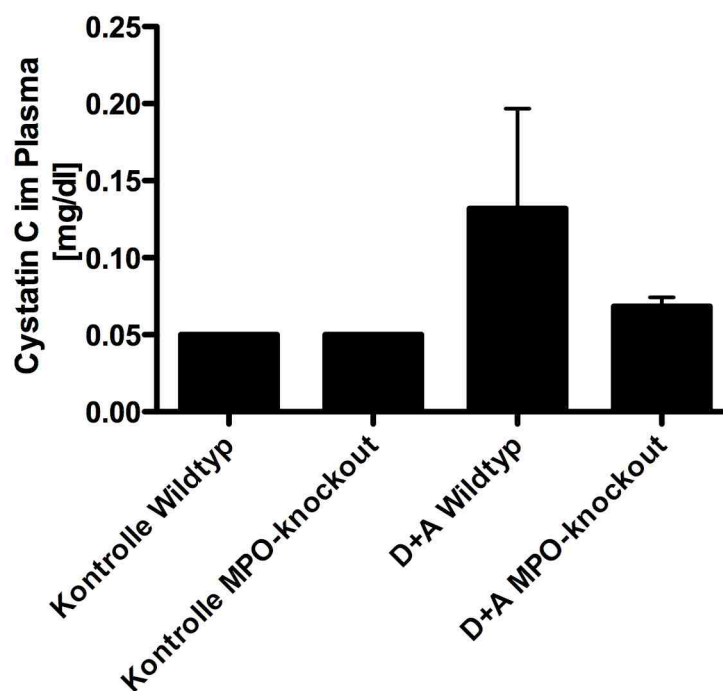


Abbildung 33 Cystatin C im Plasma

Ein signifikanter Unterschied in der Cystatin C-Konzentration bestand zwischen den beiden Kontrollgruppen nicht. Auch zwischen den beiden Hochdruckgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Bei der Interpretation der vorliegenden Cystatin C-Werte muss berücksichtigt werden, dass für die einzelnen Versuchsgruppen insgesamt nur ein Probenumfang von 3 (WT-Kontrollgruppe), 2 (MPO-KO-Kontrollgruppe) sowie 5 (WT-Hochdruckgruppe) und 6 (MPO-KO-Hochdruckgruppe) ausgewertet werden konnte. Grund dafür ist, dass die Bestimmung von Cystatin C im Zentrallabor des UKE ein Plasmavolumen von 300 µl erforderte, welches meist nicht mehr zur Verfügung stand.

3.10 NO-Bioverfügbarkeit

In Tabelle 28 und Abbildung 34 sind die mittleren Häufigkeiten der ¹⁵N-Argininisotopen im Urin der Mäuse bei Versuchsende nach intraperitonealer Gabe von ¹⁵N-Arginin dargestellt.

NO-Bioverfügbarkeit		15N-Isotopenhäufigkeit		
		%		
		Mittelwert	SEM	N
Kontrollen	WT	0,6	0,09	3
Kontrollen	MPO-KO	1,0	0,10	2
DOCA+Ang-II	WT	0,9	0,06	7
DOCA+Ang-II	MPO-KO	1,1	0,06	6

Tabelle 28 ¹⁵N-Isotopenhäufigkeit

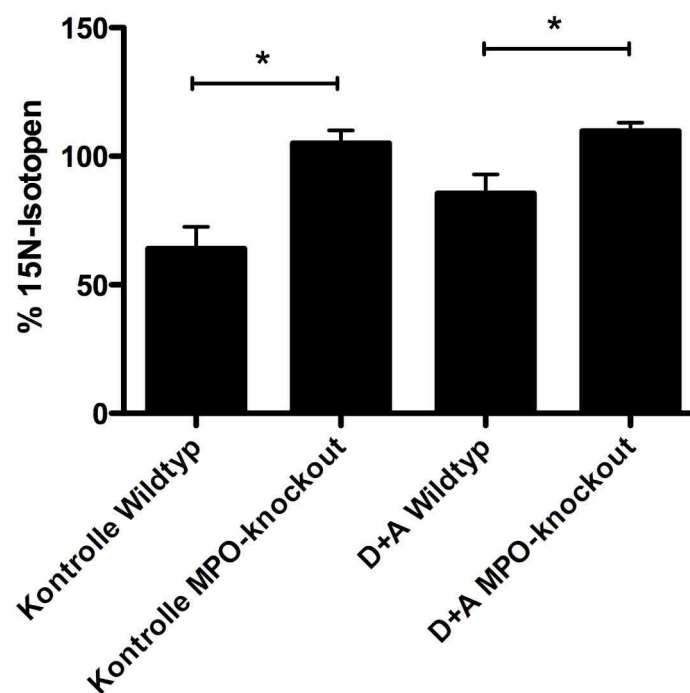


Abbildung 34 ¹⁵N-Argininisotopenhäufigkeit MPO-Defizienz geht schon basal bei C57BL/6J-Mäusen nach Gabe von ¹⁵N-Arginin mit einer signifikant erhöhten Häufigkeit von ¹⁵N-Argininisotopen im Blut einher. Nach Induktion der arteriellen Hypertonie durch DOCA und Ang II wurde in diesen Mäusen im Vergleich zu gleichbehandelten WT-Mäusen ebenfalls eine signifikant erhöhte Häufigkeit von ¹⁵N-Argininisotopen gefunden.

Schon die beiden Kontrollgruppen vergleichend wurde bei MPO-KO-Mäusen nach intraperitonealer Gabe von ¹⁵N-Arginin eine signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Häufigkeit von ¹⁵N-Argininisotopen im Blut nachgewiesen. Auch bei den Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe war die Häufigkeit der ¹⁵N-Argininisotopen im Vergleich zu den gleichbehandelten WT-Mäusen signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Die Häufigkeit der ¹⁵N-Argininisotopen nach Gabe von ¹⁵N-Arginin ist ein Marker für die Aktivität der NO-Synthasen, welche aus Arginin NO synthetisieren. Arginin ist die alleinige Vor-

stufe von NO. NO führt über Aktivierung der löslichen Guanylatzyklen zur Relaxation der glatten Muskulatur und damit zur Vasodilatation.

3.10 Herzveränderungen

3.10.1 Relative Herzgewichte

Die bei Versuchsende berechneten relativen Herzgewichte sind in Tabelle 29 und Abbildung 35 für die verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt.

Herzveränderungen		relatives Herzgewicht (mgHerz/gKg)		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	4,6	0,1	10
Kontrollen	MPO-KO	4,7	0,2	10
DOCA+Ang-II	WT	9,1	0,2	17
DOCA+Ang-II	MPO-KO	9,2	0,4	18

Tabelle 29 Relatives Herzgewicht

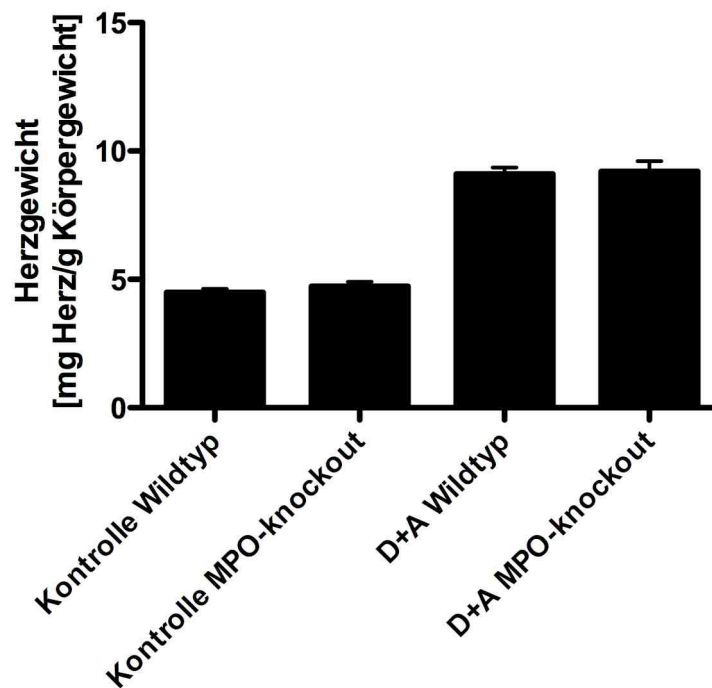


Abbildung 35 Relative Herzgewichte MPO-Defizienz geht bei C57BL/6J-Mäusen basal im Vergleich zu gleichbehandelten WT-Mäusen nicht mit einem signifikant höheren relativen Herzgewicht einher. Nach Induktion einer arteriellen Hypertonie finden sich in sowohl WT-Mäusen als auch MPO-defizienten Mäusen signifikant erhöhte relative Herzgewichte. Die Gewichtszunahme ist in beiden Gruppen ähnlich ausgeprägt.

Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der relativen Herzgewichte bestand zwischen den beiden normotensiven Kontrollgruppen nicht. Für die Tiere der WT-Hochdruckgruppe wurde dagegen bei Versuchsende ein durchschnittlich 2,0 fach höheres relatives Herzgewicht als in der korrespondierenden WT-Kontrollgruppe ermittelt ($p < 0,001$). Auch bei den Tieren der MPO-KO-Hochdruckgruppe waren die relativen Herzgewichte durchschnittlich 2,0 fach höher als in der korrespondierenden MPO-KO-Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Signifikante Unterschiede die beiden Hochdruckgruppen vergleichend bestanden nicht.

Für das höhere relative Herzgewicht der Herzen der Tiere beider Hochdruckgruppen kann eine linksventikuläre Hypertrophie, im Sinne eines hypertensiven Endorganschadens, verantwortlich gemacht werden. Der zugrundeliegende Pathomechanismus beruht darauf, dass chronischer Bluthochdruck und die dadurch gestiegene Nachlast zur Hypertrophie des linksventrikulären Myokards führt.

3.10.2 Kardiale Genexpression

Untersucht wurden die relativen Expressionen von ANP (Atrial Natriuretic Peptide), BNP (Brain Natriuretic Peptide) sowie α -MHC (α -Myosine Heavy Chain) und β -MHC (β -Myosine Heavy Chain). Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 30 und den Abbildung 36/37 aufgeführt.

Relative Expression von ANP und BNP		relative Expression ANP		relative Expression BNP		
		Mittelwert	Sem	Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	1,1	0,1	1,0	0,1	9
Kontrollen	MPO-KO	1,9	0,2	1,1	0,2	10
DOCA+Ang-II	WT	18,6	1,5	4,3	0,3	16
DOCA+Ang-II	MPO-KO	15,5	1,4	3,9	0,4	18

Tabelle 30 Relative Expressionen ANP und BNP

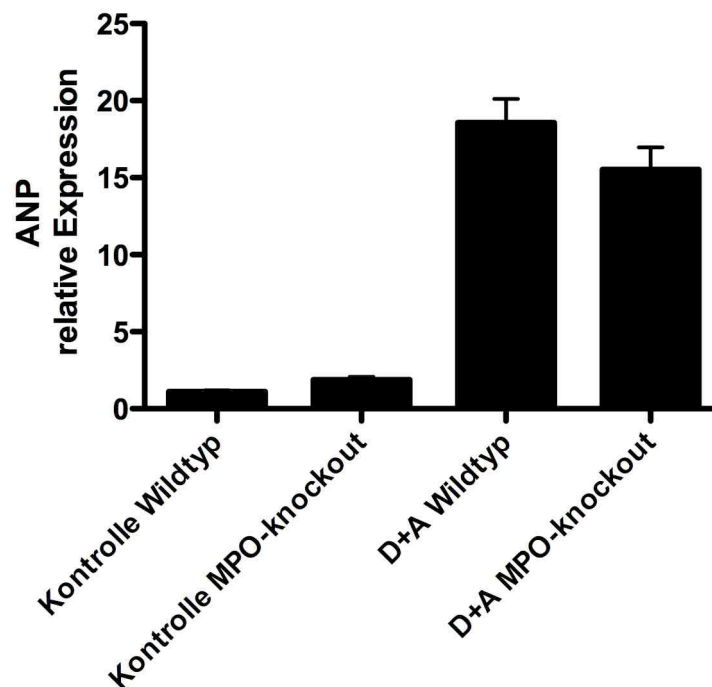


Abbildung 36 Relative Expression ANP Nach Induktion der arteriellen Hypertonie durch DOCA und Ang II wurde in sowohl MPO-defizienten als auch gleichbehandelten WT-Mäusen ein signifikanter Anstieg der ventrikulären Genexpressionen von ANP gefunden.

Signifikante Unterschiede in der ANP- und BNP-Expression zwischen den beiden Kontrollgruppen bestanden nicht. In der WT-Hochdruckgruppe war die mittlere relative Expression von ANP 16,9 fach höher ($p < 0,001$), bzw. von BNP 4,3 fach höher ($p < 0,001$) als in der korrespondierenden WT-Kontrollgruppe. In der MPO-KO-Hochdruckgruppe war die mittlere relative Expression von ANP durchschnittlich 8,2 fach höher ($p < 0,001$), die von BNP 3,5 fach höher ($p < 0,001$) als in der korrespondierenden MPO-KO-Kontrollgruppe. Statistisch signifikante Unterschiede in den mittleren relativen Expressionen von ANP und BNP bestanden im Vergleich zur gleichbehandelten WT-Hochdruckgruppe jedoch nicht.

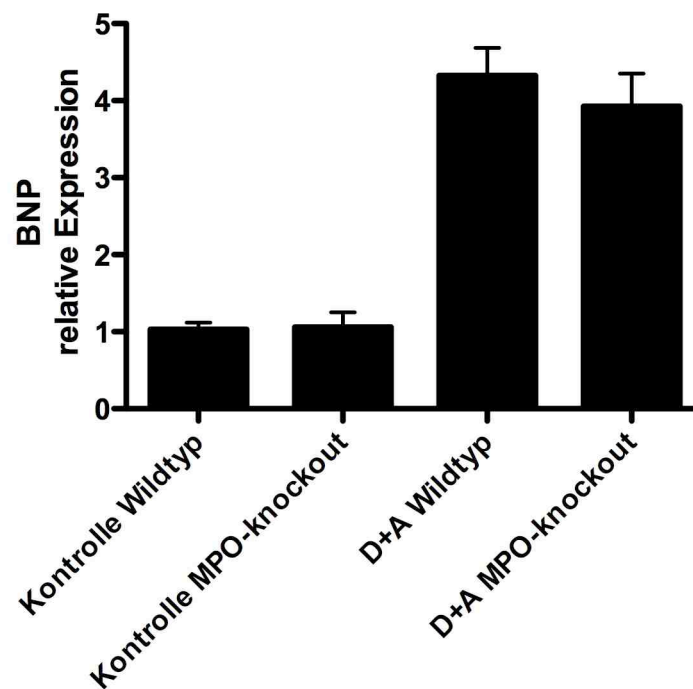


Abbildung 37 Relative Expression BNP Nach Induktion einer arteriellen Hypertonie durch DOCA und Ang II wurde in sowohl MPO-defizienten als auch gleichbehandelten WT-Mäusen ein signifikanter Anstieg der ventrikulären Genexpressionen von BNP gefunden. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Hochdruckgruppen bestanden jedoch keine.

Es wird angenommen, dass die Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie als Folge eines chronischen arteriellen Bluthochdruckes mit der Re-Expression fetaler Gene und damit der Synthese von ANP und BNP in den Ventrikeln, einhergeht (Zhang et al., 2003). Die kardiale Expression von ANP und BNP wird dabei fast immer synchron reguliert, aber nicht notwendigerweise in äquimolaren Verhältnissen (Goetze et al., 2006). Der in den Herzkammern der beiden Hochdruckgruppen gefundene Anstieg in den Genexpressionen von ANP und BNP ist dementsprechend ein deutlicher Hinweis auf einen hypertensiven kardialen End-organschaden.

In Tabelle 31 und Abbildung 37 sind die Verhältnisse der Genexpressionen von β -MHC/ α -MHC im Herzventrikelgewebe der Versuchsgruppen bei Versuchsende abgebildet.

Relative Expression von betaMHC/alphaMHC		relative Expression betaMHC/alphaMHC		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	1,2	0,2	9
Kontrollen	MPO-KO	3,1	1,4	10
DOCA+Ang-II	WT	113,8	20,3	16
DOCA+Ang-II	MPO-KO	128,4	33,2	18

Tabelle 31 Relative Expression β -MHC/ α -MHC

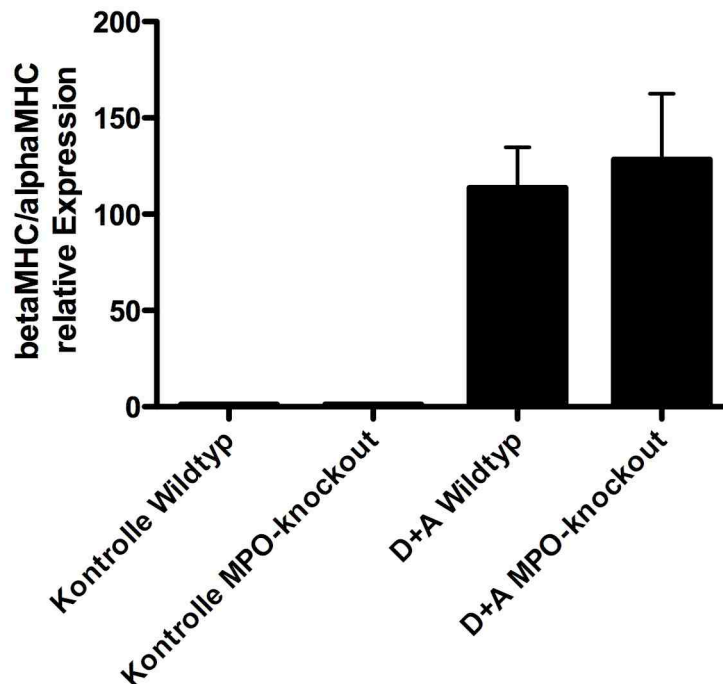


Abbildung 37 Relative Expression β -MHC/ α -MHC Nach Induktion der arteriellen Hypertonie durch DOCA und Ang II war in sowohl MPO-defizienten als auch gleichbehandelten WT-Mäusen der β -MHC/ α -MHC-Quotient signifikant erhöht. Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen bestand jedoch nicht.

Ein signifikanter Unterschied bezüglich des β -MHC/ α -MHC-Quotienten bestand zwischen den beiden Kontrollgruppen nicht. In der WT-Hochdruckgruppe wurde dagegen durchschnittlich ein 92,1 fach höherer β -MHC/ α -MHC-Quotient als in der korrespondierenden WT-Kontrollgruppe gefunden ($p < 0,01$). In der MPO-KO-Hochdruckgruppe war der β -MHC/ α -MHC-Quotient durchschnittlich 51,4 fach höher als in der korrespondierenden MPO-KO-Kontrollgruppe ($p < 0,01$). Ein signifikanter Unterschied bezüglich des β -MHC/ α -MHC-Quotienten bestand zwischen den beiden Hochdruckgruppen nicht.

3.11 Konzentration von Myeloperoxidase im Plasma

In Tabelle 32 und Abbildung 38 sind die Konzentrationen von Myeloperoxidase (MPO) im Plasma der Versuchstiere bei Versuchsende dargestellt. Zu erwähnen ist, dass zur Bestimmung der Myeloperoxidasekonzentration in der WT-Hochdruckgruppe bei einem Tier nicht ausreichend Probenmaterial zur Verfügung stand.

MPO-Konzentration im Plasma		MPO (ng/ml)		
		Mittelwert	Sem	N
Kontrollen	WT	193,2	17,1	9
Kontrollen	MPO-KO	5,2	0,8	10
DOCA+Ang-II	WT	233,9	37,0	17
DOCA+Ang-II	MPO-KO	4,6	0,3	19

Tabelle 32 MPO im Plasma

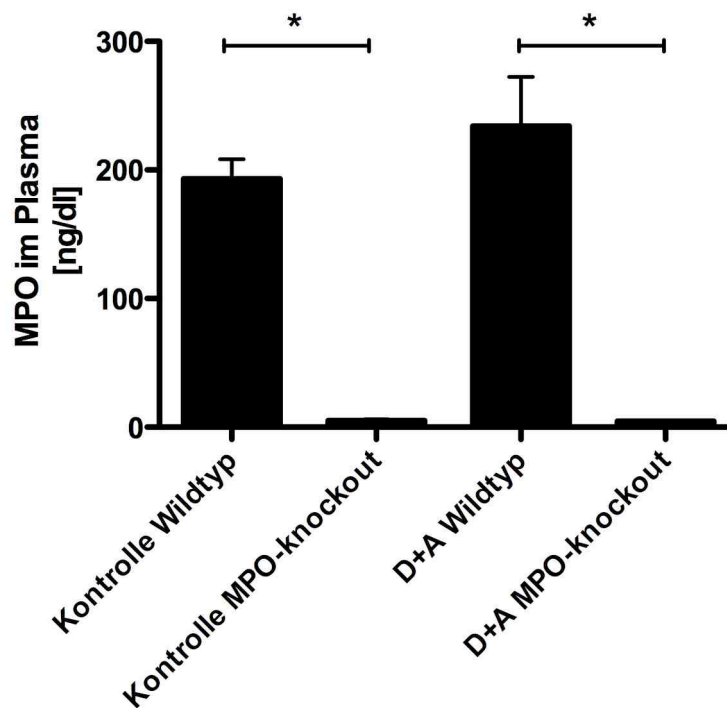


Abbildung 38 MPO im Plasma In den MPO-defizienten Mäusen wurde keine Myeloperoxidase im Plasma gefunden. Der Myeloperoxidase-Knockout gilt damit als bestätigt. Auch Verwechslungen der Tiere konnte dadurch ausgeschlossen werden.

Myeloperoxidase wird im Rahmen der Degranulation von Neutrophilen in den Extrazellulär- raum bzw. das Blut freigesetzt. Die Bestimmung der Myeloperoxidasekonzentration in den Plasmaproben der Versuchstiere bei Versuchsende diente bei Tieren der MPO-KO-Gruppen der Bestätigung des Myeloperoxidase-Knockouts bzw. bei Tieren der WT-Gruppen der Untersuchung potentieller Unterschiede nach Induktion der arteriellen Hypertonie mittels DOCA und Ang II.

Bei allen MPO-KO-Tieren sowohl der normotensiven als auch hypertensiven Gruppe lag die

Konzentration der Myeloperoxidase im Plasma unterhalb der Nachweisgrenze des ELISAs. Dieser Befund kann als Bestätigung des Myeloperoxidase-Knockout interpretiert werden. Ferner konnte dadurch eine potentiell mögliche Vertauschung von Tieren während des Versuchsablaufes ausgeschlossen werden. Ein signifikanter Unterschied die WT-Tiere der normotensiven und hypertensiven Gruppe vergleichend bestand nicht.

Teil IV Zusammenfassung und Diskussion

Ziel des Versuchsvorhabens war es, die Rolle der Myeloperoxidase (MPO) bei der Pathogenese Hypertonie-induzierter nephrosklerotischer Nierenschäden zu untersuchen. In der vor Versuchsbeginn festgelegten Hypothese wurde ursprünglich postuliert, dass MPO aufgrund ihrer gut beschriebenen proinflammatorischen Eigenschaften wahrscheinlich maßgeblich zur Initiation und Progression der hypertensiven renalen Endorganschäden beiträgt. Diese Hypothese ließ sich jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht verifizieren. Die durch DOCA und Ang II induzierten hypertensiven Nierenschäden wurden in MPO-defizienten C57BL/6J-Mäusen im Vergleich zu gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen bezüglich Inflammation, Fibrose und Proteinurie aggraviert gefunden. Die gewonnenen Erkenntnisse lassen dementsprechend nur die zur ursprünglich generierten Hypothese gegenteilige Aussage zu. MPO und/oder ihre Reaktionsprodukte spielen bei der Pathogenese der Nephrosklerose eine protektive Rolle.

4.1 Inflammation

Zwecks Charakterisierung der Entzündungsreaktion in den hypertensiv geschädigten Nieren wurden die Infiltration von Monozyten/Makrophagen, T-Zellen und Neutrophilen in das Niereninterstitium sowie die Genexpressionen von MCP-1, TNF- α und IP-10 im Nierengewebe bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Anhaltspunkte dafür gefunden, dass MPO-Defizienz schon basal bei C57BL/6J-Mäusen mit einer erhöhten Entzündungsaktivität in den Nieren einhergeht. Unter normotensiven Kontrollbedingungen glich das Ausmaß sowohl der Infiltration von Monozyten/Makrophagen, T-Zellen und Neutrophile sowie der Genexpression von MCP-1, TNF- α und IP-10 dem der gleichbehandelten Wildtyp-Mäuse. Nach Induktion einer arteriellen Hypertonie mit DOCA und Ang II wurde in den hypertensiv geschädigten Nieren MPO-defizienter C57BL/6J-Mäusen dagegen im Vergleich zu gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen eine stärker ausgeprägte Entzündungsreaktion gefunden. Insgesamt wurde eine erhöhte Infiltration von Monozyten/Makrophagen sowie T-Zellen, nicht aber Neutrophilen, in die hypertensiv geschädigten Nieren der MPO-defizienten Mäuse beobachtet. Analog fanden sich die Expressionen der Gene von MCP-1, TNF- α und IP-10 signifikant höher als bei gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen.

Die Infiltration von Monozyten/Makrophagen in die hypertensiv geschädigten Nieren war bei MPO-defizienten Mäusen in besonderem Maße stärker ausgeprägt als bei gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen. Dass es im Rahmen nephrosklerotischer Prozesse zur Infiltration von Entzündungszellen in die geschädigte Niere kommt ist bekannt (Meyrier, 1999). Die Migration

von Monozyten aus dem Blutstrom in den subendothelialen, subvaskulären Raum und später auch in das Tubulointerstitium ist an der Pathogenese Hypertonie-induzierter nephrosklerotischer Nierenschäden maßgeblich beteiligt. Die Extravasation von Monozyten in das Interstitium wird dabei entscheidend durch lokal produzierte Chemokine, vornehmlich MCP-1, stimuliert. Eine gesteigerte Expression von MCP-1 korreliert demnach mit der Akkumulation von Makrophagen im Interstitium. Dieser Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit auch bestätigt. Von Chun et al. konnte ferner gezeigt werden, dass der Grad der Makrophagenakkumulation im Interstitium auch mit dem der interstitiellen Fibrose korreliert (Chun et al., 2004). Neuere Studien weisen zudem darauf hin, dass Monozyten/Makrophagen direkt zur Produktion von Kollagen Typ-I und damit der Fibrogenese beitragen und somit dieses Phänomen von der Stimulation durch MCP-1 abhängig ist (Wada et al., 2007). Innerhalb des Glomerulus stimuliert MCP-1 z.B. glomeruläre Mesangiumzellen über deren Oberflächenrezeptor CCR2 zur Synthese von Fibronectin (Giunti et al., 2008). Dieser Mechanismus trägt möglicherweise direkt zur Entstehung der intraglomerulären Fibrose bei. Ferner wird vermutet, dass MCP-1 Makrophagen direkt zur Sekretion von TGF- β 1 stimuliert (Wang et al., 2000). Da TGF- β 1 anscheinend seinerseits wiederum die Expression von MCP-1 stimulieren kann, ist für die Akkumulation mesangialer Matrix wahrscheinlich ein selbstverstärkender *circulus vitiosus* verantwortlich (Cheng et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden in den hypertensiv-geschädigten Nieren bei MPO-defizienten C57BL/6J-Mäusen im Vergleich mit gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen sowohl höhere Expressionen der Gene für MCP-1 und Kollagen Typ-I als auch ihre lichtmikroskopischen Korrelate, nämlich die gesteigerte Monozyten-/Makrophagenakkumulation bzw. ausgeprägtere Interstitiumsverbreiterung, gefunden.

4.2 Nierenfibrose

Die Akkumulation interstitieller Matrixkomponenten wie Kollagen Typ-I, Typ-III und Fibronectin gilt als gemeinsame Endstrecke der meisten progredienten Nierenerkrankungen. Diese Matrixkomponenten werden vornehmlich durch interstitielle Myofibroblasten, welche aus ortsständigen Fibroblasten oder zirkulierenden Vorstufen rekrutiert wurden, synthetisiert (Burns et al., 2007). Der Prozess der interstitiellen Nierenfibrose ist gekennzeichnet durch die Infiltration leukozytärer Entzündungszellen, Akkumulation von Fibroblasten/Myofibroblasten und der daraus resultierenden progredienten Ablagerung interstitieller Matrixkomponenten (Wada et al., 2007). In diesem Kontext gelten PAI-1 und TGF- β 1 als starke Promotoren für die Entstehung der interstitiellen Nierenfibrose, Glomerulosklerose sowie tubulären Atrophie. Die dahinterstehenden genauen pathogenetischen Prozesse sind gegenwärtig jedoch noch unvollständig verstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ausprägung der interstitiellen Nierenfibrose anhand Quantifizierung der Glomerulosklerose und Interstitiumsausbreitung sowie Bestimmung der

spezifischen Genexpression von PAI-1, TGF- β 1 sowie Kollagen Typ-I und III evaluiert.

MPO-Defizienz hat basal bei C57BL/6J-Mäusen keine Auswirkung auf den Phänotyp der Nieren. Anhaltspunkte für eine schon basal bestehende, erhöhte fibrotische Aktivität wurden in den Nieren MPO-defizienter Mäuse nicht gefunden. Unter normotensiven Bedingungen wurden die Nieren MPO-defizienter Mäuse lichtmikroskopisch bezüglich Nierenmorphologie und Glomerulosklerose als „unauffällig und gesund“ befundet. Gleiches galt für die Expression der Gene für Kollagen Typ-I und TGF- β 1. Unter hypertensiven Bedingungen unterschieden sich MPO-defiziente Mäuse dagegen hinsichtlich der genannten fibrotischen Parameter maßgeblich von gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen. Nach Induktion einer arteriellen Hypertonie mittels DOCA und Ang II fanden sich die hypertensiven Nierenschäden MPO-defizienter C57BL/6J-Mäuse im Vergleich zu gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen signifikant aggraviert. Schon lichtmikroskopisch schienen die nephrosklerotischen Nierenschäden bei MPO-defizienten Mäusen ausgeprägter. Dieser subjektive Eindruck konnte durch Quantifizierung der Glomerulosklerose und Interstitiumsverbreiterung sowie Bestimmung des Genexpressionsmusters objektiviert werden. Die für die Nephrosklerose charakteristischen Veränderungen wie Tubulusdilataationen, Tubulusatrophie und Interstitiumsverbreiterung waren in MPO-defizienten Mäusen signifikant höhergradiger. Auch der Ausprägungsgrad der Glomerulosklerose war in diesen Mäusen signifikant höher. Die lichtmikroskopischen Befunde konnten bei der Auswertung der renalen Genexpression bestätigt werden. In der Nierenrinde hypertensiver, MPO-defizienter Mäuse fanden sich signifikant höhere Expressionen der Gene für Kollagen Typ-I, III und TGF- β 1 und PAI-1.

Unter Kontrollbedingungen ist die Synthese von PAI-1 in den Nieren kaum detektierbar. Bei vielen akuten und chronischen Nierenerkrankungen wird PAI-1 jedoch vermehrt, u.a. von eingewanderten Entzündungszellen, sezerniert (Zhang et al., 2003). PAI-1 scheint dabei ein starker Promoter für die Entstehung der Nierenfibrose zu sein, der genaue zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass PAI-1 durch Hemmung des Plasmin-abhängige Abbaus von Extrazellulärmatrix die Entstehung von Fibrose und vaskuläre Sklerose fördert (Marcantoni et al., 2007). Ferner gibt es Hinweise dafür, dass PAI-1 direkt die Rekrutierung von Entzündungszellen sowie Aktivierung von Fibroblasten und damit die Bildung von Narbengewebe stimuliert (Allison et al., 2007). Zur Zeit sind zwei fibrogene Systeme als starke Induktoren von PAI-1 bekannt. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System sowie TGF- β 1 (Allison et al., 2007). Es wird angenommen, dass TGF- β 1 in Synergie mit Aldosteron die Synthese von PAI-1 und damit eine Akkumulation von Extrazellulärmatrix stimuliert (Huang et al., 2008).

Die in den hypertensiv-geschädigten Nieren MPO-defizienter Mäuse gefundenen höheren relativen Expressionen der Gene von PAI-1, TGF- β 1 sowie Kollagen Typ-I und III weisen auf

eine ausgeprägtere fibrotische Aktivität und Akkumulation von Matrixproteinen hin. Diese Annahme konnte lichtmikroskopisch u.a. durch die Quantifizierung der Interstitiumsverbreiterung unterstützt werden, welche exklusiv bei MPO-defizienten, nicht jedoch MPO-kompetenten Mäusen beobachtet wurde. Dass die Nieren der hypertensiven MPO-defizienten Mäuse signifikant schwerer waren als die der gleichbehandelten WT-Mäusen kann ebenfalls im Kontext der ausgeprägten Akkumulation von Matrixproteinen und schweren Nierenfibrose gesehen werden.

4.3 Proteinurie und Dyslipidämie

In der vorliegenden Arbeit wurden die Albuminurie und Dyslipidämie, und damit zwei Parameter des nephrotischen Syndroms, quantifiziert.

Es wurden keine Anhaltspunkte dafür gefunden, dass MPO-Defizienz bei C57BL/6J-Mäusen schon unter normotensiven Kontrollbedingungen für Albuminurie und Dyslipidämie prädisponiert. Bezüglich des Ausmaßes der Albuminausscheidung im Urin und des Lipidstatus unterschieden sich normotensive MPO-defiziente Mäuse nicht von denen gleichbehandelter Wildtyp-Mäusen. Nach Induktion einer arteriellen Hypertonie mit DOCA und Ang II war der Ausbildungsgrad der sich konsekutiv entwickelnden Proteinurie und Dyslipidämie bei MPO-defizienten C57BL/6J-Mäusen im Vergleich zu gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen dagegen signifikant höher.

Die Albuminurie war bei MPO-defizienter Mäuse besonders ausgeprägt. Die Ausscheidung von Albuminen im Harn wird als pathologisch angesehen und ist Folge einer glomerulären Schädigung. Schon die Mikroalbuminurie gilt als Frühzeichen für Nierenerkrankungen wie die Nephrosklerose. Mit zunehmender Nierenschädigung erhöht sich auch die Albuminausscheidung im Urin im Sinne einer Makroalbuminurie oder Proteinurie, weshalb das Ausmaß einer Proteinurie mit dem der glomerulären Schädigung korreliert. Ferner wurde beobachtet, dass in diesem Kontext MPO-defiziente Mäuse im Vergleich zu gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen nicht nur mehr, sondern auch höhermolekulare Proteine im Urin ausscheiden. Proteine eines Molekulargewichtes um 97k Da wurden exklusiv im Urin der MPO-defizienten Mäuse, nicht jedoch in dem der Wildtyp-Mäuse detektiert. Diese Befunde konnten lichtmikroskopisch bestätigt werden. In den hypertensiv geschädigten Nieren der MPO-defizienten Mäuse wurden im Vergleich zu gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen nicht nur signifikant mehr, sondern auch größere intratubuläre Proteinablagerungen gefunden. Diese Proteinpräzipitate gelten als morphologisches Korrelat der großen Proteinurie.

Ein weiteres Charakteristikum der großen Proteinurie sind Veränderungen des Lipidmetabolismus, welche sich in abnormalen Verhältnissen der Apolipoproteinen sowie Lipidplasmaspiegeln widerspiegeln. Typischerweise werden dabei erhöhte Plasmaspiegel von Trigly-

ceriden und Cholesterin gefunden (Vaziri et al., 2003). Es wird angenommen, dass zwischen der Progression chronischer Nierenerkrankungen und der dabei gefundenen sekundären Dyslipidämie eine Korrelation besteht. In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass hohe Plasmaspiegel von Triglyceriden und Cholesterin bei Menschen unabhängige Risikofaktoren für die Progression von Nierenerkrankungen darstellen. Nach Induktion der arteriellen Hypertonie mit DOCA und Ang-II wurden bei MPO-defizienten Mäusen im Vergleich zu gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen signifikant höhere Plasmaspiegel von Cholesterin und Triglyceriden gefunden, was die stärker ausgeprägte Proteinurie in diesen Mäusen bestätigt. Es wird vermutet, dass die Dyslipidämie nicht nur eine Komplikation des chronischen Nierenversagens zu sein scheint, sondern auch zur Progression renaler Erkrankungen beiträgt (Trevisan et al., 2006). In Ratten induziert fettreiche Nahrung z.B. die Infiltration von Makrophagen und Bildung von Schaumzellen mit konsekutiver Entwicklung einer Glomerulosklerose (Hattori et al., 1999). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Makrophagen oxidierte Lipide phagozytieren und sich anschließend zu Schaumzellen verwandeln. Diese Schaumzellen sezernieren wiederum Zytokine, welche weitere Makrophagen anlocken. Auf dem Boden dieses Mechanismus könnte eine Dyslipidämie direkt zur Progression entzündlich-fibrotischer Nierenveränderungen beitragen.

Letztendlich gehen die meisten chronisch progredienten Erkrankungen der Niere mit zunehmendem Gewichtsverlust, Kachexie genannt, einher. Entsprechend wurde im Rahmen der hypertensiven Nierenschädigung sowohl in MPO-defizienten als auch WT-Mäusen anfänglich eine Abmagerung beobachtet. Exklusiv bei MPO-defizienten Mäusen wurde mit zunehmender Nierenschädigung allerdings ein Wiederanstieg des Körpergewichtes und damit ein biphasischer Gewichtsverlauf registriert. Ursache dieses Phänomens war bei diesen Tieren die schon klinisch auffällig gewordene Ausbildung von Aszites. Ein Aszites kann u.a. auf dem Boden eines massiven Proteinverlustes mit konsekutiver Erniedrigung des kolloidosmotischen Druckes im Blut und der daraus resultierenden Flüssigkeitsverschiebung in den interstitiellen Raum entstehen. Dass bei den unter hypertensiven Nierenschäden leidenden MPO-defizienten Mäusen eine stärker ausgeprägte Albuminurie nachweisbar war als bei gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen macht diesen Mechanismus als mögliche Ursache sehr wahrscheinlich.

4.4 Nierenfunktion

Als Suchtest für die glomeruläre Filtrationsrate und damit die Nierenfunktion wurden die Spiegel von Kreatinin, Harnstoff und Cystatin-C im Plasma bzw. Serum der Versuchstiere bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Anhaltspunkte dafür gefunden, dass MPO-Defizienz bei C57BL/6J-Mäusen schon unter normotensiven Kontrollbedingungen mit Veränderungen

der Nierenfunktion einhergeht. Die Spiegel von Kreatinin, Harnstoff und Cystatin C im Plasma MPO-defizienter Mäuse glichen denen gleichbehandelter WT-Mäuse. Paradoxe Weise fand sich bei unter hypertensiven Nierenschäden leidenden MPO-defizienten Mäusen im Vergleich zu gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen trotz lichtmikroskopisch stärker ausgeprägter Nierenschäden eine bessere Nierenfunktion. In diesem Kontext wurden signifikant niedrigere Spiegel von Kreatinin im Plasma gefunden. Grund dafür könnte sein, dass in den MPO-KO-Tieren DOCA + Ang-II zur Hyperfiltration führt. Die Hyperfiltration in den noch intakten Glomeruli könnte dann den Filtrationsverlust der geschädigten Glomeruli übersteigen.

4.5 Herzveränderungen

Um zu untersuchen ob der gefundene Befund, also dass MPO-Defizienz hypertensive Nierenschäden aggraviert, spezifisch für die Niere ist oder sich auch in anderen hypertensiven Endorganen bestätigt, wurden zusätzlich auch die am Herzen entstandenen Schäden evaluiert.

Um die hypertensiven Endorganschäden am Herzen zu quantifizieren wurden die Herzgewichte sowie die Genexpressionen von ANP und BNP bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden in MPO-defizienten C56Black6/J-Mäusen basal im Vergleich zu gleichbehandelten WT-Mäusen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Herzgewichte sowie Genexpression von ANP und BNP in den Ventrikeln gefunden. Nach Behandlung mit DOCA und Ang II bestanden dagegen sowohl in MPO-defizienten als auch Wildtyp-Mäusen makroskopische und molekularbiologische Anhaltspunkte für eine linksventrikuläre Hypertrophie. Die relativen Herzgewichte fanden sich sowohl bei hypertensiven MPO-defizienten als auch bei hypertensiven Wildtyp-Mäusen gegenüber den normotensiven Kontrolltieren signifikant erhöht. Von Myeloperoxidase unabhängig wurden bei allen hypertensiven Tieren zudem Anstiege bezüglich der ventrikulären Genexpression von ANP und BNP gefunden. Signifikante Unterschiede bezüglich der Herzgewichte und Genexpression von ANP bzw. BNP bestanden, MPO-defiziente mit Wildtyp-Mäusen vergleichend, jedoch nicht.

Es ist allgemein anerkannt, dass atriale Kardiomyozyten natriuretische Hormone synthetisieren und vor allem als Reaktion auf akute Vorhofdehnungen sezernieren. Die natriuretischen Hormone ANP (Atrial Natriuretic Peptide) und BNP (Brain Natriuretic Peptide) spielen dabei eine maßgebliche Rolle bei der Homöostase des Flüssigkeitshaushaltes und damit des Blutdruckes. In diesem Zusammenhang kann man bei erhöhter hämodynamischer Belastung eine gesteigerte Sekretion von ANP und BNP beobachten (Goetze et al., 2006). Obwohl im Herzen die Herzvorhöfe als mengenmäßig bedeutsamste Syntheseorte für ANP und BNP gelten, werden im Rahmen ventrikulärer Erkrankungen die Genexpressionen von ANP und

BNP auch in den ventrikulären Kardiomyozyten hochreguliert. Die Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie als Folge eines chronischen arteriellen Bluthochdruckes geht demnach mit der Re-Expression fetaler Gene, und damit der Synthese von ANP und BNP, in den Ventrikeln einher (Zhang et al., 2003).

Die gefundenen Befund implizieren zum Einen, dass die linksventrikuläre Druckbelastung und konsekutive kardiale Dysfunktion in beiden Hochdruckgruppen vergleichbar ausgeprägt war, zum Anderen, dass MPO-Defizienz keinen Effekt auf die Ausprägung der hypertensiven Endorganschäden am Herzen hat.

4.6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt überraschenderweise, dass Myeloperoxidase und/oder ihre Reaktionsprodukte bei der Pathogenese von durch DOCA und Ang II induzierten hypertensiven nephrosklerotischen Nierenschäden bei C57BL/6J-Mäusen eine protektive Rolle besitzt. Dieser Befund war spezifisch für die Niere und konnte am Herzen, einem weiteren klassischerweise durch Bluthochdruck geschädigten Organ, nicht gefunden werden.

Hinweise darauf, dass MPO und/oder ihre Reaktionsprodukte duale Funktionen ausüben mehrten sich auch an anderen Stellen (Doi et al., 2007). Neben den gut charakterisierten proinflammatorischen Eigenschaften besitzt MPO zusätzlich immunmodulatorische Eigenschaften, wirkt also auch antiinflammatorisch.

Brennan et al. zeigten, dass Myeloperoxidase bzw. die durch die Myeloperoxidasereaktion gebildeten reaktiven Intermediate bei der Pathogenese der murinen Arteriosklerose eine protektive Rolle spielen (Brennan et al., 2001). Um die Rolle von MPO bei der Entstehung der Arteriosklerose zu untersuchen, induzierten Brennan et al. in MPO-defizienten C57BL/6J-Mäusen eine durch Hyperlipidämie ausgelöste Arteriosklerose. In MPO-defizienten Mäusen wurden im Vergleich zu gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen um ca. 50% vergrößerte arteriosklerotische Läsionen gefunden. In diesen vergrößerten Läsionen war zudem eine erhöhte Anzahl von Monozyten vorhanden. Arteriosklerose gilt als chronische inflammatorische Erkrankung bei welcher Monozyten wichtige Effektorzellen sind. Auf dem Boden dieser Ergebnisse postulierten Brennan et al., dass MPO bei der Pathogenese mindestens einer inflammatorischen Erkrankung, nämlich der Arteriosklerose, eine protektive Rolle spielt. Den vorliegenden Mechanismus betreffend konnten in vitro Experimente zeigen, dass durch HOCl modifizierte Lipoproteine pathophysiologische Effekte auf Phagozyten ausüben und zur Initiierung und Progression des Entzündungsprozesses bei Arteriosklerose beitragen (Daugherty et al., 1994).

Auch bei der Pathogenese des IPS (Idiopathic Pneumonia Syndrome) nach allogener Knochenmarktransplantation konnte für Myeloperoxidase eine protektive Rolle nachgewiesen

werden (Milla et al., 2004). Das IPS geht mit einer nichtinfektiösen diffusen Lungenentzündung einher, welche in 12-20% aller Fälle nach allogener Knochenmarktransplantation beobachtet wird (Clark et al., 1993). In diesem Kontext beobachteten Milla et al. bei MPO-defizienten C57BL/6J-Mäusen eine gesteigerte T-Zell abhängige Entzündungsreaktion (Milla et al., 2004). Bei MPO-defizienten Mäusen konnten dabei in der BALF (Bronchoalveolar Lavage Fluid) erhöhte Spiegel von MCP-1 und TNF- α sowie eine erhöhte Zellzahl von T-Zellen und Monozyten nachgewiesen werden. Interessanterweise wurden bei diesen Tieren gleichzeitig eine geringere Belastung durch oxidativen/nitrosativen Stress beobachtet. Es ist bekannt, dass die Dysbalance von Oxidation und Antioxidation, welche oxidativer Stress genannt wird, aggravierend auf die Immunantwort wirkt (Hehner et al., 2000). Die oxidierende Umgebung führt zur Aktivierung und Translokation von Nuclear Factor (NF)- κ B und erhöhter Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α (Kono et al., 2000) sowie einer gesteigerten Aktivierung von T-Zellen. Supprimierter oxidativer/nitrosativer Stress scheint im Kontext der IPS jedoch mit einer gesteigerten Entzündungsreaktion in der Lunge assoziiert zu sein. Es ist bekannt, dass MPO-generierte Oxidantien in der Lage sind, Proteine und Lipide zu inaktivieren und DNA zu beschädigen. Auch dass MPO-generierte Oxidantien zur Inaktivierung von chemotaktischen Proteinen und Veränderung der Lymphozytenfunktion (Clark et al., 1979) befähigt sind. Milla et al. vermuteten, dass im Rahmen der IPS der bei MPO-defizienten Mäuse gefundene supprimierte oxidative/nitrosative Stress mit einem verringerten Apoptosestimulus für in die Lungen infiltrierenden Entzündungszellen einherging, was für die erhöhte Zellulärität und Entzündungsaktivität in der Lunge verantwortlich gemacht werden kann (Milla et al., 2004).

Ferner berichteten Brennan et al., dass MPO-defiziente Mäuse anfälliger für EAE (Experimental Autoimmune Encephalitis), einer T-Zell-abhängigen neuronalen Erkrankung, zu sein scheinen (Brennan et al., 2001). Auch für diesen Befund wird als mögliche Ursache die Abwesenheit MPO-abhängiger Hemmungsmechanismen der Lymphozytenproliferation angenommen.

Ingesamt mehren sich die Hinweise, dass trotz der ausführlich beschriebenen, schädigenden Effekte oxidativer/nitrosativer Stress im Rahmen inflammatorischer Prozesse auch eine Kontrollfunktion zu besitzen scheint. Als mögliche Mechanismen für diesen Befund werden die durch Oxidantien induzierte Inaktivierung proinflammatorischer Zytokine sowie oxidativ-induzierte Stimulation der Apoptose von Entzündungszellen postuliert. Schon früh wurden experimentelle Hinweise gefunden, welche MPO mit der oxidativ-induzierten Inaktivierung proinflammatorischer Moleküle wie Chemokine (Clark et al., 1979) sowie Veränderungen in der Produktion inflammatorischer Mediatoren (Marcinkiewicz, 1997) in Zusammenhang bringen. Dass Myeloperoxidase bzw. die durch ihre Reaktion generierten Oxidantien einen

hemmenden Einfluss auf die Funktion von Lymphozyten sowie Monozyten/Makrophagen ausüben ist deshalb wahrscheinlich.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Hinweise auf eine protektive Rolle von Myeloperoxidase bei Nierenerkrankungen lassen sich mit den Arbeiten vieler Arbeitsgruppen in Einklang bringen. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Vermutung bestätigt werden.

4.7 Limitationen

An dieser Stelle sollen einige Limitationen, die bei der Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu berücksichtigen sind, angezeigt werden.

Die Induktion der in dieser Arbeit untersuchten hypertensiven Endorganschäden erfolgte durch Infusion von DOCA und Ang II (siehe DOCA + Ang II-Hochdruckmodell). Die Höhe des dadurch induzierten Blutdruckanstieges wurde mittels Schwanzplethysmographie kontrolliert. Dieses Verfahren eignet sich sehr gut, um größere Blutdruckdifferenzen, v.a. bei einer großen Anzahl von Tieren, aufzuzeigen. Die Sensitivität der Schwanzplethysmographie bei der Detektion geringer Blutdruckdifferenzen ist jedoch gering. Bei der Interpretation der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Blutdruckmessungen sollte demnach beachtet werden, dass die Unterscheidung zwischen normotensiven und hypertensiven Tieren als zuverlässig gilt, etwaige geringfügige Blutdruckdifferenzen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen jedoch aufgrund der beschriebenen technischen Limitationen nicht aufgedeckt werden konnten. Eine sensitivere Methode wäre die invasive arterielle Druckmessung durch Radiotelemetrie, welche zudem eine dynamische Messung über 24 h am Tag erlaubt. Die für eine Radiotelemetrie notwendigen hohen Kosten erlauben ihren Einsatz jedoch bei Studien mit hohen Tierzahl nicht als Routinemethode, weshalb in den meisten Laboratorien die Schwanzplethysmographie vorgezogen wird um tierintensive Studien durchführen zu können.

Als Parameter für die Ausprägung der Nierenschäden wurde u.a. die Albuminurie quantifiziert und die im Urin ausgeschiedenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht gelelektrophoretisch aufgetrennt. Bei der Gelelektrophorese wurde von allen Tieren ohne Berücksichtigung der Nierenfunktion die gleiche Menge Urin eingesetzt. Die Gelelektrophorese der Urine, sowie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, liefert deshalb nur eine qualitative Aussage über die Proteinurie. Zur exakten quantitativen Bestimmung der Höhe der Proteinurie wurde die Albuminurie mittels ELISA bestimmt.

Als weiterer Parameter für die Ausprägung der Nierenschäden wurde die Dyslipidämie, durch Bestimmung der Triglyceride und Gesamtcholesterin im Heparinplasma, bestimmt. Allgemein sind Triglycerid- und Cholesterinspiegel im Blut von Mäusen wie auch beim Menschen stark abhängig von der jeweiligen Ernährungslage. Um standardisierte Daten erheben zu können, müssten die Versuchsobjekte deshalb vor Blutabnahme eigentlich über

ca. 12 h strenge Nahrungskarenz einhalten. In der vorliegenden Arbeit wurden der Lipidstatus aus den bei Versuchsende gewonnenen Heparinplasma-Proben bestimmt. Für die Versuchstiere der Hochdruckgruppen, welche zu diesem Zeitpunkt i.d.R. schon ein schweres Krankheitsbild entwickelt hatten, hätte die Nahrungskarenz eine unzumutbare und versuchsgefährdende Belastung bedeutet. Den Tieren wurde deshalb auch vor der Triglyceridbestimmung freier Zugang zu Nahrung gestattet. Die Ergebnisse sind in diesem Kontext zu interpretieren.

Als Parameter für die Nierenfunktion wurde Kreatinin im Heparinplasma bestimmt. Allgemein ist dabei zu beachten, dass sich bei der Maus im Gegensatz zum Menschen Kreatinin schlechter eignet um die Nierenfunktion abzuschätzen. Ferner ist bei der Interpretation von Kreatininwerten zu beachten, dass die gebildete Menge an Kreatinin und dessen Konzentration im Plasma individualspezifisch und abhängig von der Muskelmasse und damit indirekt von Konstitution, Geschlecht und Alter ist. Alle hypertensiven Tiere hatten bis zu Versuchsende signifikant an Körpergewicht und dementsprechend auch an Muskelmasse verloren. Da sich der Gewichtsverlust bezüglich des reinen Muskelgewichts bei MPO-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen jedoch nicht unterschied, scheint Kachexie nicht für die Unterschiede in den gemessenen Kreatininkonzentrationen verantwortlich zu sein.

Bei der histologischen (lichtmikroskopischen) Beurteilung der hypertensiven Nierenschäden wurde u.a. ein Glomeruloskleroscore erhoben und die entstandene Nierenfibrose quantifiziert. Beim Glomeruloskleroscore handelt es sich um ein semiquantitatives Verfahren zur Einschätzung der glomerulären Schädigung das subjektiv ist. Zur Beurteilung der Verbreiterung des Niereninterstitiums wurde ein Punkteraster benutzt. Dieses Verfahren eignet sich gut um eine ausgeprägte interstitielle Verbreiterung zu detektieren, schwach ausgeprägte Veränderungen werden jedoch nicht erfasst. Um diese Limitationen auszugleichen wurden zusätzlich unabhängige Verfahren wie die Quantifizierung von proinflammatorischen und profibrotischen Chemokinen sowie von Matrixproteinen zur Beurteilung der hypertensiven Nierenschädigungen herangezogen.

Teil V Ausblick: MPO und unilaterale Ureterobstruktion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Myeloperoxidase bei der hypertensiven Nephropathie eine protektive Rolle besitzt, die Ausprägung der hypertensiven Herzschäden jedoch nicht beeinflusst. Das wirft die Frage auf, ob die gefundenen Ergebnisse spezifisch für die durch das DOCA + Ang II-Modell induzierten Nierenschäden sind, oder ob Myeloperoxidase auch bei anderen Nierenerkrankungen protektiv wirkt. Daher haben wir in Myeloperoxidase-defizienten Mäusen ein weiteres Modell einer progressiven Nierenerkrankung induziert, das Modell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO). Im Gegensatz zum DOCA + Ang II-Modell, einem Modell der hypertensiven Nephropathie, wird mit dem UUO-Modell eine obstruktive Nephropathie induziert. Es handelt sich dabei um ein weitgehend von der renalen Hämodynamik unabhängiges Krankheitsbild, das aber ebenfalls zu einer progredienten Nierenentzündung und -fibrose führt.

5.1 Obstruktive Nephropathie

Das Krankheitsbild der obstruktiven Nephropathie beruht auf einer Abflussstörung im Bereich der ableitenden Harnwege. Solch eine Obstruktion kann unterschiedliche Ursachen haben. Im Kindesalter, in dem die Hydronephrose die häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz ist, beruht sie vielfach auf kongenitalen Fehlbildungen wie Harnröhrenklappen, Vasa accessoria oder Ureterabgangsstenosen. Folge der Ureterobstruktion, unabhängig ihrer Ursache, ist ein Rückstau von Harn in das Nierenbecken und die Niere. Progredient kommt es dadurch zur Nierenschädigung bis zum Endstadium der Hydronephrose welche funktionell einer terminalen Niereninsuffizienz entspricht.

5.2 Das Modell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO)

Die unilaterale Ureterobstruktion (UUO) ist eines der am besten untersuchtesten tierexperimentellen Modelle der interstitiellen Nierenfibrose. Dabei handelt es sich um ein langjährig erprobtes, einfaches und gut reproduzierbares Modell einer progressiven Nierenfibrose (Chevalier et al., 2009). Zur Induktion dieses Modells wird chirurgisch einer der beiden Ureteren ligiert und dadurch ein Abflusshindernis mit konsekutivem Harnaufstau geschaffen. Neben der direkten durch Harnrückstau induzierten Tubulusdilatation und -schädigung kommt es in der stenosierten Niere zu einer komplexen fibrotischen Reaktion. Die komplette UUO führt in der stenosierten Niere innerhalb weniger Tage zur Infiltration von Monozyten/Makrophagen ins Niereninterstitium welche Cytokine wie MCP-1 und PAI-1 produzieren (Chevalier et al., 2009). Im weiteren Verlauf kommt es zur Apoptose von Tubulusepithelzellen und Endothelzellen, was einerseits direkt zur Tubulusatrophie andererseits auch zum Verlust von Kapillaren

mit konsekutiver Ischämie und damit sekundärer Tubulusschädigung führt. Ferner kommt es zur Aktivierung und Proliferation von ortsständigen Fibroblasten, welche folgend Matrixproteine wie Kollagen I, III und Fibronectin sezernieren. Dies führt im Sinne einer progressiven interstitiellen Fibrose zur Ausbildung eines hypozellulären und matrixreichen Bindegewebes (Wendt et al., 1995). Bereits 3 Tage nach Ligatur ist in diesem Modell eine vermehrte Expression von Fibronectin, Kollagen Typ I, III und IV nachweisbar (Sharma et al., 1993).

Um die Ausprägung der UUO-bedingten Nierenschäden bei MPO-defizienten Mäusen zu untersuchen wurden weibliche Mäuse mit Wildtyp-Hintergrund (C57BL/6J WT) und MPO-Knockout-Hintergrund (C57BL/6J MPO-KO) der UUO unterzogen. Unter Berücksichtigung der unter 2.3 beschriebenen Bedingungen für Operationen und Organentnahmen wurde die zu operierende Maus narkotisiert, über einen ca. 5mm langen Flankenschnitt die Bauchhöhle eröffnet, der Ureter der rechten Niere stumpf dargestellt und vom M.psoas abgehoben. Der Ureter wurde folgend in seinem Verlauf durch zwei unabhängige Ligaturen (Mersilene 2-0, Ethicon, Belgium) definitiv verschlossen. Anschließend wurde die Bauchdecke über eine fortlaufende Naht (Mersilene 2-0, Ethicon, Belgium) sowie der Hautschnitt mit Wundklammern (Wundklammern Michel 11x2MM, Braun, Germany) verschlossen und die Narkose ausgeleitet. 7 Tage nach Operation wurden in Narkose Blut aus der Aorta abdominals sowie die stenosierte Niere entnommen und die Tiere anschließend durch Genickbruch getötet.

Zur allgemeinen Darstellung der UUO-bedingten Nierenveränderungen wurden jeweils Nierenschnitte PAS-gefärbt. Zur Charakterisierung der Infiltration von Entzündungszellen in die stenosierte Niere wurden immunhistochemische Färbungen für Monozyten/Makrophagen und T-Zellen angefertigt und die Zahl der ins Interstitium eingewanderten Monozyten/Makrophagen bzw. T-Zellen lichtmikroskopisch quantifiziert. Als Parameter für Inflammation und Fibrose wurde die Genexpression von MCP-1 und PAI-1 in den Nieren mittels RTQ-PCR bestimmt.

5.3 Ergebnisse der UUO in MPO-defizienten Mäusen

In Tabelle 33 und den Abbildungen 39-43 ist ein Überblick über die Ergebnisse der UUO bei MPO-defizienten Mäusen zu sehen.

Überblick UUO		Monozyten	T-Zellen	MCP-1	PAI-1	Interstitium	N
		Mittelwert ± Sem	Mittelwert ± Sem	Mittelwert ± Sem	Mittelwert ± Sem	Mittelwert ± Sem	
Kontrollen	WT	12 ± 0,7	11 ± 4,2	1 ± 0,2	1,1 ± 0,3	14,8 ± 1,9	2
Kontrollen	MPO-KO	15 ± 0,7	4,5 ± 0,4	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1	10,5 ± 0,7	2
UUO	WT	129,2 ± 10,2	90,8 ± 7,6	43,1 ± 4,6	53 ± 11,3	29,1 ± 1,2	8
UUO	MPO-KO	142,8 ± 12,8	77,9 ± 7,3	64,3 ± 4,5	82,9 ± 15,2	35,0 ± 2	9

Tabelle 33 UUO in MPO-defizienten Mäusen

7 Tage nach UUO waren in den Nieren sowohl der WT- als auch MPO-KO-Tieren nach immunhistochemischer Anfärbung massenhaft Monozyten und T-Zellen nachweisbar (siehe Abbildung 39/40). Signifikante Unterschiede bezüglich der Infiltration von Monozyten und T-Zellen in das Niereninterstitium bestanden dabei zwischen WT- und MPO-KO-Tieren jedoch nicht.

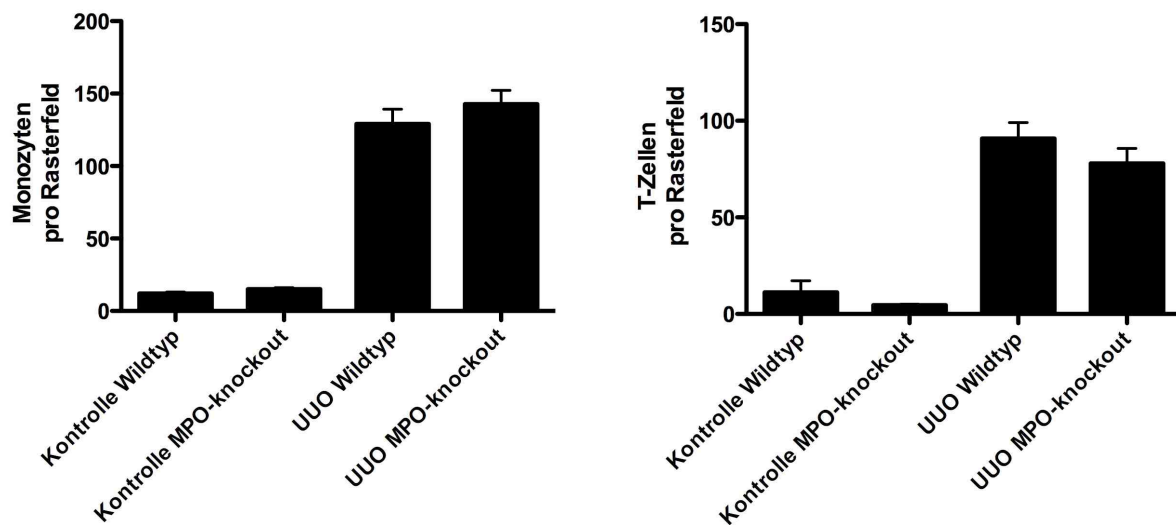


Abbildung 39/40 Monozyten und T-Zellen im Interstitium UUO führt in sowohl WT- als auch MPO-KO-Mäusen zu einer signifikanten Infiltration von Monozyten und T-Zellen in das Niereninterstitium.

In den stenosierten Nieren sowohl der WT- als auch MPO-KO-Tiere wurde eine stark vermehrte Expression der proinflammatorischen bzw. profibrotischen Chemokine MCP-1 und PAI-1 gefunden (Abbildungen 41/42). Hinsichtlich der Expression von MCP-1 und PAI-1 unterschieden sich WT- und MPO-KO-Tiere nicht signifikant voneinander.

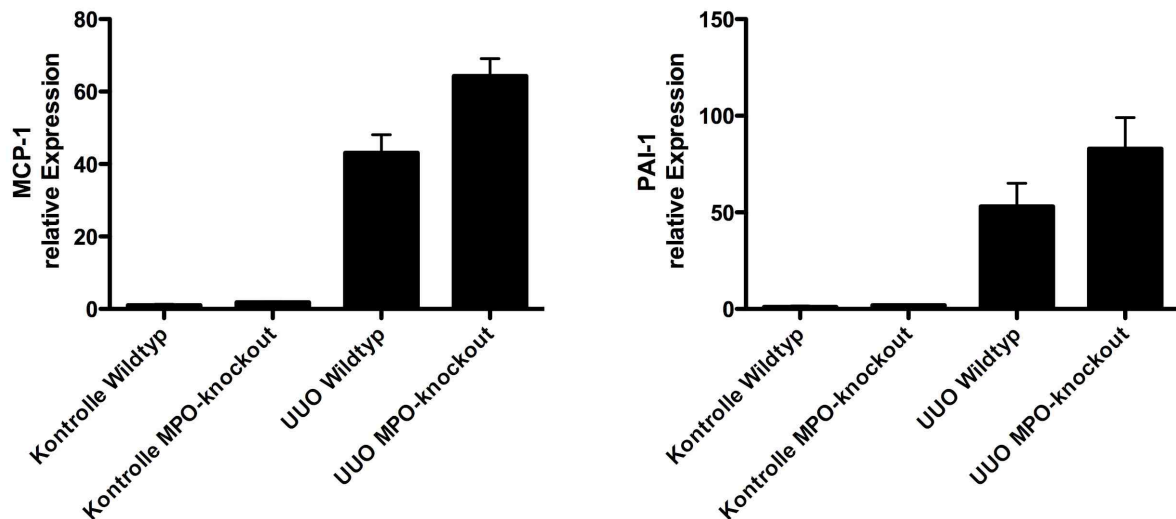


Abbildung 41/42 Relative Expressionen von MCP-1 und PAI-1 UUO führt in sowohl WT- als auch MPO-KO-Mäusen zu einem ähnlich ausgeprägten Anstieg der Genexpression von MCP-1 und PAI-1 in der Niere.

Nach UUO wurde lichtmikroskopisch eine starke Verbreiterung des Niereninterstitiums beobachtet (Abbildung 43). Diese war in sowohl WT- als auch MPO-KO-Tieren ähnlich ausgeprägt.

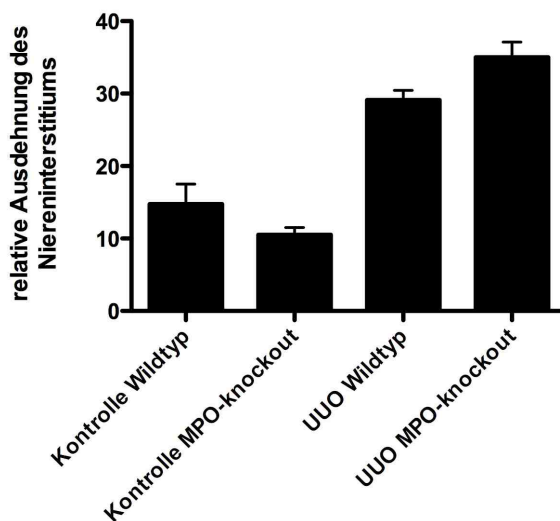


Abbildung 43 Interstitiumsverbreiterung UUO führt in WT- und MPO-KO-Mäusen zu einer signifikanten Verbreiterung des Niereninterstitiums.

5.4 Diskussion

Ein ähnlicher, wie bei der durch DOCA + Ang II induzierten hypertensiven Nephropathie gefundener, protektiver Effekt der Myeloperoxidase konnte in der durch UUO induzierten obstruktiven Nephropathie nicht nachgewiesen werden. Die für die UUO charakteristischen Veränderungen wie Infiltration von Monozyten/Makrophagen, Freisetzung von inflammatori-

schen und profibrotischen Chemokinen wie MCP-1 und PAI-1 sowie Interstitiumsverbreiterung waren in WT- und MPO-KO-Mäusen ähnlich stark ausgeprägt. Dieser Befund steht im Kontrast zu den durch DOCA + Ang II induzierten Nierenschäden, die bei MPO-KO-Mäusen deutlich ausgeprägter waren. Der protektive Effekt der Myeloperoxidase scheint spezifisch für die hypertensive Nephropathie zu sein. Beide Modelle unterscheiden sich hinsichtlich ihres Schädigungsmechanismus. Während bei der hypertensiven Nephropathie vermutlich die Hämodynamik eine wesentliche Rolle bei der Schädigung spielt, sind bei der obstruktiven Nephropathie tubulointerstitielle Fibrose und Entzündung die wesentlichsten Faktoren. Von einem generellen protektiven Effekt der Myeloperoxidase kann demnach nicht ausgegangen werden. Diese Annahme lässt sich durch die Arbeiten anderer Arbeitsgruppen belegen. Rudolph et al. konnten z.B. in einer prospektiven Studie bei Patienten mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion nachweisen, dass der -463 G/A Polymorphismus des MPO-Promotors, der zu einer erhöhten Expression von MPO führt, mit einer verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert ist (Rudolph et al., 2009). Hohe Spiegel zirkulierender MPO scheinen bei linksventrikulärer Dysfunktion eher nachteilig zu sein. Auch bei der koronaren Arteriosklerose scheint MPO ein kritischer Mediator zu sein. Goldmann et al. konnten z.B. zeigen, dass freie im Plasma zirkulierende MPO innerhalb weniger Stunden nach akutem Myokardinfarkt erhöht ist (Goldmann et al., 2009). Die Zusammenhänge zwischen Myeloperoxidase und den teilweise sehr unterschiedlichen Ergebnissen bei verschiedenen Erkrankungen bleiben weiter ungeklärt und bedürfen weiterer Studien.

Teil VI Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis

6.3 Danksagung

6.4 Lebenslauf

6.5 Ehrenwörtliche Erklärung

6.1 Abkürzungsverzeichnis

A

ACAT Acyl Coenzym A Cholesterol Acyltransferase

Ang II Angiotensin II

ANP Atrial Natriuretic Peptide

B

BALF Bronchoalveolar Lavage Fluid

BNP Brain Natriuretic Peptide

C

cDNA Complementary Deoxyribonucleic Acid

Cl⁻ Chlorid

D

Da Dalton

DNA Deoxyribonucleic Acid

DNase Desoxyribonuklease

DOCA Deoxycorticosterone Acetate

DTT Dithiothreitol

D+A DOCA + Ang II

E

EAE Experimental Autoimmune Encephalitis

ESDR End Stage Renal Disease

FSB First Strand Buffer

FW Forward

G

GBM Glomeruläre Basalmembran

GFR Glomeruläre Filtrationsrate

H

H⁺ Proton

H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl / OCl ⁻	Hypochlorige Säure / Hypochlorit
I	
IPS	Idiopathic Pneumonia Syndrome
K	
kb	Kilobasen
L	
LDL	Low Density Lipoprotein
LDS	Lithiumdodecylsulfat
M	
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MOPS	Morpholinopropanol Sulfonic acid
MPO	Myeloperoxidase
MPO-KO	Myeloperoxidase „Knockout“ (B6.129X1-Mpotm1Lus/J)
N	
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat,
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ [·]	Nitritradikal
NO ₂ ⁻	Nitrit
O	
OD	Optische Dichte
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{-·}	Superoxidanion
P	
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
preproMPO	präproMyeloperoxidase
proMPO	proMyeloperoxidase
R	
RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System
RNA	Ribonucleic Acid
RNase	Ribonukleasen
RTase	Reverse Transcriptase
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RTQ-PCR tion	Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction
RW	Reward
S	
SBP	Systolic Blood Pressure
SCN ⁻	Thiocyanation
T	
TGF- β_1	Transforming Growth Factor- β_1
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
Tyr	Tyrosinradikal
U	
UUO	Unilaterale Ureterobstruktion
u.a.	unter anderem
V	
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
v.a.	vor allem
W	
WT	Wildtyp (C57BL/6J)

6.2 Literaturverzeichnis

Abrass CK. Cellular lipid metabolism and the role of lipids in progressive renal disease. *Am J Nephrol.* 2004;24(1):46-53.

Anders HJ, Vielhauer V, Schlöndorff D. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int.* 2003;63(2):401-15.

Attman PO, Samuelsson O, Alaupovic P. Lipoprotein metabolism and renal failure. *Am J Kidney Dis.* 1993;21(6):573-92.

Bidani AK, Griffin KA. Pathophysiology of hypertensive renal damage: implications for therapy. *Hypertension.* 2004;44(5):595-601.

Boesken WH. Diagnostic significance of SDS-PAA-electrophoresis of urinary proteins: different forms of proteinuria and their correlation to renal disease. *Curr Probl Clin Biochem.* 1979;(9):235-48.

Bos A, Wever R, Roos D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1978 7;525(1):37-44.

Brennan M, Gaur A, Pahuja A, Lusic AJ, Reynolds WF. Mice lacking myeloperoxidase are more susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2001; 112(1-2):97-105.

Brennan ML, Anderson MM, Shih DM, Qu XD, Wang X, Mehta AC, Lim LL, Shi W, Hazen SL, Jacob JS, Crowley JR, Heinecke JW, Lusic A. Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice. *J Clin Invest.* 2001;107(4):419-30.

Burns WC, Kantharidis P, Thomas MC. The role of tubular epithelial-mesenchymal transition in progressive kidney disease. *Cells Tissues Organs.* 2007;185(1-3):222-31.

- Cheng J, Diaz Encarnacion MM, Warner GM, Gray CE, Nath KA, Grande JP. TGF-beta1 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression in mesangial cells through a phosphodiesterase isoenzyme 4-dependent process. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;289(4):C959-70.
- Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int*. 2009 Jun;75(11):1145-52.
- Clark JG, Hansen JA, Hertz MI, Parkman R, Jensen L, Peavy HH. Idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(6 Pt 1):1601-6.
- Clark RA, Klebanoff SJ. Chemotactic factor inactivation by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. *J Clin Invest*. 1979;64(4):913-20.
- Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1994;94(1):437-44.
- de Zeeuw D, Parving HH, Henning RH. Microalbuminuria as an early marker for cardiovascular disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(8):2100-5.
- Doi K, Noiri E, Maeda R, Nakao A, Kobayashi S, Tokunaga K, Fujita T. Functional polymorphism of the myeloperoxidase gene in hypertensive nephrosclerosis dialysis patients. *Hypertens Res*. 2007;30(12):1193-8.
- Eddy AA, Fogo AB. Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(11):2999-3012.
- Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*. 1998 22;391(6665):393-7.
- Fenna R, Zeng J, Davey C. Structure of the green heme in myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*. 1995 10;316(1):653-6.
- Fliser D, Pacini G, Engelleiter R, Kautzky-Willer A, Prager R, Franek E, Ritz E. Insulin resistance and hyperinsulinemia are already present in patients with incipient renal disease. *Kidney Int*. 1998;53(5):1343-7.
- Frei U, Schober-Halstenberg H-J. Nierenersatztherapie in Deutschland: Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007
- Furtmüller PG, Arnhold J, Jantschko W, Pichler H, Obinger C. Redox properties of the couples compound I/compound II and compound II/native enzyme of human myeloperoxidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 7;301(2):551-7.
- Giunti S, Tesch GH, Pinach S, Burt DJ, Cooper ME, Cavallo-Perin P, Camussi G, Gruden G. Monocyte chemoattractant protein-1 has pro-sclerotic effects both in a mouse model of experimental diabetes and in vitro in human mesangial cells. *Diabetologia*. 2008;51(1):198-207.
- Goldmann BU, Rudolph V, Rudolph TK, Holle AK, Hillebrandt M, Meinertz T, Baldus S. Neutrophil activation precedes myocardial injury in patients with acute myocardial infarction. *Free Radic Biol Med*. 2009 Jul 1;47(1):79-83.
- Hansson M, Olsson I, Nauseef WM. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*. 2006 15;445(2):214-24.
- Hartner A, Cordasic N, Klanke B, Veelken R, Hilgers KF. Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:1999-2004.
- Hattori M, Nikolic-Paterson DJ, Miyazaki K, Isbel NM, Lan HY, Atkins RC, Kawaguchi H, Ito K. Mechanisms of glomerular macrophage infiltration in lipid-induced renal injury. *Kidney Int Suppl*. 1999;71:S47-50.

- Hazen SL, Crowley JR, Mueller DM, Heinecke JW. Mass spectrometric quantification of 3-chlorotyrosine in human tissues with attomole sensitivity: a sensitive and specific marker for myeloperoxidase-catalyzed chlorination at sites of inflammation. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(6):909-16.
- Hehner SP, Breikreutz R, Shubinsky G, Unsoeld H, Schulze-Osthoff K, Schmitz ML, Dröge W. Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *J Immunol.* 2000 Oct;165(8):4319-28.
- Huang W, Xu C, Kahng KW, Noble NA, Border WA, Huang Y. Aldosterone and TGF-beta1 synergistically increase PAI-1 and decrease matrix degradation in rat renal mesangial and fibroblast cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(6):F1287-95.
- Kirchhoff F, Krebs C, Abdulhag UN, Meyer-Schwesinger C, Maas R, Helmchen U, Hilgers KF, Wolf G, Stahl RA, Wenzel U. Rapid development of severe end-organ damage in C57BL/6 mice by combining DOCA salt and angiotensin II. *Kidney Int.* 2008;73(5):643-50.
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science.* 1970 11;169(950):1095-7.
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005; 77(5):598-625.
- Kono H, Rusyn I, Yin M, Gäbele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, Connor HD, Mason RP, Segal BH, Bradford BU, Holland SM, Thurman RG. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest.* 2000;106(7):867-72.
- Krag S, Danielsen CC, Carmeliet P, Nyengaard J, Wogensen L. Plasminogen activator inhibitor-1 gene deficiency attenuates TGF-beta1-induced kidney disease. *Kidney Int.* 2005 Dec;68(6):2651-66.
- Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther.* 2006;111(1):16-26.
- Liang K, Vaziri ND. Gene expression of lipoprotein lipase in experimental nephrosis. *J Lab Clin Med.* 1997;130(4):387-94.
- Liao TD, Yang XP, Liu YH, Shesely EG, Cavasin MA, Kuziel WA, Pagano PJ, Carretero OA. Role of inflammation in the development of renal damage and dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension.* 2008;52(2):256-63.
- Malle E, Furtmüller PG, Sattler W, Obinger C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br J Pharmacol.* 2007;152(6):838-54.
- Malle E, Woenckhaus C, Waeg G, Esterbauer H, Gröne EF, Gröne HJ. Immunological evidence for hypochlorite-modified proteins in human kidney. *Am J Pathol.* 1997; 150(2):603-15.
- Marcantoni C, Fogo AB: A perspective on arterionephrosclerosis: from pathology to potential pathogenesis. *J Nephrol.* 2007;20(5):518-24.
- Marsche G, Levak-Frank S, Quehenberger O, Heller R, Sattler W, Malle E. Identification of the human analog of SR-BI and LOX-1 as receptors for hypochlorite-modified high density lipoprotein on human umbilical venous endothelial cells. *FASEB J.* 2001;15(6):1095-7.
- Marcinkiewicz J. Neutrophil chloramines: missing links between innate and acquired immunity. *Immunol Today.* 1997;18(12):577-80.
- Meyrier A. Hypertensive nephrosclerosis pathogenesis, diagnosis and management. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 1999;10(3):267-74.
- Milla C, Yang S, Cornfield DN, Brennan ML, Hazen SL, Panoskaltis-Mortari A, Blazar BR, Haddad IY. Myeloperoxidase deficiency enhances inflammation after allogeneic marrow transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;287(4):L706-14.
- Nakaya I, Wada T, Furuichi K, Sakai N, Kitagawa K, Yokoyama H, Ishida Y, Kondo T, Sugaya T, Kawachi H, Shimizu F, Narumi S, Haino M, Gerard C, Matsushima K, Kaneko S.

- Blockade of IP-10/CXCR3 promotes progressive renal fibrosis. *Nephron Exp Nephrol.* 2007;107(1):e12-21.
- Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int.* 1992;41(3):557-9.
- Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol.* 1977; 86(3): 675-684.
- Rudolph V, Rudolph TK, Kubala L, Clauberg N, Maas R, Pekarova M, Klinke A, Lau D, Szöcs K, Meinertz T, Böger RH, Baldus S. A myeloperoxidase promoter polymorphism is independently associated with mortality in patients with impaired left ventricular function. *Free Radic Biol Med.* 2009 Dec 1;47(11):1584-90.
- Schiffrin EL. The flame that lights the fire: oxidative stress, inflammation, and renal damage in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension.* 2008;52(2):256-63.
- Schneider A, Panzer U, Zahner G, Wenzel U, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RA. Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta. *Kidney Int.* 1999;56(1):135-44.
- Schrijvers BF, Rasch R, Tilton RG, Flyvbjerg A. High protein-induced glomerular hypertrophy is vascular endothelial growth factor-dependent. *Kidney Int.* 2002;61(5):1600-4.
- Schultz J, Kaminker K. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Arch Biochem Biophys.* 1962;96:465-7.
- Sharma AK, Mauer SM, Kim Y, Michael AF. Interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 1993 Oct;44(4):774-88.
- Trevisan R, Dodesini AR, Lepore G. Lipids and renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(4 Suppl 2):S145-7.
- Vaziri ND, Sato T, Liang K. Molecular mechanisms of altered cholesterol metabolism in rats with spontaneous focal glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2003;63(5):1756-63.
- Verdeguer F, Castro C, Kubicek M, Pla D, Vila-Caballer M, Vinué A, Civeira F, Pocoví M, Calvete JJ, Andrés V. Complement regulation in murine and human hypercholesterolemia and role in the control of macrophage and smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res.* 2007;76(2):340-50.
- Vielhauer V, Mayadas TN: Functions of TNF and its receptors in renal disease: distinct roles in inflammatory tissue injury and immune regulation. *Semin Nephrol.* 2007;27(3):286-308.
- Wada T, Sakai N, Matsushima K, Kaneko S. Fibrocytes. a new insight into kidney fibrosis. *Kidney Int.* 2007;72(3):269-73.
- Wang S, LaPage J, Hirschberg R. Proteinuria and progression of chronic renal disease. *Kidney Blood Press Res.* 2000;23(3-5):167-9.
- Wendt T, Zhang YM, Bierhaus A, Kriegsmann J, Deng Y, Waldherr R, Teske T, Luther T, Fünfstück R, Nawroth PP. Tissue factor expression in an animal model of hydronephrosis. *Nephrol Dial Transplant.* 1995 Oct;10(10):1820-8.
- Wolf G, Ziyadeh FN. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol.* 2007;106(2):p26-31.
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008;214(2):199-210.
- Zhang G, Kim H, Cai X, Lopez-Guisa JM, Carmeliet P, Eddy AA. Urokinase receptor modulates cellular and angiogenic responses in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(5):1234-53.
- Zhang Y, Carreras D, de Bold AJ. Discoordinate re-expression of cardiac fetal genes in N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) hypertension. *Cardiovasc Res.* 2003; 57(1):158-67.

6.3 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Stahl für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Klinik durchführen zu dürfen.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wenzel, für die Überlassung dieses Promotionsthemas sowie seine Unterstützung und Förderung, die über die vorliegende Arbeit weit hinaus ging.

Besonders danke ich auch den Organisatoren des Graduiertenkollegs „Entzündung und Regeneration“, die mir dieses Forschungsjahr und die damit verbundenen Erfahrungen ermöglicht haben.

Ferner möchte ich Herrn Prof. Dr. Baldus für die großzügige Überlassung der in seinem Labor gezüchteten MPO-KO-Mäuse danken sowie für die Hilfe seiner Mitarbeiterinnen Dr. Lau und Dr. Klinke.

Auch danke ich Dr. Zahner, der mir als Laborleiter zu offenen Fragen immer eine Antwort wusste.

Ich danke meinen Gutachtern sehr herzlich dafür, dass sie sich trotz des hektischen Klinikalltages Zeit für die Begutachtung meiner Arbeit nahmen.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Dr. Haddad, der die Messungen von Cholesterin, Triglyceriden sowie Kreatinin und Harnstoff organisierte, sowie Dr. Schwedhelm, der die Messungen zur NO-Bioverfügbarkeit vornahm.

Für ihre Unterstützung möchte ich mich auch bei Saskia Schröder, Mariola Rezska, Anett Peter, Philip Klug und Mathias Lindner bedanken.

Ferner danke ich meinem Eltern und Schwestern für ihre moralische Unterstützung, und besonders auch Eike, die sich dabei besonders viel Mühe gab.

6.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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.

Robin Schmidt-Haupt