Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Nephrologie
Campus Charité Mitte der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

NO-vermittelte Effekte der Aminosäure L-Arginin auf die TGF-ß-Überexpression im Modell der akuten Anti-Thy-1-Glomerulonephritis

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von

Ute Daig

aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. med. H. Peters
2. Prof. Dr. med. F. Strutz
3. Priv.-Doz. Dr. med. E. Schulze-Lohoff

Datum der Promotion: 12.09.2005

Widmung

für Dr. Erwin Daig, Barbara und Isolde Daig

Zusammenfassung

Hintergrund: L-Arginin spielt eine komplexe Rolle in der renalen Matrixexpansion, eingeschlossen der endogene Stoffwechsel der Aminosäure in Stickoxid (NO), Polyamine, L-Prolin und Agmatin. Bei Ratten mit einer induzierten Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN) ist gezeigt worden, dass die diätetische Gabe von L-Arginin die Überproduktion von transforming growth factor (TGF)-ß sowie die Matrixakkumulation limitieren konnte. Die vorliegende Studie testet die Hypothese, dass die günstigen Effekte auf die Überexpression von TGF-ß in vivo durch die Generierung von NO vermittelt wird.

Methoden: Einen Tag nach Induktion einer Anti-Thy-1-Glomerulonephritis wurden männliche Wistar Ratten, die mit normal proteinhaltigen Futter ernährt worden sind, in die folgenden Gruppen zugeordnet worden: (1) normale Kontrollen; (2) GN; (3) GN-Arg [plus 500 mg L-Arginin/die]; (4) GN-Arg-NAME [plus 500 mg L-Arginin/die und 75 mg/die des NO-Synthase-Inhibitors Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME) im Trinkwasser] und (5) GN-Molsi [plus 10 mg/die des NO-Donors Molsidomin]. In Versuchsprotokoll 1 wurde die Behandlung bis Tag 7, in Protokoll 2 bis Tag 12 nach Induktion der Glomerulonephritis durchgeführt. Analysiert wurden die Daten des systolischen Blutdrucks, die histologische glomeruläre Matrixexpansion, die Proteinurie sowie die glomeruläre mRNA- und Protein-Expression des Schlüsselfibrogens TGF-ß, des Matrixproteins Fibronektin und des Protease-Inhibitors Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1(PAI-1).

Ergebnisse: Die Blutdruckwerte zeigten sich normal in unbehandelten Anti-Thy-1-Tieren und nicht signifikant beeinflusst durch eine der Behandlungen. Verglichen mit unbehandelten, nephritischen Ratten, reduzierten die Gabe von L-Arginin sowie von Molsidomin signifikant die glomeruläre TGF-ß Überexpression und auch in ähnlichem Mass in beiden Studienprotokollen. Die günstigen Effekte von L-Arginin wurden durch gleichzeitige Blockade der NOS-Synthese mit L-NAME aufgehoben. Die glomeruläre Matrixakkumulation, Fibronektin und PAI-1 mRNA- und Protein-Expression folgten eng der TGF-ß-Expression. Die Proteinurie wurde durch keine der Behandlungen signifikant beeinflusst.

Schlussfolgerung: Die vorliegende Studie zeigt, dass die antifibrotischen Effekte der Aminosäure L-Arginin in der normotensiven Anti-Thy-1-Glomerulonephritis der Ratte hauptsächlich über die endogene Produktion von NO vermittelt werden. Diese Daten lassen vermuten, dass NO in vivo die TGF-ß-Überexpression auf einem blutdruck-unabhängigen Weg limitiert und dass NO-Donoren sich günstig in der Behandlung von menschlichen fibrotischen Nierenerkrankungen auswirken könnten.

Schlüsselworte: L-Arginin, Stickoxid, TGF-ß, Fibrose

Abstract

Background: L-arginine olays a complex role in renal matrix expansion, involving endogenous metabolism into nitric oxide (NO), polyamines, L-prolin and agmatine. Supplementing dietary L-arginine intake has been shown to limit transforming growth factor (TGF)-ß1 overproduction and matrix accumulation in rats with induced Anti-Thy-1 glomerulonephritis (GN). The present study tests the hypothesis that this beneficial effect on in vivo TGF-ß overproduction is mediated via the generation of NO.

Methods: One day after inducion of Anti-Thy-1 GN, male wistar rats fed a normal protein diet were assigned to the following groups: (1) normal controls; (2) GN; (3) GN-Arg [plus 500 mg L-arginine/day]; (4) GN-Arg-NAME [plus 500 mg L-arginine/day and 75 mg/day of the NO synthase inhibitor nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) in the drinking water] and (5) GN-Molsi [plus 10 mg/day of the NO donor molsidomine]. In protocol 1, treatment lasted until day 7 and in protocol 2 until day 12 after disease induction, respectively. Analysis included systolic blood pressure, proteinuria, a glomerular histologic matrix score and the glomerular mRNA and protein expression of the key fibrogen TGF-ß1, the matrix protein fibronectin and the protease inhibitor plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1).

Results: Blood pressure was normal in untreated Anti-Thy-1 animals and not significantly affected by any of the treatments. Compared to nephritic rats, administration of both L-arginine and molsidomine reduced glomerular TGF-ß1 overexpression significantly and to a similar degree in both protocols, while the beneficial effect of L-arginine was abolished by concomitant NO synthesis inhibition. Glomerular matrix accumulation, fibronectin and PAI-1 mRNA and protein expression cloxely followed the expression of TGF-ß1. Proteinuria was not significantly affected by any treatment.

Conclusion: The present study shows that L-arginine´s antifibrotic action in normothensive Anti-Thy-1 GN is mainly mediated by endogenous production of

NO. The data suggest that NO limits in vivo TGF-ß overexpression in a pressure-independent manner and that NO donors may be of benefit in the treatment of human fibrotic renal disease.

Key words: L-arginine, nitric oxide, TGF-ß, fibrosis

1 EINLEITUNG 1

1.1 Epidemiologie der chronischen Niereninsuffizienz 2

1.2 Molekulare Mechanismen bei der chronischen Glomerulonephritis 3

1.2.1 Nierenfibrose als überschießende Wundheilung 3

1.2.2 Therapieansätze bei fibrotischen Nierenerkrankungen 4

1.2.3 Transforming growth factor ß und seine Rolle in der Nierenfibrose 5

1.2.4 Das L-Arginin/NO-System 6

1.3 Modell der– Anti-Thy-1-Glomerulonephritis der Ratte 10

1.4 Fragestellung 11

2 MATERIAL UND METHODEN 12

2.1 Materialien 12

2.2 Tierversuch 12

2.2.1 Tiere und Tierhaltung 12

2.2.2 Die Anti-Thy-1-Glomerulonephritis – Herstellung des Antikörpers OX-7 12

2.2.3 Aufreinigung des Kulturüberstandes 13

2.2.4 Induktion der Glomerulonephritis 14

2.3 Futter 14

2.3.1 Wirkstoffe 15

2.3.2 Wirkstoffzubereitung 16

2.4 Studienprotokolle 17

2.4.1 Protokoll 1 – Effekte der Behandlung mit L-Arginin, Molsidomin und L-Arginin + L-NAME sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis 17

2.4.2 Protokoll 2 – Effekte der Behandlung mit L-Arginin, Molsidomin und L-Arginin + L-NAME zwölf Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis 18

2.5 Versuchsparameter 19

2.5.1 Messung des systolischen Blutdrucks 19

2.5.2 Urinsammlung 19
2.5.3 Entnahme der Nieren 20
2.5.4 Aufarbeitung der Nieren, Isolation der Glomeruli für die Zellkultur 20
2.5.5 Zellkultur 21

2.6 Messung der Krankheitsparameter 22
2.6.1 Histologie 22
2.6.2 ELISA – Enzym Linked Immuno Sorbent Assay 25
2.6.3 Proteinurie 30
2.6.4 Glomeruläre messenger-RNA-Expression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 31
2.6.5 Konzentrationsmessung der RNA mittels Spektrometer 32
2.6.6 RT-PCR 33

2.7 Nitrat/Nitrit-Messung (Griess-Assay) 37

2.8 Effekte des NO auf die glomeruläre TGF-ß-Produktion in vitro 38

2.9 Statistische Auswertung 39

3 ERGEBNISSE 40

3.1 Protokoll 1 Effekte der Behandlung mit L-Arginin, Molsidomin und L-Arginin + L-NAME sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis 40
3.1.1 Gewichtsverhalten 40
3.1.2 Aufgenommene Dosen von L-Arginin, Molsidomin und L-NAME 40
3.1.3 Systolischer Blutdruck 43
3.1.4 Glomerulärer Matrixgehalt 43
3.1.5 Glomeruläre TGF-ß-Produktion 44
3.1.6 Glomeruläre Fibronektin-Produktion 46
3.1.7 Glomeruläre PAI-1-Produktion 47
3.1.8 Proteinurie 48
3.1.9 mRNA-Expression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 48
3.1.10 NO_2^-/NO_3^- im Plasma 52
3.1.11 NO_2^-/NO_3^- im Urin 53
3.1.12 Effekte von NO auf die glomeruläre TGF-ß-Produktion in vitro 54

3.1.13 Immunhistochemische Färbung von TGF-ß1-Protein sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis 57

3.2 Protokoll 2 Effekte der Behandlung mit L-Arginin, Molsidomin und L-Arginin + L-NAME zwölf Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis 59
3.2.1 Gewichtsverhalten 59
3.2.2 Aufgenommene Dosen von L-Arginin, Molsidomin und L-NAME 59
3.2.3 Glomerulärer Matrixgehalt 62
3.2.4 Glomeruläre TGF-ß-Produktion 63
3.2.5 Glomeruläre Fibronektin- Produktion 64
3.2.6 Glomeruläre PAI-1-Produktion 65
3.2.7 Proteinurie 66

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse 69

4 DISKUSSION 71

4.1 Methodenkritik 71
4.1.1 Tiermodelle 71
4.1.2 TGF-ß-Expression als zentraler Parameter für die Fibroseaktivität 73
4.1.3 Weitere Parameter zur Messung der Fibroseaktivität 73

4.2 Wirkung der L-Arginin-Gabe, der NO-Donation und der Blockade der NO-Synthese auf den Blutdruck 74

4.3 Wirkung der pharmakologischen Intervention in den L-Arginin/NO-Stoffwechsel auf die Expression der Fibrosemarker TGF-ß, Fibronektin und PAI-1 sowie auf die Matrixexpansion 75
4.3.1 Effekte der diätetischen L-Arginin-Zufuhr 75
4.3.2 Effekte der diätetischen L-Arginin-Zufuhr unter gleichzeitiger Hemmung der NO-Synthase mit L-NAME 76
4.3.3 Effekte der NO-Donation mit Molsidomin 76

4.4 Effekte auf die NOx-Konzentrationen in Blutplasma und Urin 78

4.5 TGF-ß und NO 79

4.6 Proteinurie 80

4.7 L-Arginin – eine Aminosäure mit gegensätzlichen Wirkungen 80

5 ZUSAMMENFASSUNG 84

6 LITERATURVERZEICHNIS 86

7 ERKLÄRUNG AN EIDES STATT 97

8 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS 98

DANKSAGUNG 101

1 Einleitung

Die Glomerulonephritis ist eine der häufigsten Ursachen des terminalen Nierenversagens. Sie ist durch einen fortschreitenden Funktionsverlust bis zum vollständigen Organversagen gekennzeichnet [1]. Der Funktionsuntergang korreliert eng mit vermehrter Expression von extrazellulären Matrixproteinen im Nierengewebe. Die Akkumulation renaler Matrixproteine findet sich bei akuter sowie bei chronischer Niereninsuffizienz [2]. Die extrazelluläre Matrixexpansion ist eine uniforme Gewebsantwort auf verschiedene Verletzungsstimuli verursacht durch z.B. Bluthochdruck, Entzündungsvorgänge, renale Hypoxämie oder Diabetes mellitus.

Der endogene Stoffwechsel der Aminosäure L-Arginin ist in die renale Matrix-Produktion und Akkumulation entscheidend involviert. L-Arginin ist die Ausgangssubstanz für die endogene Generierung des zentralen Signal- und Effektormoleküls Stickoxid (NO). Über drei Stickoxid-Synthasen (NOS) ist NO für die Regulation des renalen Gefäßdrucks, immunvermittelte Gewebeschädigung und die neuronale Kontrolle des tubulo-glomerulären Feedbacks bedeutsam. L-Arginin ist zusätzlich die Ausganssubstanz für die Synthese von Polyaminen, L-Prolin und Agmatin [10;19;37,38]. Forschungsarbeiten am Modell der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis der Ratte haben kürzlich zeigen können, dass eine erhöhte diätetische Zufuhr von L-Arginin die glomeruläre Matrixexpansion und Überexpression des profibrotischen Zytokins Transforming-Growth-Factor-ß nach Induktion der Glomerulonephritis signifikant vermindert [3;4;5;6;7]. Unklar blieb in dieser Untersuchung, ob die günstige Wirkung von L-Arginin über die endogene Bildung von NO - insbesondere endothelial gebildetem NO - oder über andere Stoffwechselwege vermittelt wurde.

Ziel dieser Arbeit ist die Prüfung der Hypothesen:

- Werden die antifibrotischen Wirkungen von L-Arginin während der Matrixexpansionsphase der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis über die endogene Generierung von Stickoxid vermittelt?
- Können vergleichbar antifibrotische Wirkungen wie mit L-Arginin mittels pharmakalogischer NO-Donation (in dieser Arbeit mittels Molsidomin) erzielt werden?
- Können die günstigen Wirkungen des L-Arginin durch pharmakologische Hemmung der NO-Synthasen und damit der Hemmung der Generierung von NO aufgehoben werden?

1.1 Epidemiologie der chronischen Niereninsuffizienz

In den letzen Jahren ist eine stetige Zunahme der Zahl von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zu verzeichnen. In der Bundesrepublik Deutschland wurde bei Beginn einer Nierenersatztherapie für das Jahr 2001 eine Inzidenz von 36% Diabetes mellitus (Typ I 4%, Typ II 32%), die vaskuläre Nephropathie mit 17%, gefolgt von der Glomerulonephritis mit 14%, der interstitiellen Nephritis mit 9% und den Zystennieren mit 6% festgestellt [105]. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die diabetische und auch die hypertensive Nephropathie stetig zunehmen. Von 1995 bis 2001 wurde ein Anstieg der Inzidenz bei Therapiebeginn von 27% auf 36% für die diabetische und für die hypertensive Nephropathie von 11% auf 17% verzeichnet [105]. In den USA wurde nach einem Bericht des Annual Data Reports der United States Renal Data Systems eine Inzidenz der Niereninsuffizienz für das Jahr 2002 für folgende Grunderkrankungen vorgelegt: Diabetes mellitus 45%, Hypertonie 27%, Glomerulonephritis 8,6% und Zystennieren 2,2% [10].

1.2 Molekulare Mechanismen bei der chronischen Glomerulonephritis

Die Funktionsverschlechterung der Niere bei chronische Glomerulonephritis ist durch eine irreversible Abnahme des glomerulären Filtrates gekennzeichnet. Damit geht auf histologischer Ebene eine zunehmende Vermehrung des Bindegewebes im Glomerulus einher. Mit zunehmender Krankheitsdauer zeigt sich eine Nierenfibrose [1;2]. Die Zunahme dieses Narbengewebes korreliert eng mit der renalen Funktionseinschränkung [8]. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass auf molekularer Ebene dem histologischen Bild der Nierenfibrose ein Prozess mit Zunahme von extrazellulärer Matrix zugrunde liegt [2]. Diese Matrix besteht aus drei Einzelkomponenten [2;8]

1. einer gesteigerterten Synthese von Matrixproteinen wie Fibronektin, Proteoglykanen, Kollagen I, III, IV, Laminin, Vitronectin, Tenascin und Heparansulfat
2. eines gehemmten Matrixabbaus durch die verminderte Bildung von Gewebsproteinasen (wie Matrix-Metalloproteinasen = MMP´s, MMp-1 = Kollagenase I, MMP-2 Gelatinase A, MMP-9 = Gelatinase B, Elastase, Serin-Proteinasen) und gesteigerte Bildung von Protease-Inhibitoren (wie Tissue Inhibitors of Metalloproteinases = TIMP´s, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ-1 = PAI-1)
3. einer lokalen Überexpression von Matrix-bindenden Rezeptoren (Integrine, z.B. $\alpha_5\beta_1$-Integrin = Fibronektinrezeptor, $\alpha_1\beta_1$-Integrin = Kollagen- und Lamininrezeptor $\alpha_2\beta_1$-Integrin = Kollagenrezeptor).

1.2.1 Nierenfibrose als überschießende Wundheilung

Die Überexpression extrazellulärer Matrix in der Niere findet sich als uniforme Gewebsantwort auf verschiedenartige Schädigungsreize wie Hypertension, Hyperglykämie oder Inflammation [10]. Gleiche Gewebsantworten finden sich auch in anderen Organen bei chronisch-progressiven Erkrankungen wie z.B. bei Leberzirrhose, Lungen- oder Myocardfibrose [2]. Alle diese Erkrankungen

gehen mit einer Fibrosierung und einem daraus resultierenden Funktionsverlust des Organs einher. Die renale Matrixexpansion ist Bestandteil des normalen Wundheilungsprozesses, die nach Schädigung einsetzt, um als Reparatur eines Gewebedefektes eine Normalisierung der Funktion wieder herzustellen. Die Organfibrosierung dagegen kann als nicht terminale Wundheilung beschrieben werden. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist die Matrixakkumulation als Reparaturprozess des Defektes im Gewebe in sich beschränkt, da zuviel entstandene Matrix durch z.B. Gewebsproteinasen wieder abgebaut wird. Ein „Zuviel“ an Wundheilung bewirkt den Funktionsverlust durch Fibrose. Bezeichnend für chronisch-fortschreitende Erkrankungen wie die chronische Glomerulonephritis ist der ständig wiederkehrende Schädigungsreiz, auf den das Organ permanent mit Wundheilungsprozessen reagiert. Die normale Regeneration mit einem adäquaten Heilungsprozess ist gestört, zuviel entstandene Matrix wird nicht mehr abgebaut, und es resultiert eine Matrixakkumulation. Die Folge ist die Organfibrosierung [2].

1.2.2 Therapieansätze bei fibrotischen Nierenerkrankungen

Trotz Behandlung der Grunderkrankungen (immunsuppressive Behandlung bei Autoimmun-Glomerulonephritis, Behebung von Harnwegsobstruktionen und Reflux sowie Normalisierung des Blutdrucks und des Blutzuckerspiegels), denen eine chronische Niereninsuffizienz folgt, kann der chronisch-progressive Verlauf der Nierenfibrose oft nicht aufgehalten oder rückgängig gemacht werden. In der spezifischen Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz sind bislang der Einsatz von ACE-Hemmern [11] und die Restriktion der Eiweißzufuhr etabliert [1;11]. Auch diese beiden Therapiestrategien können die Progression der Erkrankung lediglich verlangsamen. Bei hypertensiven Erkrankungen ist eine strenge Therapie des Blutdrucks notwendig, bei der vor allem ACE-Inhibitoren und auch AT1-Rezeptorblocker eine Rolle spielen [12]. Für Patienten mit diabetischer Nephropathie bei Diabetes mellitus ist eine optimale Einstellung des Blutzuckerspiegels absolut notwendig. Die Reduktion der Eiweißaufnahme durch diätische Nahrungsumstellung führt ebenfalls wahrscheinlich zur Progressionsverzögerung [12]. Die empfohlene

Proteinmenge 0,6 bis 0,8 g/kg Körpergewicht pro Tag sollte von den Patienten nicht überschritten werden. Ansonsten muss die Therapie symptomatisch bleiben und kann lediglich die durch den zunehmenden Funktionsverlust der Nieren auftretenden Folgen ausgleichen. Im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz, dem Endstadium der Erkrankung, ist eine Nierentransplantation neben der Dialyse bis heute die einzige Therapiemöglichkeit.

1.2.3 Transforming growth factor ß und seine Rolle in der Nierenfibrose

Tierexperimentelle Daten konnten zeigen, dass der günstige Effekt der ACE-Inhibition ebenso wie eine Restriktion der Eiweißaufnahme eng mit der Verminderung der renalen Matrixexpansion und der Expression des profibrotisch wirkenden Zytokins TGF-ß in Zusammenhang stehen [13;14]. Forschungsarbeiten konnten eine zentrale Rolle des profibrotischen Zytokins TGF-ß in der Expansion renaler Matrix nachweisen. Dieses Zytokin beeinflusst die drei Mechanismen der Matrixexpansion (vermehrte Produktion, verminderter Abbau und vermehrte Produktion vernetzender Proteinen) und die Regulation der einzelnen Reaktion [17;18]. TGF-ß induziert die Expression von Kollagen, Fibronektin und Proteoglykanen. Weiterhin konnte für den verminderten Abbau extrazellulärer Matrix gezeigt werden, dass TGF-β die Synthese von Proteasen inhibiert und Proteaseinhibitoren (z.B Plasminogen-Activator-Inhibitor 1 [PAI-1]) stimuliert und auch die Synthese steigert. Für den Einfluss auf die Produktion von vernetzenden Proteinen wurde gezeigt, dass TGF-β die Expression von Integrinen auf Zelloberflächen steigert. Durch diesen Prozess werden Zell-Matrixinteraktionen und Matrixvernetzungen möglich. Zusammenfassend kann gesagt werden, das Ausmaß der Fibrosierung korreliert direkt mit der Höhe des TGF-β-Spiegels [10;18]. Ein wichtiger Schritt zum Beweis der zentralen Rolle von TGF-β bei der Organfibrose war der Einsatz von neutralisierenden Antikörpern gegen TGF-β im Modell der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis [16]. In diesem Modell der mesangioproliferativen Glomerulonephritis, deren Kennzeichen unter anderem die rasche und ausgeprägte Akkumulation von

extrazellulärer Matrix ist, konnte die Matrixakkumulation durch den Einsatz von neutralisierenden Antikörpern signifikant gesenkt werden. Die Fibrosierung des Glomerulus konnte allerdings nicht vollständig verhindert werden [16]. Das deutet darauf hin, dass weitere Faktoren bei der Entstehung der Fibrose beteiligt zu sein scheinen [15].
In den letzten Jahren wurde für das Verständnis der Entstehung chronischer Nierenleiden eine Reihe von pathogenetisch relevanten Mediatoren identifiziert, die neue Ansatzmöglichkeiten zur Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz darstellen. Neben dem Schwerpunkt dieser Arbeit, dem L-Arginin/NO-System sind das unter anderem Endothelin-Rezeptor-Blockaden, TGF-ß neutralisierende Strategien sowie Chemokinin-Rezeptor-Antagonisten [10;18]. Im Folgenden soll ein Überblick über den L-Arginin-Stoffwechsel gegeben werden.

1.2.4 Das L-Arginin/NO-System

1.2.4.1 Die Aminosäure L-Arginin und ihre Stoffwechselwege

L-Arginin ist eine semi-essentielle Aminosäure [19;10;20], die endogen im wesentlichen in den proximalen Tubuluszellen der Niere produziert wird [10]. In geringerem Umfang wird L-Arginin auch von Endothelzellen und von Makrophagen gebildet. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist die endogene Produktion von L-Arginin ausreichend, um das metabolische Gleichgewicht aufrecht zu erhalten [19;20]. Bei erhöhtem Verbrauch ist jedoch die vermehrte diätetische Zufuhr für die Unterhaltung der verschiedene L-Arginin-Stoffwechselwege essentiell. Die endogenen Metabolite des L-Arginin sind auf der einen Seite Stickoxid (NO) und auf der anderen Seite Polyamine, L-Prolin und Agmatin [10].

1.2.4.2 Stickoxid – ein „ambivalentes“ Molekül

Unter physiologischen Bedingungen wird ungefähr 1% der täglichen Argininzufuhr zu NO verstoffwechselt [24]. Stickoxid ist ein reaktionsfreudiges, gasförmiges Molekül mit einer Halbwertszeit von 20 – 30 Sekunden [122]. Gering freigesetzte Menge an NO, das aus L-Arginin via verschiedenen NO-Synthese-Enzymen (NO-Synthasen NOS) hervorgegangen ist, wirkt als intrazellulärer Botenstoff, Neurotransmitter, Vasodilatator, Entzündungsmediator und spielt eine Rolle bei der Zellabwehr [25;26;19]. 1980 konnten R. F. Furchgott und J. F. Zawadzki zeigen, dass Acetylcholin nur dann zu einer Vasorelaxation führt, wenn Endothelzellen vorhanden sind, und folgerten, dass die Kontraktion der Gefäßmuskelzellen durch ein Signalmolekül der Endothelzellen reguliert wird. Dieser noch unbekannte Botenstoff wurde »endothelium-derived relaxing factor«, EDRF genannt [21]. 1986 konnte L.J. Ignarro beweisen, dass es sich bei dem von Furchgott beschriebenen endothelialen Relaxationsfaktor um Stickstoffmonoxid handelt [22]. Ferid Murad konnte zeigen, dass eine der wichtigsten biologisch relevanten Reaktionen des Stickoxids die Bindung an das Enzym lösliche Guanylylcyclase ist. Durch die NO-gekoppelte Aktivierung dieser Guanylylcyclase resultiert die Produktion des second- messenger 3',5'-zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), welches eine Reihe von physiologischen Reaktionen wie Vasodilatation und Neurotransmission regulieren kann [114]. Ferid Murad, Robert F. Furchgott und Louis J. Ignarro wurden 1998 für die Entdeckung und Charakterisierung von Stickstoffmonoxid (NO) als zentrales Signalmolekül des Herz-Kreislaufsystems mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

NO wird in verschiedenen Zelltypen durch Abspaltung und Oxidation eines Stickstoffatoms von L-Arginin unter Entstehung von L-Citrullin produziert. Diese Reaktion wird durch NO-Synthasen (NOS) katalysiert [115]. Stickstoffmonoxid ist lipophil und kann ungehindert durch Zellmembranen diffundieren. Aufgrund seiner Reaktionsfreudigkeit, z. B. mit Sauerstoff oder mit Hämoglobin, hat NO nur eine kurze Lebensdauer von wenigen Sekunden. Daher wirkt NO vor allem

am Ort seiner Produktion. Die Effekte von NO werden durch die Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase verursacht. Dadurch steigen die intrazellulären cGMP-Spiegel der glatten Muskelzellen der Gefäße [116] Das Ergebnis sind u.a. eine über cGMP-abhängige Proteinkinasen gesteuerte Vasodilatation [27], Hemmung der Thrombozytenaggregation und Leukozytenmigration [25]. Während NO in niedrigen Konzentrationen überwiegend als Signalstoff fungiert, wird es in hohen Konzentrationen zu einem Effektormolekül des Immunsystems mit einer wichtigen Rolle bei Infektabwehr und Autoimmunität. Diese zytostatischen und auch zytotoxischen Wirkungen des Stickoxid wird durch Reaktion mit Superanionen der Bildung des starken Oxidants Peroxynitrit zugewiesen [25;28]. Peroxynitrit und NO hemmen u.a. Schlüsselenzyme der Atmungskette und führen zur DNA-Fragmentation und zur Apoptosis [25;29].

1.2.4.3 Die NO-Synthasen: NOS I (neuronale NO-Synthase), NOS II (induzierbare NO-Synthase) und NOS III (endotheliale NO-Synthase)

Bislang sind von den NO-Synthasen sind drei Isoformen bekannt, die zelltypspezifisch exprimiert und unterschiedlich reguliert werden. Es wird in konstitutive (eNOS, nNOS) und induzierbare (iNOS) unterteilt. Die endotheliale NOS (eNOS, Typ III) und die neuronale NOS (nNOS, Typ I) sind kalziumabhängig und werden konstitutiv exprimiert. Sie sind Calmodulin-abhängig und unterliegen damit dem intrazellulären Ca-++-Stoffwechsel [117;115]. Ein weiterer Unterschied zwischen den NOS-Unterformen ist darin zu sehen, dass die konstitutiven NOS in der Lage sind, NO in einem zeitlich begrenzten Rahmen von mehreren Minuten NO in niedrigen Konzentrationen zu synthetisieren [118;38], während die induzierbare iNOS grössere Mengen an NO im Bereich von Stunden und Tagen [66;38] zusammensetzt.
Das von der neuronalen Synthase nNOS produzierte NO übernimmt eine wichtige Funktion bei Gedächtnisleistungen im Hippocampus und für das Sexualverhalten [30]. Diese Synthase wird vorwiegend konstitutiv exprimiert und über den intrazellulären Calciumhaushalt reguliert. In der Niere wird nNOS vornehmlich in der Makula densa exprimiert und ist an der Regulation des

tubulointerstitiellen Feedbacks und der Renin-Produktion beteiligt [25].
Die induzierbare NOS (iNOS, Typ II) setzt dagegen nur nach Stimulation, z. B. durch Zytokine, NO frei. Nach Stimulation produziert die iNOS große Mengen NO. Die induzierbare NO-Synthase iNOS wurde zunächst in Makrophagen entdeckt [67]. Bei experimenteller und auch humaner Nephritis wurde die Expression der NOS II auch in Mesangialzellen und Tubuluszellen beschrieben [31;32;33;36;25]. Das von der iNOS in hohen Konzentrationen bereitgestellte NO ist ein wichtiger Effektor in der unspezifischen Immunabwehr [25;34]. Stimuli für die Expression der iNOS sind proinflammatorische Mediatoren wie Lipopolysaccharide, Tumor-Nekrose-Faktor-alpha, Interleukin–1 und gamma-Interferon. Die iNOS produziert NO über längere Zeiträume und Ihre Aktivität ist abhängig vom extrazellulären L-Arginin-Angebot [35;116]
Die endotheliale NO-Synthase (NOS III, eNOS) findet sich im Gefäßbett. Das von ihr gebildete NO ist ein potenter Vasodilatator [19;27;25;41]. In der Niere beteiligt sich die eNOS an der Zunahme des effektiven renalen Plasmaflusses und an der glomerulären Filtrationsrate. Hieraus resultiert eine Senkung des glomerulären Filtrationsdrucks. Neben diesen Regulations-Mechanismen der renalen Hämodynamik gibt es Hinweise darauf, dass die endotheliale NOS auch eine wichtige Rolle in den antifibrotischen und antiproliferativen Wirkungen des NO spielt. In Kulturen renaler Mesangialzellen konnte gezeigt werden, dass NO die Synthese von Matrixproteinen dosis- und zeitabhängig limitiert [43;44]. Weitere Forschungsarbeiten konnten die proliferationshemmenden Wirkungen des Stickoxid in-vitro belegen [46;47] Diese antifibrotischen Wirkungen sind wahrscheinlich als Folge einer NO-vermittelten Abnahme der Expression des profibrotischen Zytokins TGF-ß zu sehen [45]. Zentrale Kennzeichen chronischer Nierenerkrankungen sind die Zellproliferation sowie die gesteigerte Synthese von Matrixproteinen, so dass die günstigen Wirkungen einer L-Argininingabe über diese endotheliale NOS und der daraus folgenden NO-Generierung vermittelt sein könnten. Diese Hypothese diente der zugrundeliegenden Arbeit als Ausgangspunkt.

1.3 Modell der– Anti-Thy-1-Glomerulonephritis der Ratte

Das Modell der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis der Ratte diente als etabliertes Modell einer akuten mesangioproliferativen Glomerulonephritis [50]. Induziert wird diese Form der Glomerulonephritis durch eine intravenöse Injektion von Antikörpern, die gegen das Thy-1-Epitop von Mesangialzellen gerichtet sind. Diese führen zu einer dosis- und komplementabhängigen Lyse der Mesangialzellen. Andere Nierenzellen sind sekundär nicht betroffen, da in der Rattenniere nur dort das Thy-1-Epitop an der Zelloberfläche exprimiert ist. Die sich anschließende glomeruläre Reaktion gleicht dem Bild einer akuten mesangioproliferativen Glomerulonephritis mit Akkumulation von mesangialer Matrix und Hyperzellularität [51;52;53]. Im Rahmen dieser Erkrankung lassen sich folgende drei Phasen unterscheiden [10]:

- Schädigungsphase:
  Komplementabhängige Lyse der Mesangialzellen und Makrophageninfiltration (maximale Ausprägung 6 bis 18 Stunden nach der Antikörperinjektion)
- Matrixexpansionsphase:
  Proliferation der Mesangialzellen, überschießende Matrixvermehrung und Mikroaneurysmen der glomerulären Kapillaren (ca. 3. bis 14. Tag nach der Antikörperinjektion)
- Ausheilungsphase:
  Regression der glomerulären Veränderungen (ca. 14. Tag bis 6. Wochen nach der Antikörperinjektion)

Die zeitliche Staffelung der Wundheilung macht es möglich, die einzelnen Phasen der Wundheilung spezifisch zu untersuchen. Die Blutdruckunabhängigkeit ist ein Vorteil dieses Modells. Die glomeruläre Schädigung ist immunvermittelt und während der Schädigungs- und Matrixexpansionsphase besteht kein erhöhter systemischer Blutdruck, so dass das Ausmaß der glomerulären Matrixvermehrung im wesentlichen der

Antikörper-induzierten Mesangialzellschädigung zugeschrieben wird.
Dadurch ist dieses Modell besonders geeignet, blutdruckunabhägige Wirkungen auf die glomeruläre Matrixakkumulation zu untersuchen.

1.4 Fragestellung

Ziel der Arbeit war es, die nephroprotektiven Wirkungen der Aminosäure L-Arginin für die chronisch progressive Matrixexpansion bei immun-vermittelter Glomerulonephritis im Hinblick auf ihren NO-Stoffwechsel weiter zu untersuchen. Es wurde die Arbeitshypothese überprüft, ob die günstigen Wirkungen von L-Arginin auf die Überexpression des Zytokins TGF-ß in der normotensiven Anti-Thy-1-Glomerulonephritis der Ratte durch endogen produziertes NO vermittelt werden. Für diese Studie wurden folgende Versuchsansätze durchgeführt:

I. Therapie der Tiere mit einer diätetischen L-Arginin-Gabe
II. Therapie der Tiere mit dem NO-Donator Molsidomin
III. Therapie der Tiere mit einer diätetischen L-Arginin-Gabe und zusätzlich einer niedrig dosierten Gabe des NO-Synthase-Inhibitors L-Nitro-Arginine-Methyl–Esther (L-NAME).

Die Behandlungen begann jeweils 24 Stunden nach Induktion der Glomerulonephritis und wurde sieben Tage **(Protokoll 1)** bzw. zwölf Tage **(Protokoll 2**), bis zur Tötung der Tiere, fortgeführt.
Nach Tötung der Tiere wurden histologische und molekulare Fibrosemarker analysiert. Hierzu wurde die glomeruläre Matrixakkumulation histologisch ausgewertet und die Expression von TGF-β als zentralem Fibrosemediator, Fibronektin als Marker für die Matixproduktion und PAI-1 als Marker für die Matrixdegeneration bestimmt. Darüber hinaus erfolgte die Analyse der NO-Konzentration im Plasma und Urin-Spiegel als Zeichen der endogenen NO-Produktion. Desweiteren wurde der systemische Blutdruck und die Proteinurie der Tiere bestimmt [35;54;55].

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Alle verwendeten Materialien, Chemikalien, und Zellkulturmedien wurden, wenn nicht anders beschrieben, von der Firma Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

2.2 Tierversuch

Die Tierversuche und die damit verbundenen Experimente wurden von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales des Landes Berlin geprüft und genehmigt (Tierversuchsnummer G 0068/00). Alle Eingriffe an lebenden Tieren wurden unter Beachtung des § 9 Abs. 1 und 2 des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Doktorandin arbeitete unter Aufsicht des Betreuers PD Dr. med. Harm Peters, qualifiziert für Eingriffe an lebenden Tieren gemäß dem § 9 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes [56]. Die anfallenden toten Tiere und Tierkörperteile wurden gemäß § 8 Abs. 1 und 2 des Tierkörperbeseitigungsgesetzes vorschriftsmäßig entsorgt [57].

2.2.1 Tiere und Tierhaltung

Für die Tierversuche wurden 104 männliche Wistar Ratten der Firma „Charles River, Sulzfeld, Deutschland“ mit einem Gewicht von 200 bis 270 g verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte zu zweit in einem Käfig bei einem 12 Stunden Tag-/Nachtrhythmus in einem vollklimatisierten Raum. Futter- und Trinkmenge wurden täglich kontrolliert.

2.2.2 Die Anti-Thy-1-Glomerulonephritis – Herstellung des Antikörpers OX-7

Die Zellen der OX-7-Zellinie (Hybridoma Zellen der Firma Center of Applied Microbiology & Research, Saisbury UK) wurden bei –70°C gelagert und zum Ansatz einer Zellkultur zügig unter fließend warmen Wasser aufgetaut. Für die Erstkultivierung wurde zuvor folgendes Kulturmedium vorbereitet: RPMI 1640,

20 % fetales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin. Das Kulturmedium wurde dann den Zellen zunächst tröpfchenweise zugegeben und auf 20 ml aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 3 min bei 2500 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 15 ml Kulturmedium resuspendiert. Dieser Ansatz wurde dann in eine Kulturflasche überführt und bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Jeden zweiten Tag erfolgte eine mikroskopische Kontrolle mit Differenzierung von vitalen und abgestorbenen Zellen mittels einer Vitalfärbung mit Tryptan Blue. Ebenfalls erfolgte eine regelmäßige pH-Wert-Kontrolle. Die Zellen wurden alle zwei Tage passagiert und derartig vermehrt und separiert, dass nach einem Zeitraum von 14 Tagen 16 große Kulturflaschen (100 ml) vorlagen. Der Inhalt dieser Flaschen wurde dann in ein miniPERM-Zellkulturgefäße (Heraeus-instruments, Hanau, Deutschland) überführt. Das Inseminationsvolumen lag bei 35 ml Zellsuspension mit einer Dichte von ca. 0,5 x 10^6 Zellen. Zur Optimierung der Antikörperproduktion wurde nach gutem Wachstum der Inhalt des ersten Kulturmoduls auf 4 Kulturmodule aufgeteilt, wobei die Dichte zu diesem Zeitpunkt im ersten Modul 8 x 10^6 Zellen/ml betrug. Das sich im Versorgungsmodul der Einrichtung befindliche Medium wurde wie oben erwähnt zubereitet, zusätzlich aber noch mit 1,5 ml HEPES-Puffer supplementiert. Zur Gewährleistung einer optimalen Sauerstoffversorgung wurden die 4 Module auf Drehvorrichtungen gelegt, die sich im Brutschrank befanden. Der Mediumwechsel erfolgte während guter Wachstumsphasen der Zellen täglich. Das Abernten aus dem Versorgungsmodul erfolgte bei einer Zellzahl von 11,5 x 10^6 Zellen/ml, wobei jeweils 17 ml aus dem Versorgungsmodul entnommen wurden. Das Volumen wurde mit Kulturmedium wieder aufgefüllt. Das erhaltene Gesamtvolumen an OX-7-haltigem Kulturüberstand betrug 327 ml.

2.2.3 Aufreinigung des Kulturüberstandes

Zur Trennung der Immunglobuline von Fremdeiweißen wurde der Zellkulturüberstand über eine HiTrap-Protein G-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) geleitet. Hierbei wurden ein 20mM Sodiumphophat Binding Puffer (pH 7,0), ein 0,1M Glycine-HCl Elution Puffer (pH 2,7) und eine 1M Tris-HCl-Lösung (pH 9,0) zur Probenrekonstitution

verwendet. Der Kulturüberstand wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min über die Säule geleitet. Am Ende konnten 130 ml Lösung mit einer Immunglobulinkonzentration von 1 mg/ml gewonnen werden. Das Eluat wurde anschließend 24h in PBS dialysiert (Slide-A-Lyzer, Pierce, Rockford, USA), aliquotiert und bei –70°C eingefroren.

2.2.4 Induktion der Glomerulonephritis

Die Tiere erhielten eine i.v.-Injektion des Antikörpers OX-7, diese führt wie in der Einleitung beschrieben zur Auslösung einer Anti-Thy-1-Glomerulonephritis. Jedes Tier erhielt 0,5 mg/kg Körpergewicht in PBS gelösten OX-7. Zur Injektion wurden die Tiere in eine leichte Äther-Narkose versetzt. Nach Desinfektion des Schwanzes wurde den Tieren mit einer 1-ml Spritze die entsprechende Menge des Antikörpergemisches in eine Schwanzvene injiziert. Die Kontrolltiere erhielten eine Injektion des gleichen Volumen PBS.

2.3 Futter

Zur Fütterung der Tiere wurde die Zuchtdiät für Ratten der Firma Altromin Nr. 1311 (Lage, Deutschland) verwandt. Der Caseinanteil betrug 22,5 %. der Eigenanteil von L-Arginin betrug in dieser Futterzusammensetzung 0,87%. Die weitere Zusammensetzung des Futtermehls ist in Abb. 2 dargestellt.

Inhaltsstoffe	Gehalt in %	Zusatzstoffe	Gehalt
Rohprotein	22,50%	Vitamin A	15000 IE
Lysin	1,20%	Vitamin D3	600 IE
Rohfett	5%	Vitamin E	75 mg
Rohfaser	4,50%	Kupfer	5 mg
Rohasche	6,50%		
Calcium	0,90%		
Phosphor	0,70%		

Tab. 1: Zusammensetzung der Zuchtdiät 1311 für Ratten der Firma Altromin, Lage

2.3.1 Wirkstoffe

2.3.1.1 L-Arginin

L-Arginin wurde in Pulverform verwendet und die Aminosäure wurde nach Dosisberechnung (500 mg/die auf 25 mg Futter pro Tier) dem Futter beigemengt. Diese Menge ist vergleichbar mit einer L-Arginin-Donation von 1% im Trinkwasser, einem Zufuhrweg, der am häufigsten in der Literatur verwendet wird. In dieser Arbeit wurde sich für die Futterzufuhr entschieden, da in sich in Vorexperimenten feststellen ließ, dass die Futteraufnahme insgesamt konstanter zwischen die Versuchstieren ist als die Aufnahme über das Trinkwasser.

2.3.1.2 Molsidomin

In dieser Versuchsreihe wurde der NO-Donor Molsidomin verabreicht. Molsidomin ist ein Nitrat-ähnlicher Stoff und zählt pharmakologisch zu den Sydnomininen (zuerst in Sydney synthetisiert). Die mesoionische Verbindung Molsidomin wird in der Leber enzymatisch in 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1) umgewandelt. SIN-1 geht in wäßriger Lösung unter Ringöffnung in N-Morpholino-N-nitrosoaminoacetonitril (SIN-1A) über, das wie Nitroprussid-Natrium und im Gegensatz zu organischen Nitraten NO unter Sauerstoffbeteiligung spontan freisetzt [58]. Es kommt über die Aktivierung der löslichen Guanylylcyclaseylcyclase zu einem Anstieg des cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP) in den Endothelzellen und einer nachfolgenden Gefäßmuskelrelaxation und Vasodilatation. Die Bioverfügbarkeit dieses NO-Donors beträgt 100%, der first-pass-Effekt 50-60% und die Eliminationshalbwertszeit 1,5 h. Molsidomin wird als venöser Vasodilatator - mit höherer Senkung der kardialen Vorlast als der Nachlast - bei chronischer Herzinsuffizienz, Therapie der koronaren Herzkrankheit und Angina pectoris – Zuständen eingesetzt. Eine Toleranzentwicklung entsteht im Gegensatz zu Nitraten nicht. Für die Versuchsreihen mit der NO-Donation wurden Corvaton Tabletten ® (Wirkstoff: Molsidomin) der Firma Höchst, Deutschland, verwendet.

2.3.1.3 N-ω-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME)

L-NAME ist ein kompetitiver Antagonist des L-Arginin. Es hemmt unspezifisch alle drei NO-Synthasen [51;59] und somit die endogene NO-Produktion aus L-Arginin. Einen ausreichend spezifischen Inhibitor für die endotheliale NO-Synthase ist bis dato noch nicht gefunden worden. L-NAME wurde in einer Dosis verabreicht, die, wie zuvor publiziert, den systolischen Blutdruck nicht beeinflusst.
Hierzu sollte noch angemerkt werden, dass die Dosis des NO-Inhibitors in der oben genannten Studie höher lag, als die verwendete Dosis in der vorliegenden Arbeit. In einer anderen Studie wurde eine dosisabhängige Reduktion des cGMP-Spiegels, dem distalen Mediator des NO, nachgewiesen [104].

2.3.2 Wirkstoffzubereitung

Die Tabletten mit dem Wirkstoff Molsidomin wurden zerkleinert und gemahlen. Anschließend wurde in das trockene Futtermehl je nach Therapiegruppe die entsprechende Menge des Wirkstoffs gegeben und ca. 5 min mit einem elektrischen Handrührgerät vermengt. Anschließend wurde unter weiterem Rühren Wasser, ca. 500 ml/kg Mehl, hinzugefügt. Wenn das Mehl gleichmäßig durchfeuchtet war, wurde es ca. 3 min per Hand durchgeknetet und anschießend dünn aufgewalzt. Aus der ca. 1 cm dicken Teigplatte wurden mit Hilfe von Backformen Plätzchen ausgestochen und auf einem Gitter zum Trocknen ausgelegt. Zur Beschleunigung der Trocknung wurden die Gitter in einen gleichmäßigen Luftstrom gebracht. Der Luftstrom wurde durch einen Ventilator erzeugt. Die austretende Luft hatte eine Temperatur von ca. 40°C.
L-NAME ist chemisch instabil und wurde deshalb dem Trinkwasser täglich neu in entsprechender Dosis beigemengt. Molsidomin ist chemisch instabil unter längerem Einfluss künstlichen Lichts [76]. Aus diesem Grund wurde das Futter mit diesem NO-Donor im Dunkeln getrocknet und bei der Fütterung der Tiere eine Abdeckung verwendet.

Wirkstoff	Dosis/die
L-Arginin	500 mg
Molsidomin	10 mg
L-NAME	75 mg

Tab. 2: täglich verabreichte Dosis der Wirkstoffe L-Arginin, Molsdomin und L-NAME in mg

Der Futterverbrauch und die Trinkwassermenge der Tiere wurde in Vorversuchen ermittelt. Die dem Futterteig beigemengten Wirkstoffe basieren auf einem täglichen Futterverbrauch von 25 g pro Tier. Für die Trinkwassermenge wurde im Vorfeld ein durchschnittlicher Verbrauch von 30 ml/Tier pro Tag ermittelt. Diese Wirkstoffdosen wurden auf der Basis vorausgegangener Experimente von Nierenerkrankungen im Tiermodell der Ratte verwendet [62;63;64].

2.4 Studienprotokolle

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Versuchsprotokolle erstellt, die sich lediglich in dem Versuchszeitraum unterscheiden.

2.4.1 Protokoll 1 – Effekte der Behandlung mit L-Arginin, Molsidomin und L-Arginin + L-NAME sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis

Die Behandlung der Tiere mit L-Arginin, Molsidomin und L-Arginin + L-NAME wurde 24h nach Injektion des Anti-Thy-1-Antikörpers - wenn die Mesangialzell-Lyse abgeschlossen ist und eine fibrotische Gewebeantwort anfängt [65] - begonnen. In diesem ersten Studienprotokoll wurden die Tiere sieben Tage nach Induktion der Glomerulonephritis getötet. Nach diesem Zeitraum erreicht die Matrixakkumulation ihren Höhepunkt und mögliche Effekte einer Behandlung können hier am besten betrachtet werden.

2.4.2 Protokoll 2 – Effekte der Behandlung mit L-Arginin, Molsidomin und L-Arginin + L-NAME zwölf Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis

Dieses zweite Versuchsprotokoll orientiert sich an Protokoll 1. Auch hier wurde 24h nach Antikörperinjektion die Therapie begonnen. In diesem ersten Studienprotokoll wurden die Tiere zwölf Tage nach Induktion der Glomerulonephritis getötet. Nach ungefähr zwölf Tagen dieser Glomerulonephritis-Form ist die geschädigte Niere mit Matrixakkumulation und Matrixexpansion als Gewebsantwort auf den Verletzungsstimulus über das Maximum hinaus. Im Anschluss daran beginnt die Ausheilungsphase. Diese zweite Versuchsreihe zum Zeitpunkt der letzten profibrotischen Phase der Gewebsantwort wurde gewählt, um eine „second line of evidence“ zu zeigen und um die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe zu bestätigen.
Die Aufteilung der Tiere in die vier verschiedenen Therapiegruppen ist in der folgenden Tabelle ersichtlich. Diese Aufteilung ist für beide Studienprotokolle identisch.

Normale Kontrolltiere	gesunde Kontrolltiere, Injektion mit PBS (n=4)
GN	Tiere mit Anti-Thy-1-Glomerulonephritis, keine Therapie (n=12)
GN-+L-Arg	Tiere mit Anti-Thy-1-Glomerulonephritis mit 500 mg L-Arginin/die (n=12)
GN+Molsi	Tiere mit Anti-Thy-1-Glomerulonephritis mit 10 mg Molsidomin/die (n=12)
GN+Arg-NAME	Tiere mit Anti-Thy-1-Glomerulonephritis mit 500 mg L-Arginin/die + 75 mg L-NAME (n=12)

Tab. 3: Protokoll 1/Protokoll 2; Aufteilung der Tiere in die verschieden Therapiegruppen

2.5 Versuchsparameter

2.5.1 Messung des systolischen Blutdrucks

Einen Tag vor der Tötung bzw. dem Ende eines Versuches wurden bei den Tieren der systolische Blutdruck gemessen. Die Messung erfolgte mit einem Gerät der Firma Life Science Instruments (Woddland Hills/ California, USA). Der Blutdruck wurde mit einem aufblasbaren Sensor erfasst, der über den Schwanz der Ratte bis ca. 1 cm vor die Schwanzwurzel geschoben wurde. Da der Blutdrucksensor sehr empfindlich für Erschütterung war, wurden die Tiere während der Messung mit einer leichten Äthernarkose betäubt, ausserdem konnte so gewährleistet werden, dass die Tiere nicht durch Stress bedingt falsch hohe Werte aufwiesen. Einige Minuten vor und während der Messung lagen die Ratten auf einem Heizkissen (Stufe 2), um die Schwanzgefäße, an denen die Messung erfolgte, maximal zu weiten. Es wurden jeweils drei Drücke gemessen und der Mittelwert ermittelt.

2.5.2 Urinsammlung

An dem Tag vor der Nierenentnahme wurden die Tiere in metabolischen Käfigen (Metabolic Cage–3701M081 der Firma Tecniplast, Buguggiate, Italien) gehalten. Diese Käfige wurden eingesetzt, um den Urin getrennt von den restlichen Exkrementen aufzufangen. Über einen speziellen Trichter wird der Urin separat gesammelt. Futterreste und Kot fallen in ein weiteres Behältnis. Um eine Kontamination des Urins mit Bakterien zu verhindern, wurden dem Urinauffanggefäß 100 µl Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml, 10.000 µg/ml) hinzugefügt. Nach 24 Stunden wurden die Tiere in ihre alten Käfige zurückgesetzt, die Urinmengen sowie der Trinkwasser- und Futterverbrauch wurden notiert. Der Urin wurde mit 5000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand bei –20°C für die folgenden Messungen eingefroren.

2.5.3 Entnahme der Nieren

Zur Nierenentnahme und zur Gewinnung von Serum wurde wie folgt vorgegangen: Die Tiere wurden mit einer Äthernarkose betäubt. Die Bauchdecke der Tiere wurde mit Alkohol desinfiziert. Anschließend erfolgte mittels einer Schere die Eröffnung der Bauchhöhle durch einen U-förmigen Schnitt, beginnend einen Zentimeter über dem Penis und an beiden Rippenbögen endend. Durch Verdrängung des Darms am Mesenterium nach rechts und Eröffnung des dorsalen Peritoneums mittels zweier Pinzetten wurde die Bauchaorta präpariert und mit einer 27-Gauge-Butterfly-Kanüle punktiert. Mit einer 10 ml Spritze wurde soviel Blut entnommen, bis der Herzstillstand eintrat. Über die in der Aorta verbliebene Kanüle wurde nun solange eiskaltes PBS mit einer 20 ml Spritze injiziert (ca. 5-7 ml), bis es wieder zu einer Herzaktion kam. Anschließend wurden die Vena cava inferior und die Aorta abdominalis in Höhe der Leberunterseite oberhalb des Abgangs der Nierengefäße mit einer Klemme unterbunden, um ein Zurückfließen von Blut aus der oberen Körperhälfte zu verhindern. Anschließend wurde die Vena cava abdominalis mit einer Schere eröffnet, um ein Abfließen des infundierten PBS zu ermöglichen. Mit den restlichen in der Spritze verbliebenden 15 bis 20 ml PBS und einer weiteren 20 ml Spritze PBS wurden die Nieren dann perfundiert. Nachdem die Nieren blutleer waren, wurden sie durch einen Schnitt von den Gefäßen und dem Ureter getrennt und in ein 50 ml Röhrchen mit 4°C kaltem PBS gegeben. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Nieren auf Eis gelagert. Das entnommene Blut wurde bei 3000 U/min für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Zur Durchführung weiterer Messungen wurde das Serum abpipettiert und bei –20°C eingefroren.

2.5.4 Aufarbeitung der Nieren, Isolation der Glomeruli für die Zellkultur

Von den Nieren wurden die Kapsel und das anhängende Fett entfernt und ein Fünftel der Niere zur histologischen Aufarbeitung in Formalin (10 %, neutral gepuffert) gegeben. Der Rest der Nieren wurde mit einer Klinge längs halbiert und das Nierenmark mit einer kleinen Schere herausgeschnitten. Aus den so

gewonnenen vier Nierenhälften wurden durch ein Siebverfahren die Glomeruli isoliert. Dazu wurden die Nierenhälften auf einer Glasplatte, welche auf Eis, lag mit Hilfe einer Klinge zerkleinert. Der so entstandene Gewebebrei wurde auf ein Metallsieb (Maschengröße 160 µm) übertragen und unter Zuhilfenahme eines Glasspatels durch die Maschen des Siebes gepresst. Während des Durchpressens des Nierengewebes wurden die mit Gewebe gefüllten Poren des Siebes immer wieder mit PBS freigespült. Das sich auf dem nächsten Sieb (Maschengröße 125 µm) sammelnde Gewebe wurde mit einem kräftigen Strahl PBS aus einer Spritzflasche (250 ml der Firma Nalgene) zusammengetrieben und ca. 2 min kräftig durchgespült. Das auf dem anschließenden Sieb, Maschenweite 90 µm, aufgefangene Gewebe wurde mit Hilfe der Spritzflasche auf das nächste Sieb mit einer Maschenweite von 71 µm übertragen und mit ca. 300 ml PBS indirekt gespült, um die Glomeruli von den kleinen Gewebstrümmern zu reinigen. Die so gewonnenen Glomeruli wurden in ein steriles 50 ml Röhrchen der Firma Nunc übertragen und für 10 min bei 15000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Die Siebe, die Glasspatel, die Glasplatten, die Klingen, die Scheren und Pinzetten wurden vor der Benutzung bei 120°C für 90 Minuten sterilisiert. Das PBS wurde vor der Verwendung autoklaviert, ebenso wie die Spritzflaschen und die Becher, auf denen die Siebe während der Isolation der Glomeruli ruhten. Die Siebe, Glasspatel , Glasplatten, Klingen, Scheren, Pinzetten und das PBS wurden nach der Sterilisation vor der Benutzung auf eine Temperatur von 4°C gekühlt.

2.5.5 Zellkultur

Nach dem Zentrifugieren wurden der Überstand verworfen und die Glomeruli in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Als Zellkulturmedium wurde DMEM (Dubecco´s modified Eagle Medium) unter Zusatz von 0,1 U/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 25 mM HEPES-Puffer verwendet. Durch Auszählung von 10 µl der resuspendierten Glomeruli unter dem Mikroskop wurde die Anzahl der Glomeruli bestimmt, welche durch das Sieben von jedem Tier gewonnen wurde. Nach dreimaliger Wiederhohlung der Auszählung wurde der Mittelwert gebildet und die Konzentration der Glomeruli für jedes Tier auf den gleichen Wert (ca. 2000 Glomeruli/ml) durch Zugabe von

entsprechenden Mengen Medium eingestellt. Von jedem Tier wurden 3 Kulturen von je 1 ml in einer 24-Loch-Zellkulturplatte angelegt und in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Nach 24 und 48 Stunden wurden die Zellkulturüberstände auf Bakterien- und Pilzwachstum überprüft. Nach 48 Stunden wurden sie abgeerntet und nach Zentrifugation mit 5000 U/min für 5 Minuten bei 4°C nochmals abpipettiert und bei –20°C bis zu weiteren Messungen eingefroren.

2.6 Messung der Krankheitsparameter

Zur Abschätzung der Effektivität der unterschiedlichen Therapien wurde neben dem morphologischen Parameter der Histologie und dem funktionellen Parameter der Proteinurie ebenfalls eine Zellkultur von den Glomeruli der Versuchstiere anlegt. Im Überstand der Zellkultur wurden TGF-β, Fibronektin und PAI-1 bestimmt, da die Expression dieser Proteine mit dem Ausmaß des Krankheitsgeschehens korreliert. Zur quantitativen Bestimmung von TGF-β, Fibronektin und PAI-1 konnte die ELISA-Technik genutzt werden. Die messenger-RNA-Expression dieser Fibroseparameter wurde mit einer RT-Polymerase-Kette-Reaktion (RT-PCR) analysiert. Als Indikatoren für die endogene NO-Synthese wurden Nitrat/Nitrit-Messungen mittels Griess-Reaktion bestimmt. Um die Effekte einer direkten NO-Donation auf glomeruläre Zellen in vitro zu untersuchen, wurde der NO-Donor Diethylenetriamin (DETA) (NONOate) auf gewonnene Glomeruli gegeben und im Überstand die TGF-ß-Produktion mittels ELISA bestimmt. Die histologische Auswertung erfolgte nach einer HE- und PAS-Färbung mikroskopisch mit Hilfe eines Scores-Systems.

2.6.1 Histologie

2.6.1.1 Einbettung und Anfertigung der histologischen Schnitte

Das bei der Nierenentnahme gewonnene Gewebestück wurde bis zur Weiterverarbeitung in Formalin belassen. Innerhalb von 12 Stunden wurden die so konservierten Gewebestücke weiterverarbeitet. In einem Einbettautomaten

erfolgte zunächst die Auswaschung des Fixiermediums, dann über ein Zwischenmedium die Durchtränkung des Gewebes mit Paraffin. Das so vorbereitete Gewebe wurde mit Hilfe von Metallwännchen in kleine Paraffinblöcke gegossen, welche mit den beschrifteten Deckeln der Histokinette abgedeckt wurden. Nach Aushärten der Blöcke auf einer Kühlplatte wurden mit dem Schlittenmikrotom HN 40 der Firma Reichert-Jung 3 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Diese wurden in einem Wasserbad (25°C) aufgefangen, anschließend auf Objektträger übertragen und in einem warmen Wasserbad (46°C) gestreckt. Zur Trocknung wurden die Objektträger für 24 Stunden bei 37°C in einem Wärmeschrank gelagert.

2.6.1.2 Histologische Färbungen

Es wurde eine Färbung mit Perjodsäure-Schiff-Reagenz (PAS) und eine immunhistochemische Anfärbung des Fibrosemarkers TGF-ß1 durchgeführt.

2.6.1.2.1 PAS-Färbung

Bei der PAS-Färbung kommt es zu einer deutlichen Anfärbung der extrazellulären Matrix, was eine quantitative Einschätzung ermöglicht. Die HE-Färbung diente zur Kontrolle der in der PAS-Färbung gesehenen Strukturen. Da die Farbstoffe nur wasserlöslich waren, mussten die Gewebeschnitte zum Färben vom Paraffin befreit werden. Dazu wurden die Objektträger zunächst zwei mal 5 Minuten in Xylol 100% gebracht und anschließend jeweils kurz durch eine absteigende Alkoholreihe (Ethanol 96%, 96%, 80%, 50%, Aqua dest. und Aqua dest.) gezogen. Die so entparaffinierten Schnitte wurden nun für 10 Minuten in 1%ige Perjodsäure gestellt und anschließend 5 Minuten in Leitungswasser gespült. Dann wurden die Schnitte, nachdem sie kurz in Schwefelwasser getaucht wurden, für 20 Minuten in Schiff-Reagenz gestellt und abermals kurz in Schwefelwasser getaucht. Nach 10 Minuten Spülen mit Leitungswasser erfolgte für 10 Minuten die Gegenfärbung mit Hämalaun und anschließend erneutes Spülen in Leitungswasser für 10 Minuten. Die so gefärbten Schnitte wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Aqua dest., Aqua dest, 50% Ethanol, 80%, 96%, 96%, 100%, 100% und 100%) wieder

entwässert. Vor der Eindeckung mit Corbit-Balsam wurden die Schnitte drei mal kurz in Xylol 100% getaucht.

2.6.1.2.2 Immunhistochemische Färbung des Zytokins TGF-ß1

Für das Versuchsprotokoll 1, sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis wurde eine Färbung des Zytokins TGF-ß angefertigt. Zur immunhistologischen Darstellung von TGF-ß1 wurde eine modifizierte APAAP (Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase)-Färbung verwendet. Hierzu wurde zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers ein mit einem Polymer konjugierter Sekundärantikörper benutzt, an welches das für die sichtbare Farbreaktion notwendige Enzym Alkalische Phosphatase mehrfach gekoppelt wurde. Auf diese Weise kann eine Verstärkung des Farbsignales erzielt werden und Antigene, die nur schwach ausgeprägt sind, deutlicher dargestellt werden. Vor der Färbung musste ein TBS (Tris Buffered Saline)-Puffer hergestellt werden. Dazu wurde zunächst eine Stammlösung bestehend aus zwei Komponenten angesetzt: Stammlösung A: Herstellung einer 0,5 M Tris-Lösung, bestehend aus 60,55 g Tris-Base/ 1 l a.dem.. Stammlösung B: Herstellung einer 1,5 M NaCl-Lösung, bestehend aus 87,66 g NaCl/ 1 l a.dem.. Die Stammlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt, vor Gebrauch im Verhältnis 1+1+8 Teile a.dem. angesetzt und mittels 5 M HCl-Lösung auf pH 7,6 eingestellt. Die immunhistologische TGF-ß1-Färbung wurde am Paraffinschnitt in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Es erfolgte zunächst die Entparaffinisierung, das Einbringen der Schnitte in die absteigende Alkoholreihe und Kochen in Zitratpuffer wie oben beschrieben. Dann wurden die Gewebestückchen auf den Objektträgern mit einem Fettstift (DAKO Pen™, DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland) umkreist und in TBS-Puffer eingestellt. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min mit inaktiviertem fetalem Kälberserum (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) (30 min bei 65°C) inkubiert. Es folgte eine 30 minütige Inkubation mit einem polyklonalen Primärantikörper Rabbit-anti-Rat-TGF-ß1 (SantaCruz, Biotechnology, Inc. Heidelberg, Deutschland). Der Antikörper wurde zuvor im Verhältnis 1:25 mit einem Antikörperverdünnungsmedium (1Teil inaktiviertes fetales Kälberserum, 1 Teil RPMI-Medium, 8 Teile a.dest.) verdünnt. Auf den

Objektträgern befanden sich drei Schnitte. Ein Schnitt diente jeweils als Negativ-Kontrolle und wurde anstelle des Primärantikörpers mit Antikörperverdünnungsmedium inkubiert. Nach der Inkubation wurde mit TBS-Puffer gespült. Es folgte eine 30 minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper Goat-anti-Rabbit EnVision™ Alkalische Phosphatase (DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland). Dann wurde erneut mit TBS-Puffer gespült und die Schnitte mit dem Substrat-Chromogen Fast Red (Fast Red Kit, DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland) versetzt. Das Substrat wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt. Die Intensität der Färbung wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Färbedauer betrug 5 min bis zur Entwicklung eines intensiv roten Farbsignals. Die Färbung wurde durch Spülen mit aqua dem. gestoppt. Die Kernfärbung erfolgte in Mayers Hämatoxillin für eine Dauer von 10 min. Abschließend wurden die Schnitte für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und in einem wässrigen Eindeckmedium (ImmuMount™, Shandon, Pittsburgh, USA) luftblasenfrei eingedeckt.

2.6.1.3 Histologische Auswertung

Die mikroskopischen Auswertungen wurden mit einem Lichtmikroskop in einem verblindeten Modus durchgeführt, wie er in anderen Arbeiten bereits publiziert wurde [65]. Dazu wurden jeweils 25 Glomeruli pro Schnitt untersucht. Der prozentuale Anteil der Bereiche des Glomerulus, die von Matrix eingenommen waren wurde von 0-100% bewertet. Von allen pro Schnitt bewerteten Glomeruli wurde anschließend der Mittelwert gebildet. Die Auswertung erfolgte durch einen unabhängigen Untersucher, der über die Gruppenzugehörigkeit nicht informiert war.

2.6.2 ELISA – Enzym Linked Immuno Sorbent Assay

Zum spezifischen Nachweis auch kleiner Mengen von Zytokinen und Proteinen kam die ELISA-Methode [68] zur Anwendung. Bei den verwendeten ELISA handelte es sich um kompetitive ELISA. Eine absorbierende Mikrotiterplatte wurde mit dem zu bestimmenden Antigen beschichtet. Alle freien Bindungsstellen der Mikrotiterplatte wurden zur Verhinderung von

unspezifischer Bindung und Absorbtion des Primärantikörpers oder des Antigens der Probe mit Bovinen Serum Albumin verdeckt. Bei Zugabe der Proben und des Primärantikörpers in die so vorbereitete Platte konkurrierte das Antigen der Probe mit dem Antigen, das an die Platte gebunden hat, um die Bindungsstellen des Primärantikörpers. Bei dem Primärantikörper handelt es sich um einen spezifischen monoklonalen Antikörper gegen das zu bestimmende Protein. Zur quantitativen Bestimmung der Menge an spezifisch gebundenem Primärantikörper muss der Anteil an Antikörpern, der nicht spezifisch oder gar nicht gebunden hat, aus der Platte entfernt werden. Dies geschieht durch mehrmaliges Waschen. Ein Sekundärantikörper, der polyklonal ist und sich gegen den Primärantikörper richtet, ermöglicht es, die spezifischen Bindungen zu detektieren. Der Sekundärantikörper wurde in diesem Fall mit einem Enzym gekoppelt. Dadurch war es möglich, die Menge des gebundenen Sekundärantikörpers anhand des Substratumsatzes zu ermitteln. Unspezifisch oder ungebundene Sekundärantikörper wurden wieder durch Waschen entfernt. Der Umsatz an Substrat ist durch eine Farbentwicklung erkennbar, die sich durch die Messung der Absorbtionszunahme genau bestimmen lässt. Durch die Verwendung von Antigenlösungen mit bekannter Konzentration in einer Standardkurve ist die Konzentration in der Probe berechenbar. Nach dem Prinzip des kompetitiven ELISA zeigten die Proben mit der geringsten Konzentration an dem zu messenden Protein die höchste Extinktion und die Proben mit hohen Konzentrationen entsprechend niedrigere Werte. Die Messung der Extinktion erfolgte mit Hilfe eines Plattenphotometers. Das Softwareprogramm BioLinx 2.10 (Dynatech, Denkendorf, Deutschland) erstellte anhand der gemessenen Extinktionswerte der Standardlösungen eine Standardkurve. Je nach ELISA erfolgte eine lineare oder logarithmische Auftragung der Extinktion auf der X-Achse und der Konzentration auf der Y-Achse, um eine lineare oder sigmoidale Standardkurve zu erzeugen. Mit Hilfe der durch das Programm erzeugten Standardkurve konnte die Konzentration des zu messenden Proteins in der Probe berechnet werden.

2.6.2.1 Transforming growth factor-ß ELISA

Um die Konzentration von TGF-β in unseren Zellkulturüberständen zu bestimmen, kam ein „Human TGF-β Immunoassay–Quantikine R“ der Firma R&D-Systems (Abingdon, UK) zum Einsatz. Dieser Kit enthielt bereits vorbereitete Mikrotiterplatten, die mit einem rekombinantem menschlichen TGF-β-Rezeptor vom Typ II beschichtet waren. Vor dem Messen in der Platte wurde das TGF-β in den Proben aktiviert. Die 250 µl Proben wurden mit 50 µl 1MHCl für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 400 U/min zentrifugiert. Um den pH-Wert in den Proben wieder zu neutralisieren - eine pH-Veränderung würde die Messung negativ beeinflussen - wurden 50 µl 1,2M NaOH/0,5M HEPES nach dem Zentrifugieren zur Probe hinzugegeben. Der Kit enthielt ebenfalls eine Standardlösung (rekombinantes menschliches TGF-β mit einer Konzentration von 2000 pg/ml), die nach Verdünnen mit der im Kit vorhandenen Lösung RD5I die Konzentrationen von 2000 bis 0 pg/ml ergab. Es wurden 200 µl Standard oder aktivierte Probe in die Mikrotiterplatte pipettiert und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach 3 Stunden wurde der Inhalt der Platte verworfen und die Platte gewaschen. Anschließend wurden 200 µl Conjugate-Solution (ein polyklonaler peroxidasegekoppelter Antikörper gegen TGF-β) in jede Vertiefung pipettiert und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nachdem der Platteninhalt erneut verworfen und die Platte gewaschen wurde, konnte das Substrat in die Platte pipettiert und bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert werden. Das Substrat bestand aus zwei im Kit enthaltenen Lösungen, Farblösung A (Hydrogen Peroxide) und Farblösung B (Tetramethylbenzidine), dem eigentlichen Farbstoff. Diese beiden Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 kurz vor Gebrauch gemischt und anschließend wurden 200 µl pro Vertiefung in die Platte pipettiert. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion durch Hinzugabe von 50 µl 1M H_2SO_4 gestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 und 570 nm gemessen. Die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm wurde als Korrekturmessung verwandt. Durch die Subtraktion des bei 570 nm gemessenen Werts von dem bei 450 nm gemessenen Wert wurden die optischen Interferenzen in der Mikrotiterplatte ausgeglichen. Mit Hilfe der

Messung der Extinktionswerte für die Standardkurve ließen sich die Konzentrationen von TGF-β in den Proben berechnen. Gewaschen wurde jeweils mit der im Kit enthaltenen Waschlösung. Diese lag als Konzentrat vor und wurde vor der Verwendung 1:25 verdünnt.

2.6.2.2 Fibronektin ELISA

Zum Beschichten einer absorbierenden Mikrotiterplatte (F96 Maxisorb der Firma Nunc, Wiesbaden) wurde Fibronektin (Fibronectin from rat plasma, F-0653) im Coating-Puffer, bestehend aus 0,2 g Na_2CO_3 und 0,3 g $NaHCO_3$ in 100 ml dH_2O (ph 9,6), gelöst um eine Zielkonzentration von 200 µg/l zu erreichen. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden je 100 µl dieser Lösung pipettiert und zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden alle noch freiliegenden Bindungsstellen der Platte eine Stunde mit BSA Bovines Serum Albumin (BSA) geblockt (10 µg/ml PBST). Nach dem Waschen wurden je 95 µl vorbereitete Probe oder Standard pro Vertiefung für eine weitere Stunde inkubiert. Zur Vorbereitung wurden die Proben je nach zu erwartender Fibronektinkonzentration 1:2 bis 1:8 mit DMEM-Kulturmedium verdünnt, um in den linearen Bereich der Standardkurve zu gelangen. Es wurden jeweils 100 µl verdünnte Probe oder Standard und 100 µl Primärantikörper (Rabbit/Anti-Human, Code No A:0245, der Firma DAKO A/S, Dänemark) mit einer Konzentration von 45 µg/ml eine Stunde in einer nicht absorbierenden Mikrotiterplatte vorinkubiert. Als Standards wurden Fibronektinlösungen mit Konzentrationen von 2667; 1334; 667; 333; 167; 83; 42; 21; 10; 5; 3 und 0 ng/ml eingesetzt. Anschließend wurde erneut gewaschen und eine weitere Stunde mit 100 µl Sekundärantikörper (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG der Firma Dianova, Hamburg, Deutschland) in einer Konzentration von 0,3 µg/ml pro Vertiefung inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurden 200 µl der Substratlösung (o-Phenylenediamine Dihydrochloride Tablet Set, Code No: P-9187) des Sekundärantikörpers pro Vertiefung hinzupipettiert und die Farbintensität mit Hilfe des Platten-Photometers MRX-5000 bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Konzentration in den Proben konnte wie beschrieben anhand der optischen

Dichte der Standards ermittelt werden. Die Darstellung und demzufolge die Auftragung der Extinktion und der Konzentration erfolgte linear. Die Standardkurve zeigte einen sigmoidalen Verlauf. Die Inkubationsschritte und das Blocken der gecoateten Platte erfolgten jeweils bei 37°C, dabei wurden die Platten mit Folie oder einem Deckel abgedeckt. Gewaschen wurde jeweils nach Verwerfen des Inhalts zwei mal mit 400 µl PBST/Vertiefung und zwei mal mit 200 µl PBST/Vertiefung bei 200 U/min auf dem Minishaker der Firma IKA-Labortechnik.

2.6.2.3 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 ELISA

Der Ablauf des PAI-1-Elisa gleicht dem des Fibronektin-Elisa. Eine absorbierende Mikrotiterplatte, Platte 1 (F96 Maxisorb der Firma Nunc, Wiesbaden), wurde mit 100 µl PAI-1 (Rat-PAI-1 der Firma American Diagnostica Inc., Pfugstadt, Deutschland) in einer Konzentration von 100 mg/ml Coating-Puffer beschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden wurde die PAI-1-Lösung verworfen und die Mikrotiterplatte gewaschen. Anschließend wurde die Platte mit 200 µl Blocking-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindungen der folgenden Antikörper zu verhindern. Der Blocking-Puffer bestand aus Bovinem Serum Albumin gelöst in PBST mit einer Konzentration von 5 mg/ml. Nach einer Stunde Blocken wurde erneut der Inhalt verworfen, gewaschen und 95 µl des vorbereiteten Probe-bzw. Standardantikörpergemischs in die Platte 1 übertragen. Zur Vorbereitung der Proben und der Standards wurden diese 1 Stunde vor Übertragung auf die Platte 1 in einer nichtabsorbierenden Mikrotiterplatte mit dem primären Antikörper (Rabbit Anti-Rat PAI-1 IgG der Firma American Diagnostica Inc., Pfungstadt, Deutschland) vorinkubiert. Dazu wurden jeweils 100 µl Probe oder Standard und 100 µl des Primärantikörpers (Konzentration 1 µg/ml) zusammengegeben. Die Proben wurden je nach zu erwartender Konzentration 1:2 bis 1:5 mit DMEM-Kulturmedium verdünnt. Zur Herstellung einer Standardkurve kam das gleiche PAI-1 wie zum Beschichten der Platte 1 zum Einsatz. Durch Verdünnen wurden Lösungen mit den Konzentrationen 741; 445; 267; 160; 96; 58; 35; 21; 12; 8; 5; 3 und 0 pg/µl erreicht. Als der grösste

Teil des Primärantikörpers die Bindungsstellen für PAI-1 an der Platte oder in der Probe besetzt hatte, nach ca.1 Stunde, wurde erneut gewaschen und anschließend 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti Rabbit IgG, der Firma Dianova, Hamburg, Deutschland), Konzentration 0,3 µg/ml, inkubiert. Nachdem der Sekundärantikörper (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG der Firma Dianova, Hamburg, Deutschland) an den Primärantikörper gebunden hatte, nach ca. 1 Stunde Inkubation, wurden nach einem Waschschritt 100 µl des Substrat (o-Phenylenediamine Dihydrochloride Tablet Set, Code No: P-9187) des Sekundärantikörpers hinzupepittiert. Nach 45 Minuten wurde über das Plattenphotometer MRX5000 die Menge des entstandenen farbigen Substrat-Produkts als Absobtion bei 450 nm gemessen werden. Die Konzentration von PAI-1 in den Proben wurde wie beschrieben mit Hilfe einer sigmoidalen Standardkurve berechnet. Die Auftragung der Extinktion erfolgte ebenso linear wie die der Konzentration. Die Inkubationsschritte und das Blocken der gecoateten Platte erfolgten jeweils bei 37°C, dabei wurden die Platten mit Folie oder einem Deckel abgedeckt. Gewaschen wurde jeweils nach dem Verwerfen des Inhalts mit zwei mal 400 µl PBST/Vertiefung und zwei mal 200 µl PBST/Vertiefung bei ca. 200 U/min auf dem Minishaker der Firma IKA-Labortechnik.

2.6.3 Proteinurie

Da bei der Urinsammlung in den metabolischen Käfigen die Trennung der Exkrementbestandteile nicht ganz sauber erfolgte, war die Gefahr der Kontamination mit proteinhaltiger Nahrung relativ groß. Die Bestimmung der Proteinurie wäre damit zu unspezifisch für die Abschätzung des Krankheitsgeschehens gewesen. Es erfolgte deshalb zusätzlich eine Messung der Proteinurie. Zur Bestimmung des Eiweißgehalts im Urin der Tiere wurde die Pyrogallol-Rot-Methode in Mikrotiterplatten-Technik [108] (Fluitest USP, Pyrogallol-Rot-Methode, Firma Biocon, Vöhl, Deutschland) verwendet. Pyrogallol-Rot-Molybdat bilden Komplexe mit anwesenden Proteinen. Diese Verbindung erzeugt einen Farbstoff, der einen Absorptions-Anstieg bis zu 600 nm verursacht. Dieser Absorptions-Anstieg ist direkt proportional zur

vorhandenen Proteinkonzentration. Es wurde eine Standardreihe angefertigt, wobei 50 µl des Standards mit der Proteinkonzentration von 1 g/l mit NaCl verdünnt worden sind, sodass eine Standardreihe von 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1 g/l Proteinkonzentration entstand. 50 µl des gesammelten 24h-Urins wurden mit 50 µl NaCl verdünnt. Von diesem Gemisch wurden 10 µl Probe auf eine nichtabsorbierende Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden 350 µl der gebrauchsfertigen Pyrolgallol-Rot-Lösung des Herstellers auf die Proben und die Standards pipettiert. Nach 10 Minuten erfolgte die Messung der Extinktion der Proben/Standards und des Standards mit Hilfe des Platten-Photometers MRX-5000 bei 570 nm Wellenlänge. Aus den Extinktionswerten konnte die Proteinurie in mg/24h nach unten stehender Formel berechnet werden.

$$\frac{E\ (Probe)}{E\ (Standard)} * 1000 * Harnvolumen\ (l) * Verdünnung$$

Abb. 1: Formel für die Berechnung der Proteinurie in mg/24h

2.6.4 Glomeruläre messenger-RNA-Expression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1

2.6.4.1 Isolation der glomerulären RNA

Die –80° C gelagerten Proben wurden 5 Minuten in einem Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde jeder Probe 200 µl Chloroform hinzugefügt und durch vortexen gemischt. Es erfolgte eine dreiminütige Inkubation bei Raumtemperatur mit anschließendem Zentrifugieren für 15 Minuten bei 14000 rpm (Biofuge, Firma Heraeus, Deutschland) und 4°C. In den Proben entstanden jeweils drei Schichten, von denen die oberste Schicht (RNA-Schicht) vorsichtig in ein neues Tube abpipettiert wurde. Der so gewonnenen RNA wurde 0,5 ml Isopropanol hinzugefügt und dieses Gemisch für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte daraufhin eine ebenfalls 10-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm bei 4°C. Der entstandene Überstand wurde

verworfen und das im Tube verbliebene RNA-Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nochmals bei 14000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wurde unter Sicht des RNA-Pellets abgekippt und das Tube mit dem Pellet fünf Minuten trocknen gelassen. Anschließend wurden je Probe 10 µl DEPC-Wasser dazugegeben und die Probe aufgemischt und danach bei 60° C für 10 Minuten inkubiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Messung der optischen Dichte mit einem Photometer (Firma Dynatech, Hamburg, Deutschland) bestimmt, zur Bestimmung der Reinheit der gewonnenen RNA wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

2.6.4.2 Bestimmung des RNA-Gehaltes und der Qualität

2.6.4.2.1 Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der RNA-Qualität wurde 1 µl des Probengemisches mit 9 µl DEPC-Wasser und 10 µl Loading Buffer auf ein ethidiumbromidgefärbtes, 2%iges Agarosegel aufgetragen und für eine Stunde bei 80mA/80V in der Gelkammer (Max Submarine Unit, HE 99X, Firma Hoefer, Deutschland) unter Mitführung eines 100 bp Markers (Rapidozym, Deutschland) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die RNA-Qualität unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und anhand der Banden beurteilt.

2.6.5 Konzentrationsmessung der RNA mittels Spektrometer

Zur Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der gewonnenen RNA wurde 1µl der RNA Probe mit 99 µl DEPC-Wasser verdünnt und im Photometer (Firma Dynatech, Hamburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 260 nm die Extinktion für Nukleinsäuren gemessen. Das hier verwendete Spektrometer mißt selbständig den Quotienten zwischen DNA- und RNA-Extinktion, um zu überprüfen, ob in der Probe eventuell Spuren von DNA enthalten sind, und gibt eine Ratio an. Eine Ratio zwischen 1,4 und 1,6 wurde als qualitativ gut und rein bewertet. Aus der ermittelten Extinktion der RNA bei 260 nm wurde die Konzentration der RNA in µg/ml nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{E * f * 40}{1000} = RNA$$

Abb. 2: Formel für die Berechnung des RNA-Konzentration in µg/ml

Diese Werte wurden der folgenden RT-PCR zu Grunde gelegt.

2.6.6 RT-PCR

Die PCR ist eine etablierte Methode zur Genanalyse, die es ermöglicht, auch kleine Mengen von DNA zu untersuchen. Von dem zu untersuchenden Genabschnitt werden eine so hohe Anzahl von Kopien angefertigt, so dass das Amplifikat analysierbar wird. Die PCR beruht auf drei wesentlichen Schritten. Als erstes wird die DNA so stark erhitzt, dass sich die beiden Doppelstränge von einander trennen. Dieser Schritt heißt Denaturierung. Anschließend wird die Reaktionstemperatur soweit gesenkt (annealing temperature), dass sich vor bzw. hinter dem zu untersuchenden Genabschnitt jeweils individuelle Primerpaare anlagern können. Primer sind Oligonucleotide, die etwa 15-30 Basenpaare umfassen und als Starthilfe für die Synthese des komplementären Strages benötigt werden. Sie flankieren jeweils die gewünschte Region in der Ziel-DNA. In dem dritten Arbeitsschritt wird die Temperatur auf den otimalen Arbeitsablauf der in die Reaktion eingebrachten DNA-Polymerase eingestellt, die eine komplementäre Kopie des Bereiches zwischen den beiden Primerpaaren anfertigt. Anschließend beginnt der Zyklus von neuem mit der Denaturierung. Dieses Vorgehen ermöglicht eine Verdopplung des Gensegments bei jedem Zyklus.
Die hier verwendete RT-PCR ist eine gängige Methode zu Untersuchung von messengerRNA-Genexpression. Durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) wird die isolierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, da die RNA selbst für die PCR nicht thermostabil genug ist.

2.6.6.1 Reverse Transkriptase-Reaktionen

Die isolierte RNA wurde auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und mit einer Lösung aus 4 µl Magnesiumchlorid, 2 µl PCR-Puffer, 2 µl DEPC-Wasser, jeweils 2 µl der Desoxynukloesidphosphaten von Adenin (dATP), Guanin (dGTP), Cytosin (dCTP) und Thymidin (dTTP), 1 µl des unspezifischen Primer Random Hexamer, 1 µl des RNAse Inhibitors und 1 µl der Murinen Reversen Transkriptase versetzt (alle verwendeten Substanzen analog Hersteller des RT-Kits RNA PCR Core Kit, PE Applied Biosystems, California, USA). Dieser Ansatz wird 10 Minuten bei 25°C, 45 Minuten bei 42°C, 5 Minuten bei 95°C und weitere 10 Minuten bei 0°C im Thermocycler (Trio-Thermoblock, Biometra, Deutschland) inkubiert.

2.6.6.2 PCR

Für die PCR wurde die bei der RT erzeugte cDNA verwendet. Es wurde die relative Menge an cDNA der Gene für TGF-ß, Fibronectin und PAI-1 bestimmt, die eine Aussage darüber erlaubte, wieviel mRNA für das jeweilige Gen in der RNA-Probe enthalten war. Zusätzlich wurde eine semiquantitave Auswertung von Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Dieses Gen gehört zu den sogenannten „housekeeping enzymes“ und wird definitionsgemäß in der immer gleichen Menge exprimiert. Es stellt somit als Maß dafür, wie erfolgreich die RT verlaufen und wieviel cDNA in den einzelnen Proben jeweils vorhanden war. Die PCR (Polymerase-Chain-Reaction) beginnt grundsätzlich mit einer Denaturierung doppelsträngiger DNA zu jeweils zwei Einzelsträngen bei einer Temperatur von 95°C. Als zweiter Schritt erfolgt eine Hybridisierung von im Überschuß vorliegenden Oligonucleotiden, sogenannten Primern, an ihre komplementären Sequenzen bei einer Temperatur von 59°C (für GAPDH) und 64°C (für die Zytokine TGF-ß, PAI-1 und Fibronektin). Dieser Schritt wird auch als „Annealing“ bezeichnet. Als Drittes kommt es bei einer Temperatur von 72°C zu einer komplementären Verlängerung der Einzelstrang-DNA zum Doppelstrang durch die DNA-Polymerase, die die Primer als Startsignale für diesen Vorgang erkennt. Diese drei Zyklusschritte werden zur

Vervielfältigung, der Amplifizierung, der Ziel-DNA bis zu 29 Mal wiederholt. Die Zyklenzahl ist Primer-abhängig, ebenso wie die „annealing-temperature“ und ist aus der Tabelle 5 ersichtlich.
Die cDNA-Probe wurde mit einer Lösung aus Magnesiumchlorid, PCR-Puffer, den jeweiligen Primer-Paaren und der DNA-Polymerase versetzt und nach dem oben erläuterten Prinzip der PCR amplifiziert.

	GAPDH	TGF-ß1	PAI-1	Fibronektin
Sense	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
	CCATCTTCC AGGAGCGAGAT	GGTGGCAGGC GAGAGCGCTGA	CAGCATGTGG TCCAGGCCTCCAAA	GGTCCAAATCG GTCATGTTCCCA
Antisense	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
	GATGACCTTG CCCACAGCCT	GGCATGGTAG CCCTTGGGCT	TGTGCCGCTC TCGTTCACCTCGAT CT	GCCCCAGGTC TGCGGCAGTTGT
cDNA	1µl	1µl	1µl	1µl
10fach TBE-Puffer	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Mg-Cl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
dNTP	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl
DEPC-H2O	11,65 µl	11,65 µl	11,65 µl	11,65 µl
Temperatur-Profil	24 Zyklen	27 Zyklen	27 Zyklen	27 Zyklen
	95°C für 10:00 min	95°C für 10:00 min	95°C für 10:00 min	95°C für 10:00 min
	94°C für 00:30 min	94°C für 00:30 min	94°C für 00:30 min	94°C für 00:30 min
	59°C für 00:30 min	64°C für 00:30 min	64°C für 00:30 min	64°C für 00:30 min
	72°C für 02:00 min	72°C für 02:00 min	72°C für 02:00 min	72°C für 02:00 min
	72°C für 07:00 min	72°C für 07:00 min	72°C für 07:00 min	72°C für 07:00 min
	4°C für 10:00 min	4°C für 10:00 min	4°C für 10:00 min	4°C für 10:00 min

Tab. 4: PCR-Protokolle für GAPDH, TGF-ß, Fibronektin und PAI-1: Sense/Antisense-Sequenzen, Temperaturprofile und Zykluslängen

Anschließend wurde der Probe 8 µl Ladungspuffer (bestehend aus 20% Glycerol, 0,02% Bromphenolblau und DEPC-Wasser) zugesetzt und das Gemisch auf ein 1%iges mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel aufgetragen. Unter Mitführen eines 100 bp Markers (Rapidozym, Berlin, Deutschland) wurde das Amplikon bei 125 Volt 35 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt, wonach die DNA-Banden unter UV-Licht (254 nm) durch Interkalation der DNA mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Dieses Gel wurde anschließend durch einen bildgebenden Dichtemesser (Typhoon® 8600, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) und mit dem Programm „ImageQuant®“ (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg,

Deutschland) semiquantitativ die Banden des Zielgens (TGF-ß, PAI-1, Fibronektin) im Vergleich zum housekeeping enzyme GAPDH analysiert. Die Werte der Dichtemessung für TGF-ß1, PAI-1 und Fibronektin wurden durch die Dichtewerte von GAPDH dividiert. Diese Ratio Zielgen/GAPDH wurde tabellarisch aufgetragen. Für das Zielgen wurde bei den unbehandelten nephritischen Tieren (GN) für die Bestimmung der Quantität der glomerulären Zytokin-Expression ein Wert von 100% angenommen.

2.7 Nitrat/Nitrit-Messung (Griess-Assay)

Nitrat und Nitrit sind die stabilen Oxidationsprodukte des NO. Sie fungieren als Indikatoren der endogenen NO-Synthese [38]. Für die Messung dieser Indikatoren diente die Reaktion nach Griess [10]. Die Sensitivität dieser Reaktion erhöht sich, wenn vor der Messung mittels Reduktase Nitrat zu Nitrit reduziert wird [69]. Analysiert wurden Plasma- und Urinproben der Tiere. Beide Probenarten wurden zuerst mit PBS verdünnt. Die Urinproben wurden im Verhältnis 1:10, die Plasmaproben wurden im Verhältnis 1:3 mit PBS verdünnt. Anschließend wurde 100µl Probenvolumen entnommen und jeweils 40 µl 0,05 mmol/L NADPH (Nicotinamidadenindinucleotidphosphat) und 30 µl 0,05 U des Enzyms Nitrat Reduktase (Boehringer Mannheim Biochemie, Mannheim, Deutschland) in die Urin- und Plasmaproben dazugegeben. Es erfolgte eine 45minütige Inkuabtionszeit bei bei Raumtemperatur. Ausgangssubstanz für die Standardkurve war eine 1M Natriumnitrit – Lösung, die zu einer 100 µM Lösung mittels PBS verdünnt wurde. Durch weitere Verdünnung mit PBS erreichte man verschieden Konzentrationen von 0; 1; 2; 5; 5; 7; 10; 15; 20; 25; und 50 µM Natriumnitrit, die dann als Standard-Proben fungierten. 100 µl dieser Standard-Proben wurden ebenfalls mit 30 µl 0,05 U des Enzyms Nitrat Reduktase (Boehringer Mannheim Biochemie, Mannheim, Deutschland) versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Urin- und Plasmaproben mit 20 µl einer 70%igen Zinksulfat-Lösung versetzt und bei 14.000 U für fünf Minuten zentrifugiert. Daraus resultiert eine Proteinfällung, die die Sensitivität der Messung erhöht, da noch vorhandene Eiweiße die optische Dichtemessung stören können. 100 µl der Proben und der Standard-Proben wurde auf eine nichtabsorbierende Mikrotiterplatte aufgetragen und anschließend auf jede

Probe 100 µl Griess-Reagenz pipettiert. Griess-Reagenz besteht aus zwei gleichen Anteilen Griess-I-Lösung (0,05% N-(1-naphtyl)ethylendiamin-Dihydrochlorid) und Griess-II-Lösung (0,5% Sulfanilamid in 45% eiskalter Essigsäure), die erst unmittelbar vor dem Aufbringen auf die Urin- und Plasmaproben, zur Griess-Reagenz zusammengemischt werden. Dann erfolgt eine 10minütige Inkubation in Dunkelheit. Bei 570 nm konnte mittels des Plattenphotometer MRX5000 (Dynex Technologies, Frankfurt am Main, Deutschland) die Menge des entstandenen farbigen Substrat-Produkts als Absobtion gemessen werden. Die Konzentration in den Proben wurde anhand der optischen Dichte der Standards ermittelt.

2.8 Effekte des NO auf die glomeruläre TGF-ß-Produktion in vitro

Um die direkten Einflüsse von NO auf die Produktion des Zytokins TGF-ß in vitro zu untersuchen, wurden Glomeruli von zwei normalen, gesunden Tieren und Glomeruli von drei unbehandelten, nephritischen Tieren, (Tag sieben nach Injektion des OX-7 Antikörpers in einer Dosis von 0,5 mg/kg KG) in DMEM Kulturmedium bei einer Dichte von 2000/ml resuspendiert. Der NO-Donor Diethylenetriamin (Halbwertszeit bei 37°C: 20 h; DETA NONOate, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI USA) wurde in ansteigenden Konzentration diesen kultivierten Glomeruli zugesetzt: 0 (Kontrolle), 10, 50, 100, 500 µmol/l. diese Konzentrationen wurden auf Grundlage vorangegangener Arbeiten gewählt [103]. Anschließend wurden die Glomeruli 48 Stunden bei 37°C/5% CO2 inkubiert. Danach wurden der Überstand gesammelt und bei – 20° C bis zur Analyse der TGF-ß-Produktion gelagert. Es wurden jeweils drei Proben von jedem Tier analysiert. Die TGF-ß-Produktion wurde wie oben beschrieben anhand des TGF-ß-ELISA analysiert.

2.9 Statistische Auswertung

Die Versuchsergebnisse wurden je Gruppe als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Die Auswertung wurde mit dem SPSS Software-Programm vorgenommen. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung einer ANOVA-Prozedur und anschließendem t-Test mit Bonferroni Korrektur für Mehrfachtestung. Ein p-Wert von <0,05 wurde als signifikant gewertet. Die Daten der mRNA-Exprimierung wurden mit Man-Whitney-U-Test ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Protokoll 1 Effekte der Behandlung mit L-Arginin, Molsidomin und L-Arginin + L-NAME sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis

3.1.1 Gewichtsverhalten

Bis zum Tag der Nierenentnahme erreichten die Versuchstiere folgendes Gewicht:

Gruppe	Gewicht in g
Gesunde Kontrollen	265 ± 24
GN	259 ± 23
GN-Arg	267 ± 25
GN-Arg-NAME	268 ± 20
GN-Molsi	245 ± 11

Tab. 5: Mittleres Körpergewicht in g der Gruppen in Versuchsprotokoll 1; In der ANOVA-Prozedur zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den Gewichten der einzelnen Gruppen. P=NS für alle Gruppen

3.1.2 Aufgenommene Dosen von L-Arginin, Molsidomin und L-NAME

Über den täglich dokumentierten Futter- und Trinkwasserverbrauch wurden die tatsächlich aufgenommenen Medikamentendosen mg/Tier/Tag berechnet.

3.1.2.1 L-Arginin

Alle Tiere wurden mit dem oben beschriebenen Futter gefüttert. Da das Futter per se einen L-Arginin-Anteil von 0,87% enthält, ist die Menge an aufgenommenen L-Arginin höher, als die täglich dazugegebene Dosis.

Auch die gesunden Kontrolltiere und die Tiere, die mit Molsidomin behandelt wurden haben die Aminosäure durch das Futter aufgenommen. Die gesunden Kontrolltiere nahmen 218 ± 0,0 mg/die auf. Bei den nephritischen Tieren nahmen die unbehandelte Gruppe (GN) 212 ± 4 mg/die und die Tiere mit einer NO-Donation mittels Molsidomin 218 ± 0,0 mg/die zu sich.
Die Tiere mit Arginin-Supplementation und die Versuchsgruppe mit L-Arginin und L-NAME erreichte eine L-Arginin Aufnahme von jeweils 677 ± 19 mg/die (GN-Arg) und 625 ± 43 mg/die (GN-Arg-NAME).

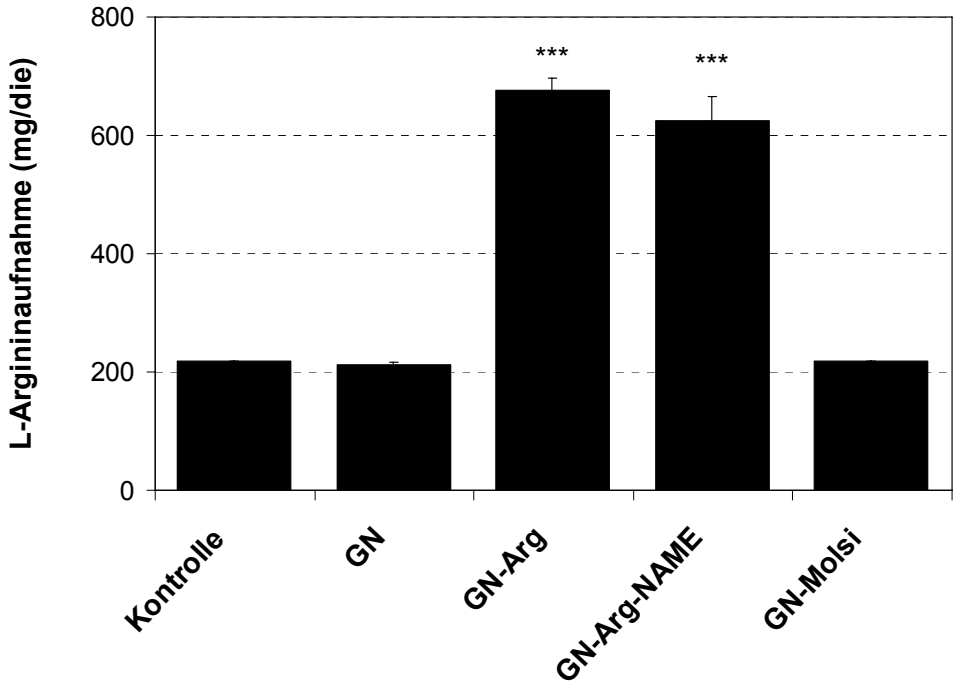

Abb. 3: Protokoll 1: Dosis der diätetischen L-Arginin-Zufuhr in mg/die; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. ***P< 0,001 vs. Kontrolle, GN und GN-Molsi

3.1.2.2 L-NAME

Für die die Tiere der Therapiegruppe mit L-Arginin kombiniert mit dem NO-Synthase-Hemmer L-NAME wurde eine tägliche Aufnahme von L-NAME in Höhe von 2,6 ± 0,3 mg/Tier erzielt.

3.1.2.3 Molsidomin

Die Gruppe der Tiere, denen der NO-Donor zugeführt wurde, nahm eine Menge an Molsidomin in Höhe von 10,0 ± 0,2 mg pro Tier und Tag ein.

3.1.3 Systolischer Blutdruck

Die gesunden Kontrollen, die eine PBS-Injektion erhielten, hatten ebenso einen normalen Blutdruck (123 ± 5 mmHg) wie die nephritischen Kontrollen (125 ± 3 mmHg), die eine OX-7-Injektion erhalten haben. Die Gabe von L-Arginin, Molsidomin oder L-Arginin + L-NAME hatte keinen signifikanten Effekt auf den Blutdruck.

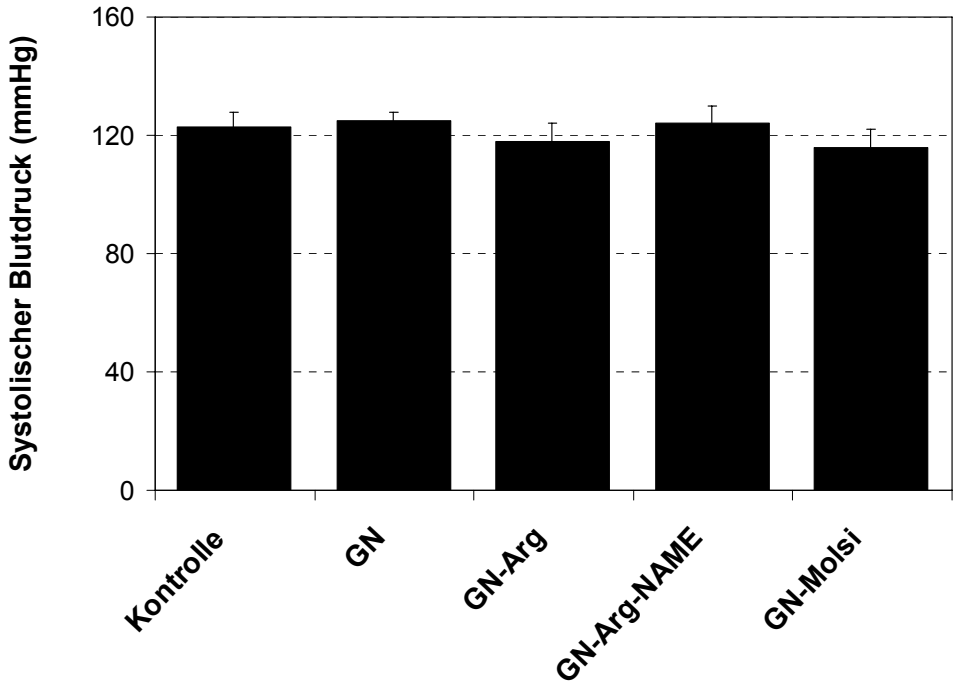

Abb. 4: Protokoll 1: Effekte der Behandlung auf den systolischen Blutdruck; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion.

3.1.4 Glomerulärer Matrixgehalt

Auch auf den glomerulären Matrixgehalt nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis hatte die Gabe von L-Arginin, NO-Donation und L-Arginin +

NOS-Inhibitor L-NAME einen Einfluss. Gesunde Kontrolltiere (Kontrolle) erreichten einen glomerulären Matrixgehalt von 21,4 ± 1,2 %, während bei nephritischen Tieren (GN), denen keinerlei Behandlung zukam, einen Matrixgehalt von 76 ± 1,7 % gemessen wurde. L-Arginin-Gabe und auch die NO-Donation mit Molsidomin reduzierten diesen glomerulären Matrixgehalt (GN-Arg: 67,1 ± 3,9 %; GN-Molsi: 62,7 ± 2,0 %). Bei Tieren mit der Kombinationbehandlung aus L-Arginin + NOS-Inhibitor L-NAME (GN-Arg-NAME) wurde ein Matrixgehalt von 74,6 ± 2,5 % gemessen.

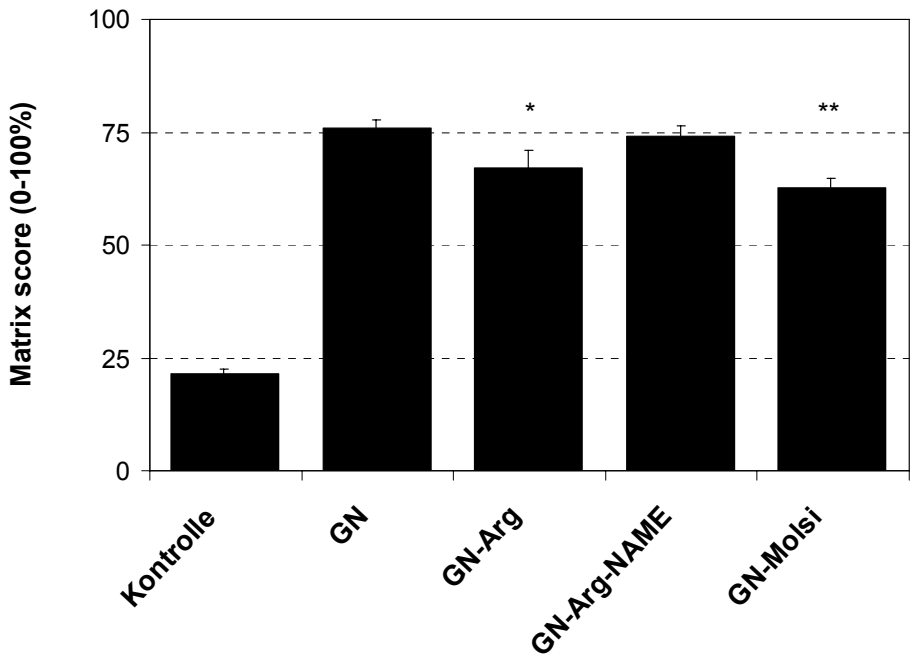

Abb. 5: Protokoll 1: Effekte auf den glomerulären Matrixgehalt; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. * P < 0.05 vs. GN, ** P < 0,01 vs. GN

3.1.5 Glomeruläre TGF-ß-Produktion

Verglichen mit unbehandelten nephritischen Tieren (GN; 1023 ± 71 pg/ml) reduzierten die Gaben von L-Arginin und Molsidomin signifikant die TGFß-

Produktion der kultivierten Glomeruli. Glomeruli der Tiergruppe mit erhöhter L-Arginin-Zufuhr (GN-Arg) zeigten eine eine TGF-ß-Produktion von 522 ± 66 pg/ml. Bei Tieren der Gruppe, die mit der NO-Donation via Molsidomin (GN-Molsi) behandelt wurden, wurde eine Konzentration von 629 ± 34 pg/ml an Transforming growth factor-ß gemessen. Die Gabe des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME unter gleichzeitiger L-Arginin-Gabe (GN-Arg-NAME) dagegen zeigte wieder einen Anstieg der TGFß-1-Produktion auf 967 ± 46 pg/ml. Die gesunden Kontrolltiere (Kontrolle) zeigten eine TGF-ß-Konzentration von 30 ± 16 pg/ml.

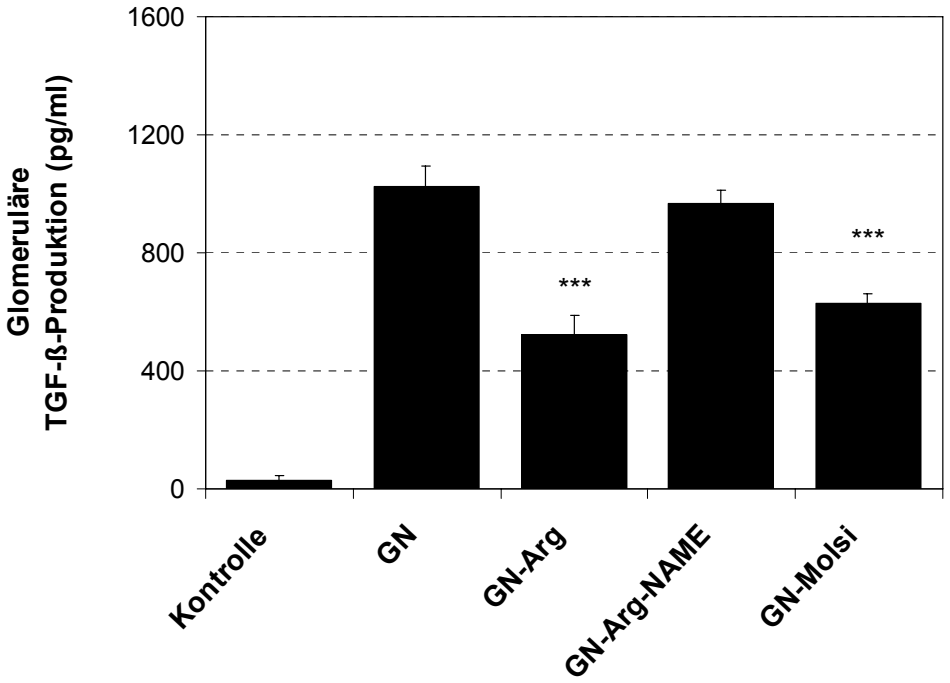

Abb. 6: Protokoll 1: Effekte auf die glomeruläre TGF-ß-Produktion; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. *** $P < 0.001$ vs. GN

3.1.6 Glomeruläre Fibronektin-Produktion

Die Messungen der Fibronektin-Konzentration im Zellkulturüberstand zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede. Die unbehandelten nephritischen Tiere (GN) zeigten eine Fibronektin-Konzentration von 23,3 ± 1,2 µg/ml. Gesunde Kontrolltiere (Kontrolle) erreichten eine Konzentration von 4,3 ± 0,5 µg/ml. Auch hier reduzierten L-Arginin (GN-Arg; 16,4 ± 1,2 µg/ml) und Molsidomin (GN-Molsi; 15,8 ± 1,0 µg/ml) die Produktion von Fibronektin. Auch hier zeigte die kombinierte Gabe von L-Arginin und L-NAME (GN-Arg-NAME; 23,4 ± 1,2 µg/ml) einen Anstieg der gemessenen Konzentration.

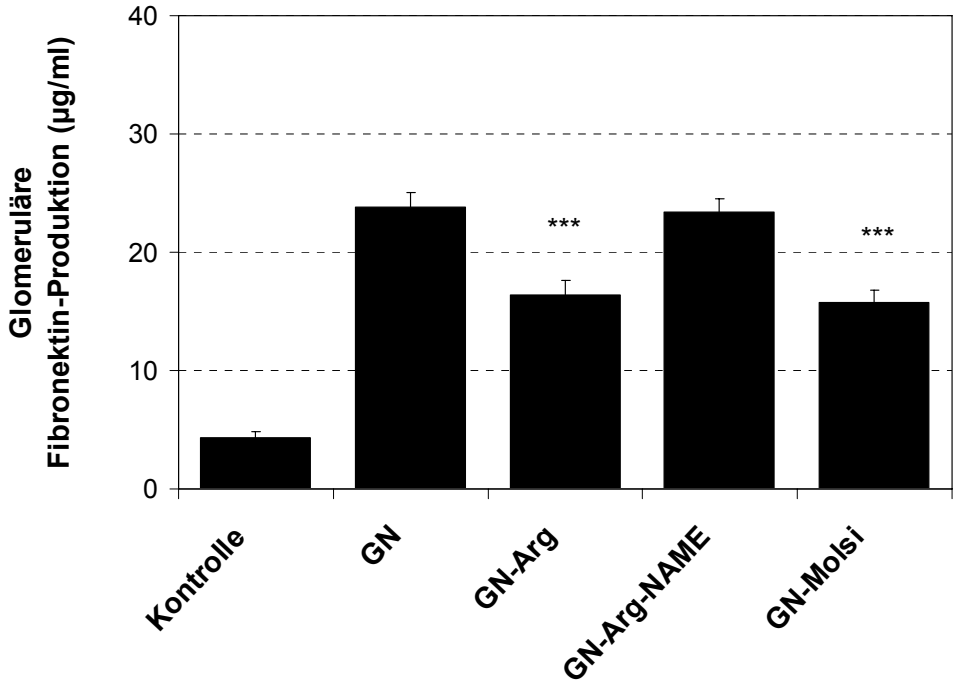

Abb. 7: Protokoll 1: Effekte auf die glomeruläre Fibronektin-Produktion; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. *** $P < 0.001$ vs. GN

3.1.7 Glomeruläre PAI-1-Produktion

Bei der PAI-1-Konzentration im glomerulären Kulturüberstand zeigten sich ebenfalls Unterschiede innerhalb der Therapiegruppen. Bei gesunden Kontrolltieren (Kontrolle) wurde eine PAI-1-Konzentration von 439 ± 62 ng/ml gemessen. Nephritische, unbehandelte Tiere (GN) dagegen erreichten eine Konzentration von 1060 ± 93 ng/ml. Die Arginin-Supplementation (GN-Arg) sowie auch die Molsidomin-Gabe (GN-Molsi) verringerten die PAI-1-Produktion auf 757 ± 43 ng/ml bzw. 723 ± 64 ng/ml.
Auch hier zeigten die Tiere mit kombinierter L-Arginin- und L-NAME-Gabe (GN-Arg-NAME) einen Anstieg der PAI-1-Konzentration auf 953 ± 69 ng/ml.

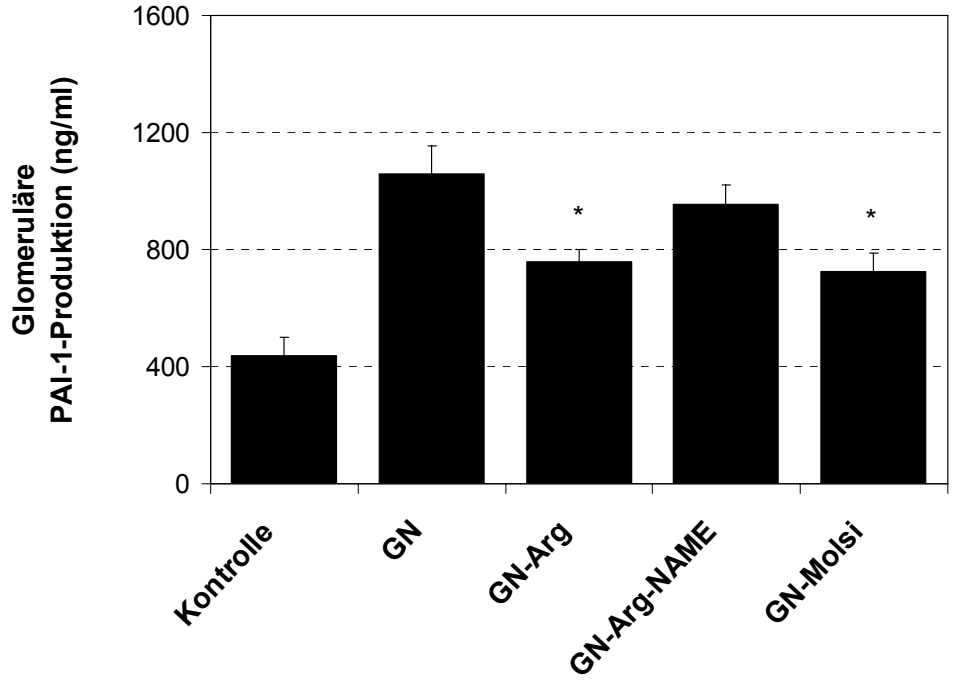

Abb. 8: Protokoll 1: Effekte auf die glomeruläre PAI-1-Produktion; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. * $P < 0.05$ vs. GN

3.1.8 Proteinurie

Im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren (Kontrolle: 13 ± 2 mg/24h) stieg die Proteinurie bei den unbehandelten, nephritischen Tieren an (GN: 48 ± 5 mg/24h). In den behandelten Tiergruppen wurde die Proteinurie jedoch nicht signifikant erhöht durch Gabe von L-Arginin (GN-Arg: 62 ± 7 mg/24h), Molsidomin (GN-Molsi: 48 ± 6 mg/24h) oder L-Arginin + L-NAME (GN-Arg-NAME: 64 ± 6 mg/24h).

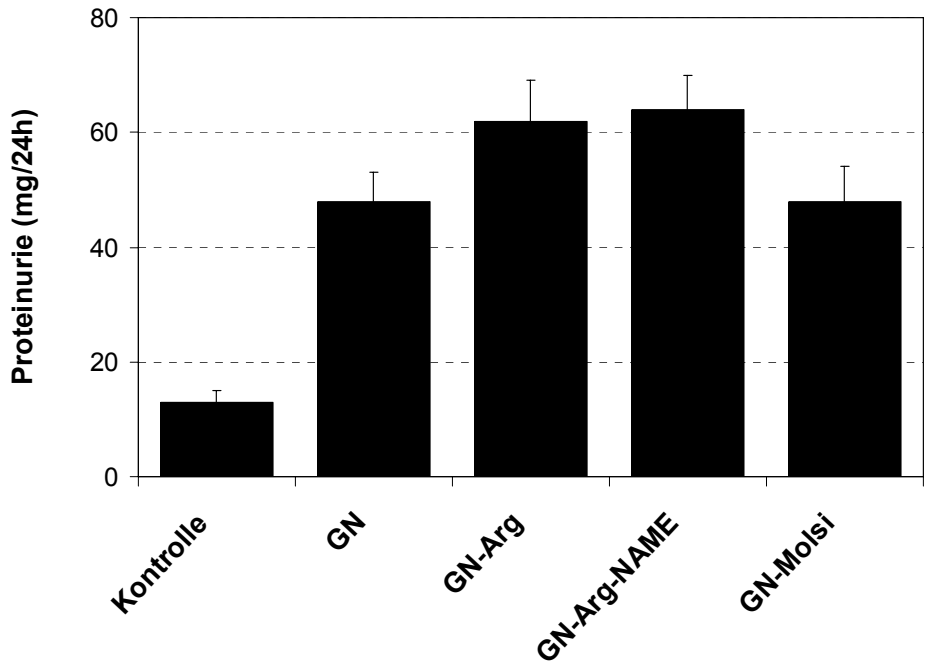

Abb. 9: Protokoll 1: Effekte auf die Proteinurie; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. P=NS GN vs. GN-Arg, GN-Arg-NAME, GN-Molsi (ANOVA)

3.1.9 mRNA-Expression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1

Das Muster der glomerulären messenger RNA-Expression von TGF-ß, Fibronektin und PAI-1 folgte dem Muster der oben dargestellten Protein-

Expression. Die mRNA-Expression wurde für das housekeeping-enzyme GAPDH korrigert und in Prozent gemessen. Die unbehandelten nephritischen Tiere wurden mit 100%-mRNA-Expression gleichgesetzt (GN: 100%).

3.1.9.1 Glomeruläre mRNA-Expression von TGF-ß1

Im Vergleich dazu zeigte sich eine TGF-ß1-Expression bei mit Arginin behandelten Tieren (GN-Arg) von 68 ± 8%, bei NO-Donation mit Molsidomin (GN-Molsi) 63 ± 8% und bei Kombination L-Arginin + L-NAME (GN-Arg-NAME) 105 ± 14%. Bei den gesunden Kontrollen (Kontrolle) fand sich eine mRNA-Expression von 35 ± 5%

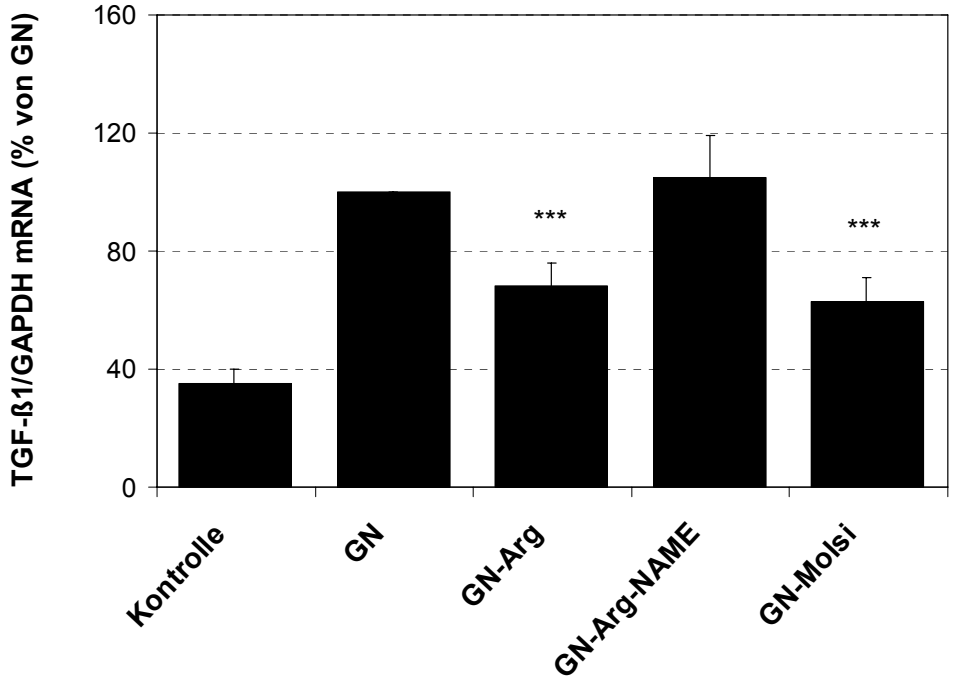

Abb. 10: Protokoll 1: Effekte auf die mRNA-Expression von TGF-ß1 relativ zur mRNA-Expression von housekeeping gene GAPDH; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. ***P < 0,001 vs. GN

3.1.9.2 Glomeruläre mRNA-Expression von Fibronektin

Auch für die glomeruläre mRNA-Expression von Fibronektin ergaben sich signifikante Unterschiede. Die Kontrolltiere (Kontrolle) zeigten eine Fibronektin-mRNA-Expression von 13 ± 1%. Bei den mit Arginin behandelten Tieren (GN-Arg) wurde eine Fibronektin-mRNA-Expression von 62 ± 5%, bei NO-Donation mit Molsidomin (GN-Molsi) 63 ± 6% und bei Kombination L-Arginin + L-NAME (GN-Arg-NAME) 90 ± 10% gemessen.

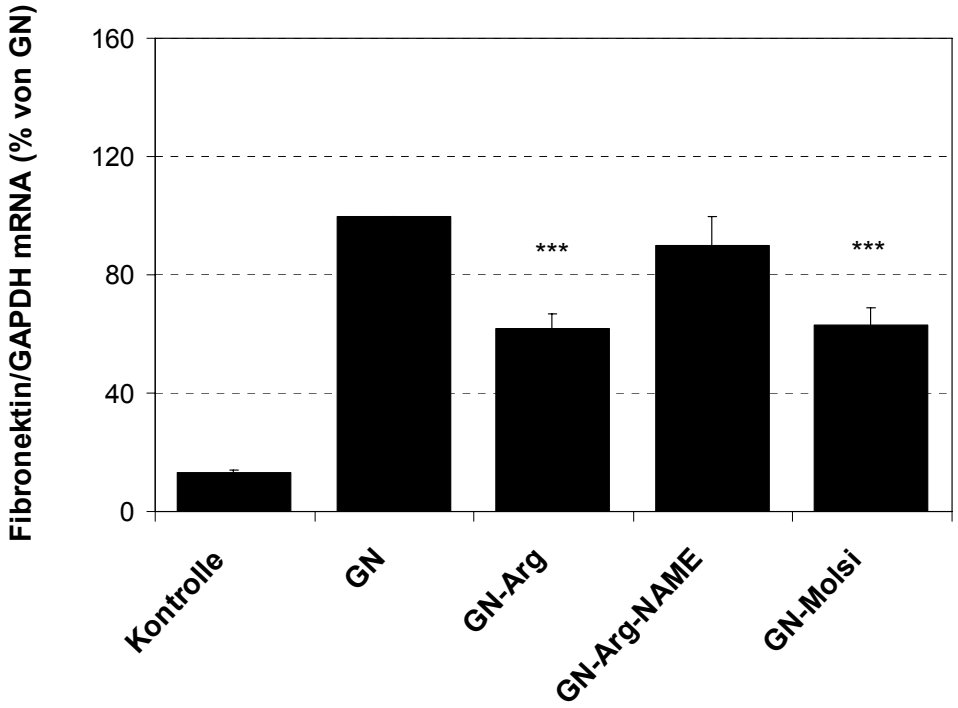

Abb. 11: Protokoll 1: Effekte auf die mRNA-Expression von Fibronektin relativ zur mRNA-Expression von Housekeeping gene GAPDH; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. ***P < 0,001 vs. GN

3.1.9.3 Glomeruläre mRNA-Expression von PAI-1

Die glomeruläre mRNA-Expression von PAI-1 zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Therapiegruppen. Arginin-behandelte Tiere (GN-Arg) zeigten eine Expression von 81 ± 7%. Die mit Molsidomin (GN-Molsi) behandelten Tiere wiesen eine mRNA-Expression von 75 ± 4% auf und bei Kombinationsgabe L-Arginin + L-NAME (GN-Arg-NAME) wurde eine Fibronektin-mRNA-Expression von 109 ± 17% gemessen. Die gesunden Tiere (Kontrolle) zeigten eine mRNA-Expression von 11 ± 1%.

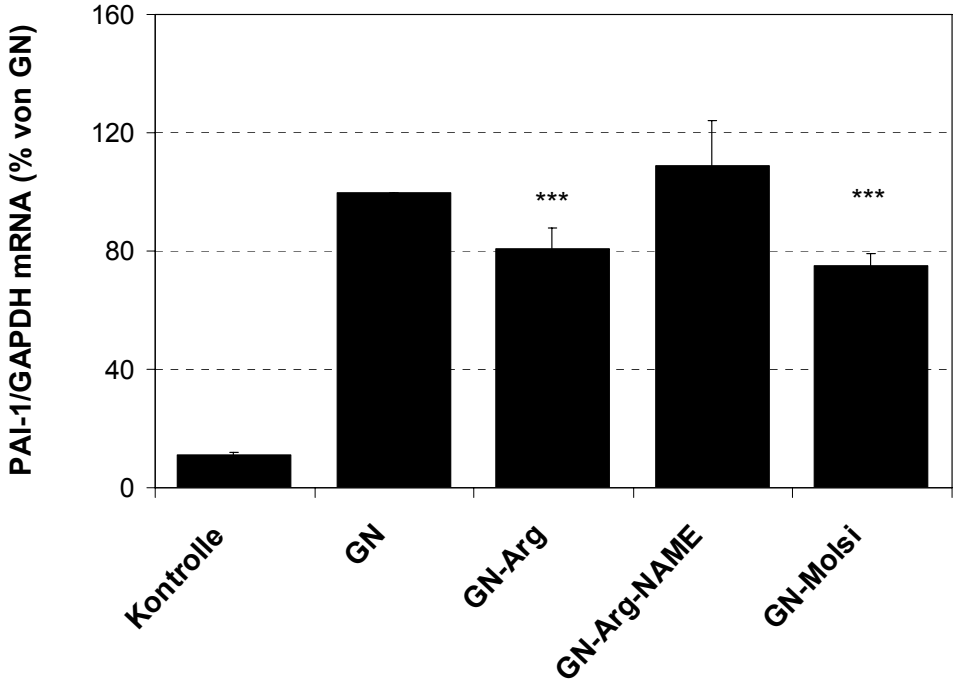

Abb. 12: Protokoll 1: Effekte auf die mRNA-Expression von PAI-1 relativ zur mRNA-Expression von Housekeeping gene GAPDH; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. ***P < 0,001 vs. GN

3.1.10 $NO2^-/NO3^-$ im Plasma

Die Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis hatte keinen signifikanten Effekt auf die Plasma NOx-Produktion. Die gesunden Kontrolltiere (Kontrolle) zeigten 33 ± 4 nmol/ml, während auch bei den nephritischen Tieren, die keinerlei Behandlung bekamen, 36 ± 2 nmol/ml gemessen wurden. Auch bei der Gabe von L-Arginin (GN-Arg: 39 ± 4 nmol/ml) oder kombiniert mit L-NAME (GN-Arg-NAME: 36 ± 3 nmol/ml) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (P=NS vs. GN und Kontrolle). Im Kontrast dazu konnte durch die NO-Donation via Molsidomin (GN-Molsi) ein signifikanter Anstieg der NOx-Produktion auf 56 ± 8 nmol/ml gemessen werden.

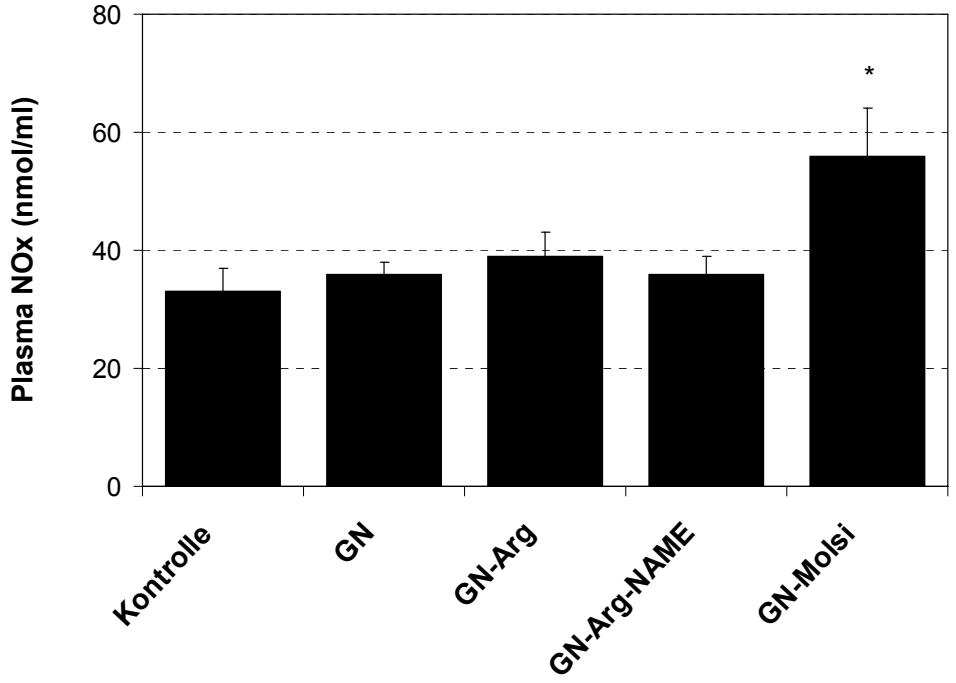

Abb. 13: Protokoll 1: Effekte auf die NOx-Spiegel im Plasma; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN) Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. *P < 0,05 vs. GN

3.1.11 $NO2^-/NO3^-$ im Urin

Auch auf die NOx-Spiegel im Urin wurde allein durch Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis keine signifikanter Effekt nachgewiesen. Hier zeigten die gesunden Kontrolltiere (Kontrolle) 14 ± 0,54 µmol/24h und die nephritischen Tieren 13,9 ± 1,58 µmol/24h. Nach Gabe von L-Arginin (GN-Arg: 18,11 ± 2,73 µmol/24h) und auch L-Arginin kombiniert mit L-NAME (GN-Arg-NAME: 15,8 ± 2,28 µmol/24h) wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen (P=NS vs. GN und Kontrolle). Die Tiere mit NO-Donation via Molsidomin (GN-Molsi) dagegen zeigten einen signifikanten Anstieg der NOx-Produktion auf 29,27 ± 3,73 µmol/24h.

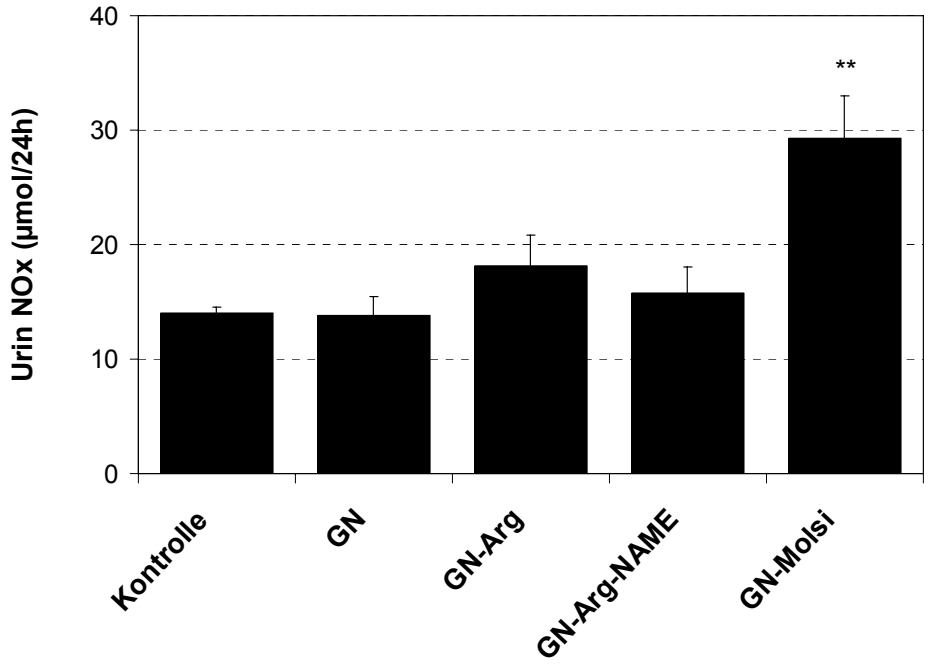

Abb. 14: Protokoll 1: Effekte auf die NOx-Spiegel im Urin; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. **P < 0,01 vs. GN

3.1.12 Effekte von NO auf die glomeruläre TGF-ß-Produktion in vitro

Der Effekt des NO-Donors DETA NONOate in vitro wurde in kultivierten Glomeruli gesunder Kontrolltiere und nephritischer, unbehandelter Tiere sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis analysiert. In beiden Fällen zeigte die Gabe von steigenden NO-Konzentrationen einen Abfall der glomerulären TGF-ß-Produktion innerhalb von 48 Stunden. Dieser Effekt war dosisabhängig.

3.1.12.1 Effekt von NO auf die glomeruläre TGF-ß-Produktion gesunder Kontrolltiere in vitro

Bei den gesunden Kontrolltieren (Kontrolle) reduzierte die Gabe von jeweils 10, 50, 100 und 500 µmol DETA NONOate die TGF-ß-Synthese um 18%, 43%, 63% und 68%.

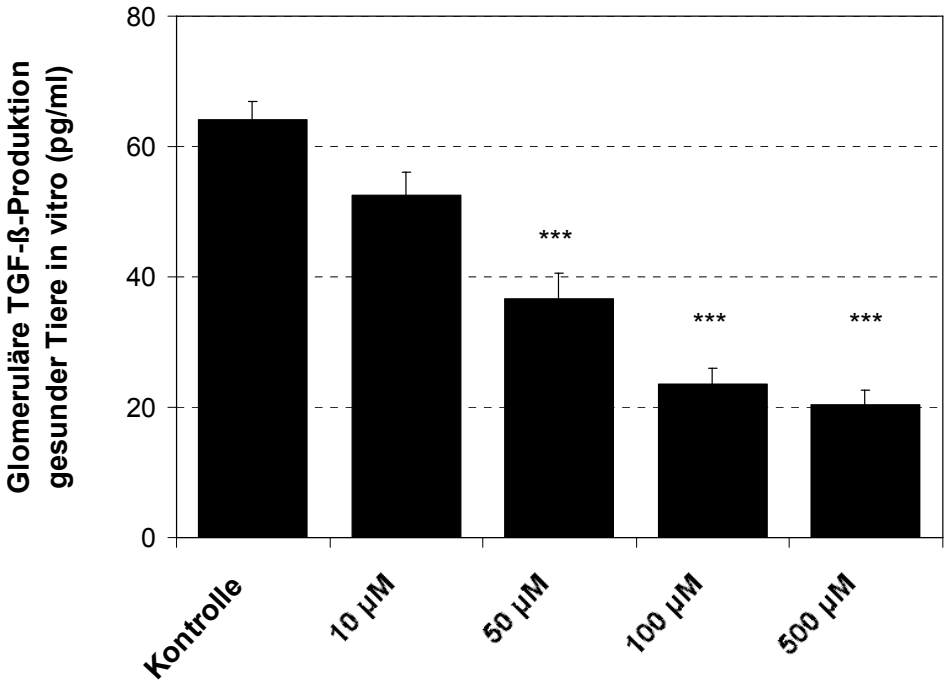

Abb. 15: Protokoll 1: Effekte der NO-Donation mittels DETA NONOate in ansteigenden Konzentrationen auf die TGF-ß-Produktion in vitro auf kultivierte Glomeruli gesunder Tiere. Die Kontrolle erhielt kein DETA NONOate. ***P < 0,001 vs. GN

3.1.12.2 Effekt von NO auf die glomeruläre TGF-ß-Produktion nephritischer Tiere sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis in vitro

Für die nephritischen Tiere (GN) wurde eine Reduktion der TGF-ß-Produktion durch die Gabe von jeweils 10, 50, 100 und 500 µmol DETA NONOate um jeweils 1%, 12%, 18% und 38% gezeigt.

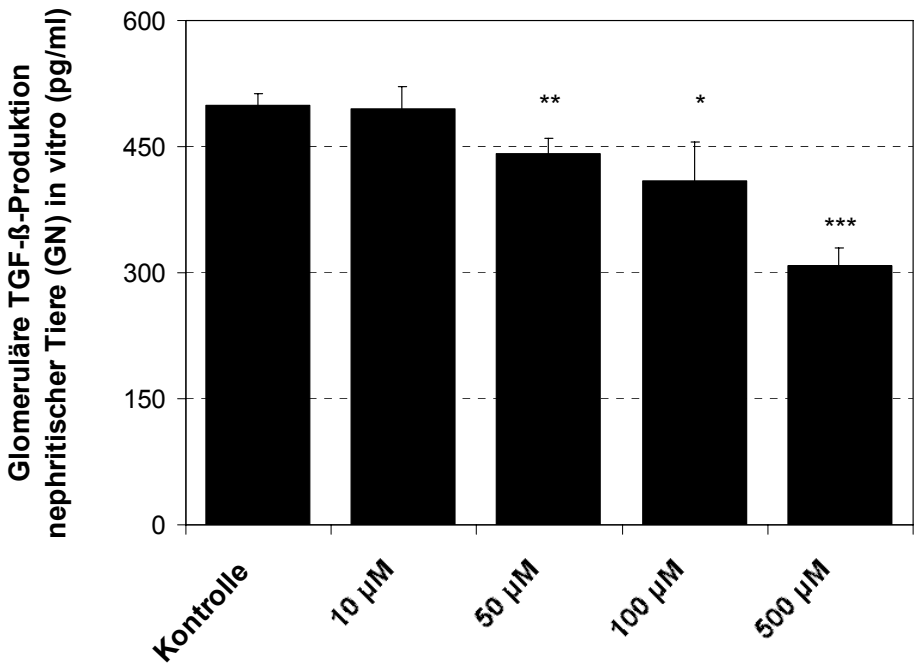

Abb. 16: Protokoll 1: Effekte der NO-Donation mittels DETA NONOate in ansteigenden Konzentrationen auf die TGF-ß-Produktion in vitro auf kultivierte Glomeruli nephritischer Tiere sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephrits. Die Kontrolle erhielt kein DETA NONOate. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 vs. GN

3.1.13 Immunhistochemische Färbung von TGF-ß1-Protein sieben Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis

Als Nachweis des renalen TGF-ß1-Proteins wurde eine immunhistochemische Färbung sieben Tage nach Induktion der Glomerulonephritis vorgenommen. Die folgenden Abbildungen zeigen eine charakteristische Färbung des renalen TGF-ß1 Proteins Abbildung (A) zeigt die Färbung bei normalen, gesunden Kontrolltieren (Kontrolle). Bild (B) zeigt die TGF-ß1-Färbung bei unbehandelten nephritischen Tieren (GN), (C) die Gabe von L-Arginin (GN-Arg), (D) die kombinierte Behandlung L-Arginin und L-NAME (GN-Arg-NAME) und (E) die NO-Donation mit Molsidomin (GN-Molsi). Die Bilder (B)/(GN) und (D)/(GN-Arg-NAME) zeigen eine erhöhte Anfärbung des Fibrosemarkers, während – verglichen mit den Abbildungen in (C)/(GN-Arg) und (E)/(GN-Molsi) – eine deutlich niedrigere Färbungsintensität gezeigt wird. Die gesunden unbehandelten Tiere (A)/(Kontrolle) weisen dagegen fast kein rötliches Färbungsmuster auf.

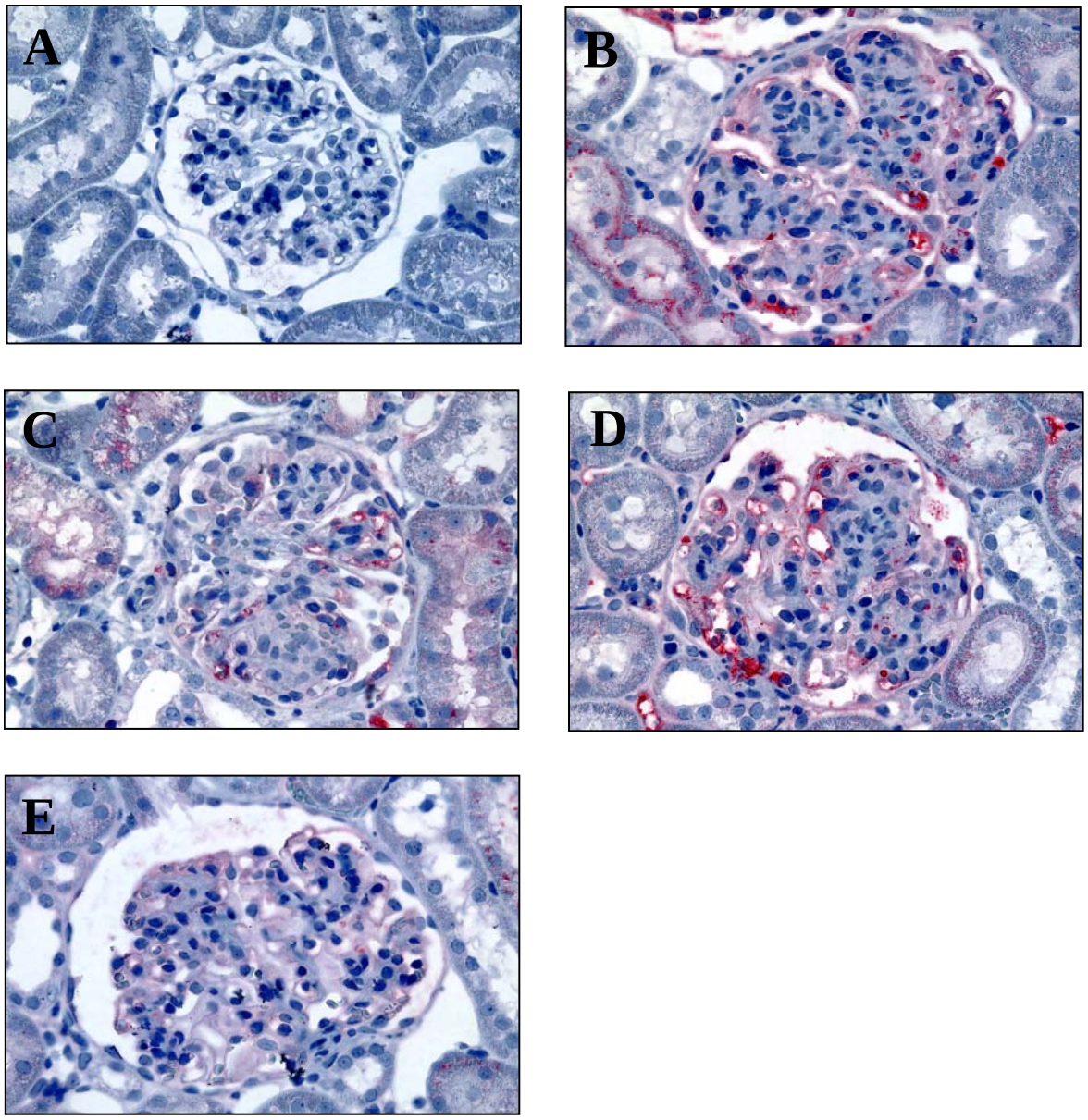

Abb. 17: Charakteristische immunhistochemische Färbung des renalen TGF-ß1 Proteins sieben Tage nach Induktion der Glomerulonephritis. (A) zeigt die Färbung bei normalen, gesunden Kontrolltieren (Kontrolle). Bild (B) zeigt die TGF-ß1-Färbung bei unbehandelten nephritischen Tieren (GN), (C) die Gabe von L-Arginin (GN-Arg), (D) die kombinierte Behandlung L-Arginin und L-NAME (GN-Arg-NAME) und (E) die NO-Donation mit Molsidomin (GN-Molsi).

3.2 Protokoll 2 Effekte der Behandlung mit L-Arginin, Molsidomin und L-Arginin + L-NAME zwölf Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis

3.2.1 Gewichtsverhalten

Bis zum Tag der Nierenentnahme erreichten die Versuchstiere folgendes Gewicht:

Gruppe	Gewicht in g
Gesunde Kontrollen	268 ± 15
GN	271 ± 7
GN-Arg	279 ± 11
GN-Arg-NAME	279 ± 9
GN-Molsi	246 ± 12

Tab. 6: Mittleres Körpergewicht in g der Gruppen in Versuchsprotokoll 2; In der ANOVA-Prozedur zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den Gewichten der einzelnen Gruppen. P=NS für alle Gruppen (ANOVA)

3.2.2 Aufgenommene Dosen von L-Arginin, Molsidomin und L-NAME

Über den täglich dokumentierten Futter- und Trinkwasserverbrauch wurden die tatsächlich aufgenommenen Medikamentendosen mg/Tier/Tag berechnet.

3.2.2.1 L-Arginin

Auch in diesem Versuchsprotokoll wurden alle Tiere mit dem oben beschriebenen Futter ernährt. In diesem zweiten Protokoll wurden folgende Mengen an L-Arginin für die einzelnen Versuchsgruppen erreicht: Gesunde Kontrolltiere (Kontrolle) 195 ± 2 mg/die, unbehandelte nephritische Tiere (GN) 190 ± 2 mg/die, Tiere mit NO-Donation (GN-Molsi) 180 ± 5 mg/die,

Versuchsgruppe mit erhöhter L-Arginin-Zufuhr (GN-Arg) 692 ± 6 mg/die und die Gruppe mit erhöhter L-Arginin-Gabe und gleichzeitiger NO-Synthase-Blockade (GN-Arg-NAME) 689 ± 6 mg/die. Die folgende Graphik verdeutlicht die Arginin-Aufnahme:

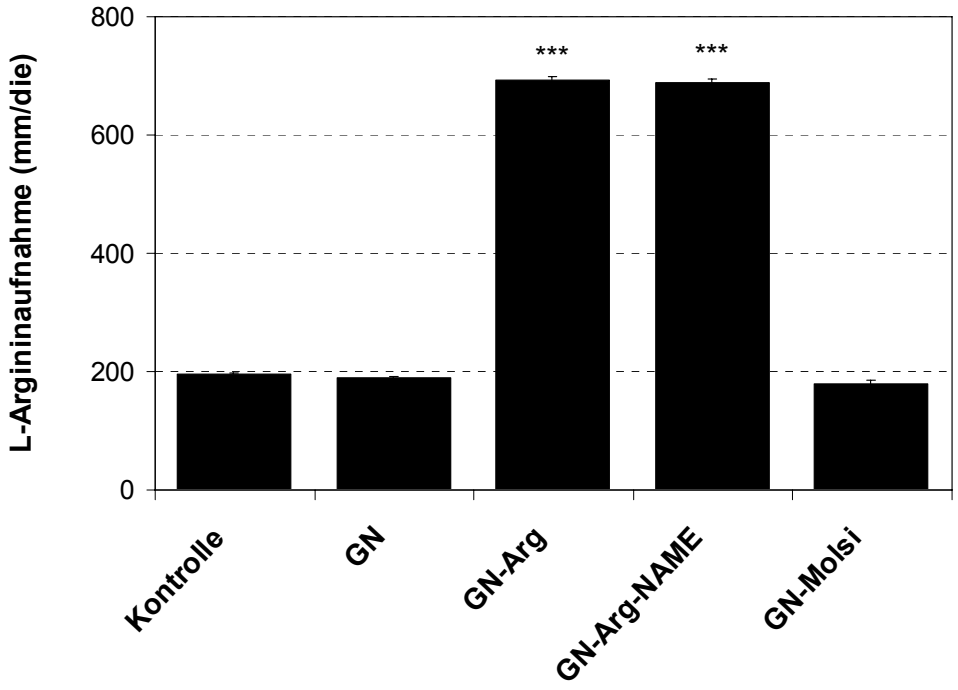

Abb. 18: Protokoll 2: Dosis der diätetischen L-Arginin-Zufuhr in mg/die; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) zwölf Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion.L-Argininaufnahme der Gruppen in Versuchsprotokoll 2; ***P< 0,001 vs. Kontrolle, GN und GN-Molsi

3.2.2.2 L-NAME

Für die Tiere der Therapiegruppe mit L-Arginin kombiniert mit dem NO-Synthase-Hemmer L-NAME wurde eine tägliche Aufnahme von L-NAME in Höhe von 2,8 ± 0,1 mg/die pro Tier erzielt.

3.2.2.3 Molsidomin

Die Gruppe der Tiere, denen der NO-Donor zugeführt wurde, nahm eine Menge an Molsidomin in Höhe von 8,3 ± 0,2 mg pro Tier und Tag ein.

3.2.3 Glomerulärer Matrixgehalt

Gesunde Kontrolltiere (Kontrolle) erreichten einen glomerulären Matrixgehalt von 30 ± 5%, während bei nephritischen Tieren (GN), denen keinerlei Behandlung zukam, einen Matrixgehalt von 65,4 ± 2,6% gemessen wurde. Molsidomin und auch L-Arginin-Gabe reduzierten diesen glomerulären Matrixgehalt (GN-Arg: 55,8 ± 1,8%; GN-Molsi: 53,9 ± 3,5%). Bei Tieren mit der Kombinationbehandlung aus L-Arginin + NOS-Inhibitor L-NAME (GN-Arg-NAME) wurde ein Matrixgehalt von 62,6 ± 1,0% gemessen.

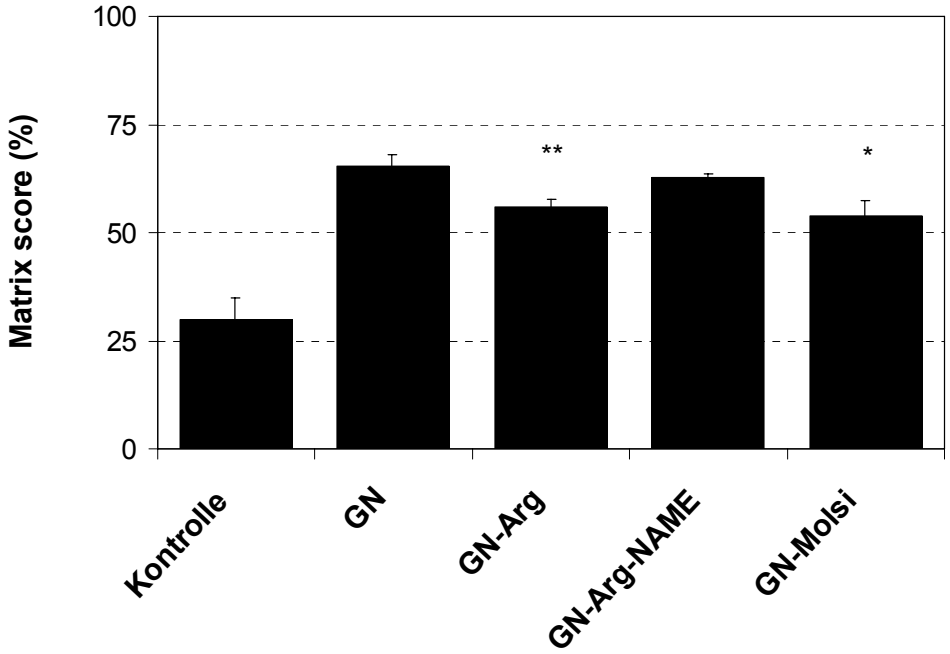

Abb. 19: Protokoll 2: Effekte auf den glomerulären Matrixgehalt; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) zwölf Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. * $P < 0.05$ vs. GN, ** $P < 0,01$ vs. GN

3.2.4 Glomeruläre TGF-ß-Produktion

Ähnlich wie in Versuchsprotokoll 1 zeigte die L-Arginin-Gabe (GN-Arg: 167 ± 13 pg/ml) und auch die NO-Donation mit Molsidomin (GN-Molsi: 158 ± 11 pg/ml) eine signifikante Reduktion der TGF-ß-Produktion in den kultivierten Glomeruli Die Gabe des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME unter gleichzeitiger L-Arginin-Gabe (GN-Arg-NAME) dagegen zeigte ebenfalls einen Anstieg der TGFß-Produktion auf 275 ± 26 pg/ml. Die gesunden Kontrolltiere (Kontrolle) zeigten eine TGF-ß-Konzentration von 60 ± 11 pg/ml, für die Werte der unbehandelten nephritischen Tiere fanden sich Konzentrationen von 282 ± 15 pg/ml.

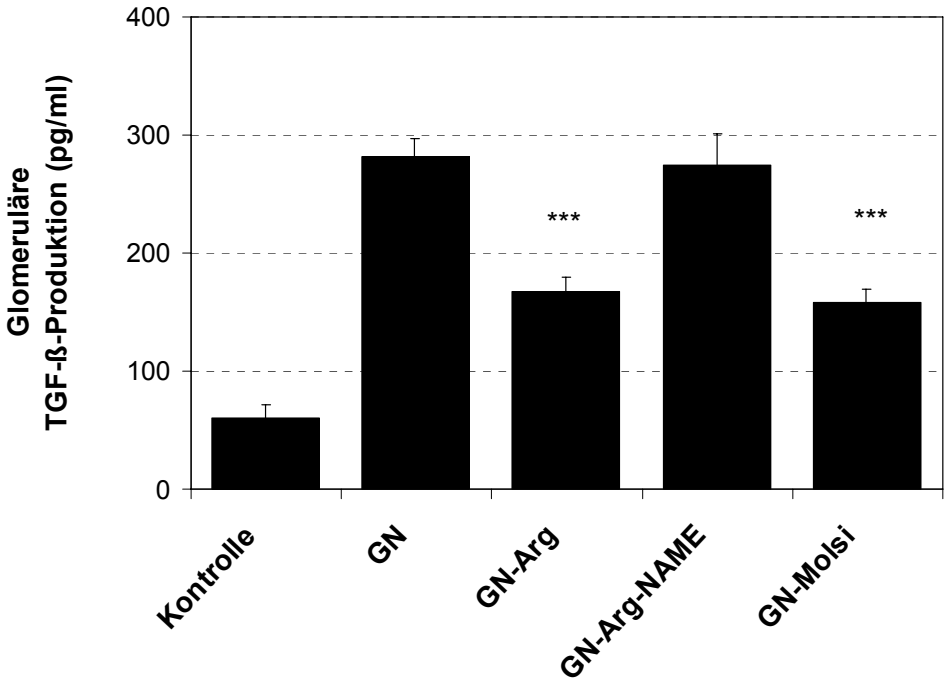

Abb. 20: Protokoll 2: Effekte auf die glomeruläre TGF-ß-Produktion; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) zwölf Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. *** $P < 0.001$ vs. GN

3.2.5 Glomeruläre Fibronektin- Produktion

Auch die glomeruläre Fibronektin-Konzentration zeigte signifikante Unterschiede. Gesunde Kontrolltiere (Kontrolle) erreichten eine Konzentration von 2,7 ± 0,5 µg/ml. Bei den unbehandelten nephritischen Tiere (GN) wurde eine Fibronektin-Konzentration von 17,6 ± 1,5 µg/ml gemessen. Auch hier reduzierten L-Arginin (GN-Arg; 11,9 ± 0,9 µg/ml) und Molsidomin (GN-Molsi; 11,8 ± 1,2 µg/ml) die Produktion von Fibronektin. Wurde neben L-Arginin der NOS-Inhibitor L-NAME (GN-Arg-NAME) gegeben, stieg die gemessene Konzentration auf 15,3 ± 0,8 µg/ml.

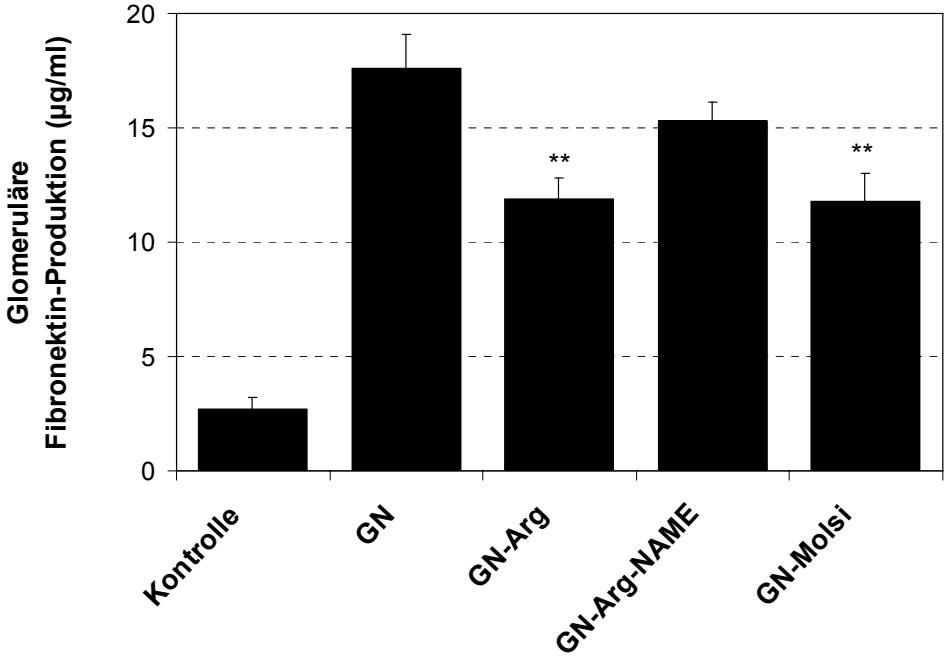

Abb. 21: Protokoll 2: Effekte auf die glomeruläre Fibronektin-Produktion; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) zwölf Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. ** $P < 0.01$ vs. GN

3.2.6 Glomeruläre PAI-1-Produktion

Im Vergleich zu den nephritischen Tieren (GN: 758 ± 78 ng/ml) zeigten auch hier die Arginin-Gabe (GN-Arg: 624 ± 80 ng/ml) und auch die NO-Donation (GN-Molsi: 521 ± 69 ng/ml) eine Reduktion der PAI-1-Konzentration im glomerulären Kulturüberstand, während die kombinierte L-Arginin- und L-NAME-Gabe (GN-Arg-NAME) einen Anstieg der PAI-1-Konzentration auf 968 ± 130 ng/ml aufwies. Die gesunden Kontrolltieren (Kontrolle) erreichten eine PAI-1-Konzentration von 143 ± 17 ng/ml.

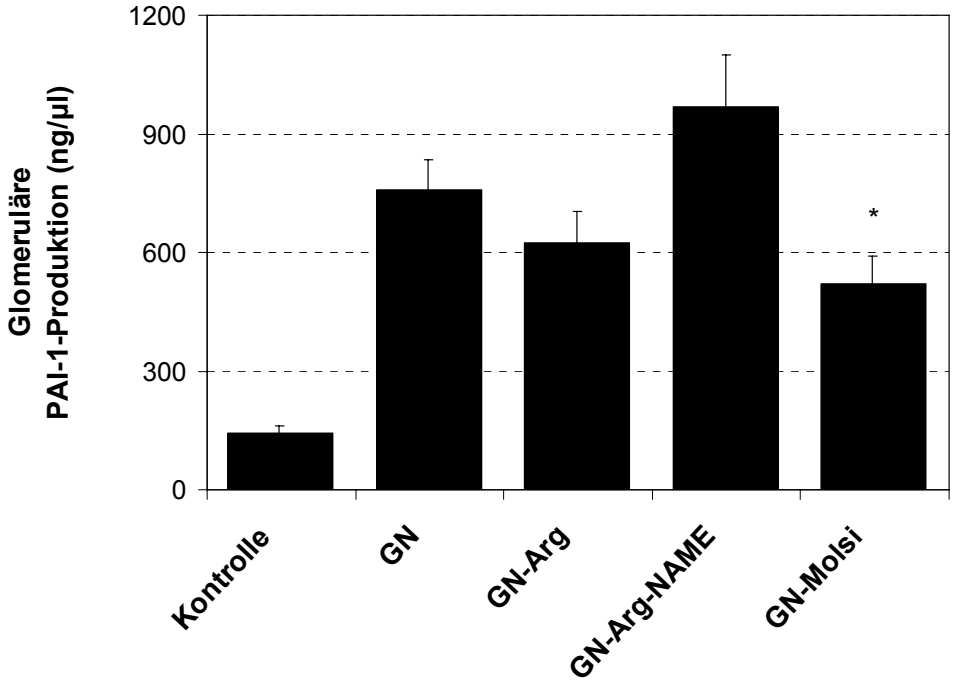

Abb. 22: Protokoll 2: Effekte auf die glomeruläre PAI-1-Produktion; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) zwölf Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. * $P < 0.05$ vs. GN

3.2.7 Proteinurie

Auch hier in diesem zweiten Versuchsprotokoll ist die Im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren (Kontrolle: 0,2 ± 0,1 mg/24h) stieg die Proteinurie bei den unbehandelten, nephritischen Tieren an (GN: 25 ± 5 mg/24h). In den behandelten Tiergruppen wurde die Proteinurie im Vergleich zu den unbehandelten nephritischen Tieren nicht signifikant erhöht durch Gabe von L-Arginin (GN-Arg: 33 ± 4 mg/24h), oder L-Arginin + L-NAME (GN-Arg-NAME: 33 ± 6 mg/24h). Die Gabe von Molsidomin (GN-Molsi: 14 ± 2 mg/24h) erreichte eine Abnahme der Proteinurie, die in der ANOVA-Testung jedoch keine Signifikanz zeigte.

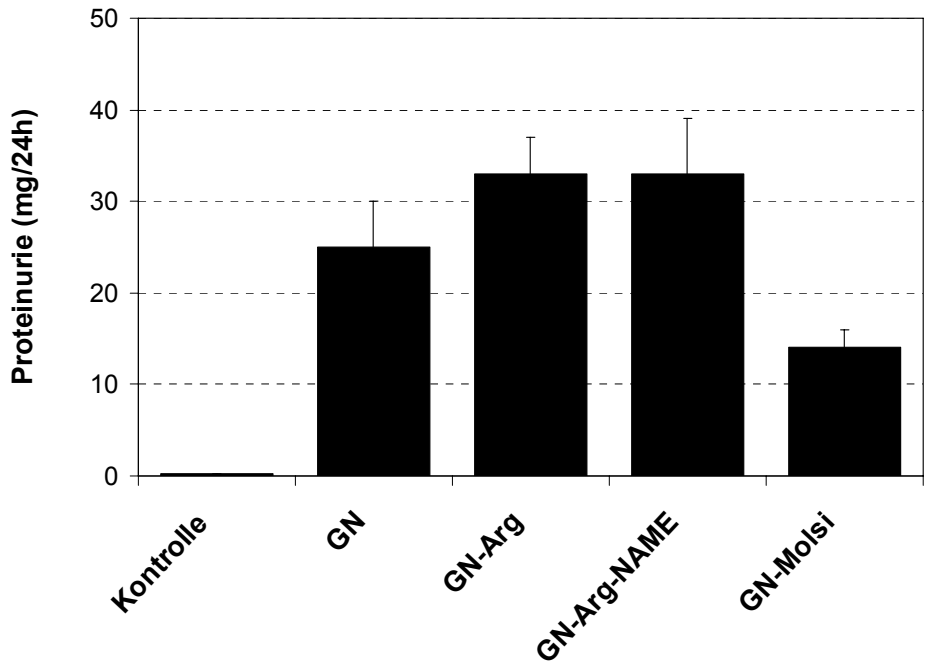

Abb. 23: Protokoll 2: Effekte auf die Proteinurie; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) zwölf Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. P=NS GN-Molsi vs. GN, GN-Arg, GN-Arg-NAME (ANOVA)

3.2.7.1 $NO2^-/NO3^-$ im Plasma

Auch zwölf Tage nach Induktion der Glomerulonephritis zeigte sich signifikanter Effekt auf die Plasma NOx-Produktion. Die gesunden Kontrolltiere (Kontrolle) zeigten 41,2 ± 2,5 nmol/ml, während auch bei den unbehandelten nephritischen Tieren 42,2 ± 2,9 nmol/ml gemessen wurden. Auch bei der Gabe von L-Arginin (GN-Arg: 41,6 ± 2,4 nmol/ml) oder kombiniert mit L-NAME (GN-Arg-NAME: 44,7 ± 1,6 nmol/ml) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (P=NS vs. GN und Kontrolle). Im Gegensatz dazu wurde auch hier durch die NO-Donation via Molsidomin (GN-Molsi) ein signifikanter Anstieg der NOx-Produktion auf 65,7 ± 8,2 nmol/ml gemessen werden.

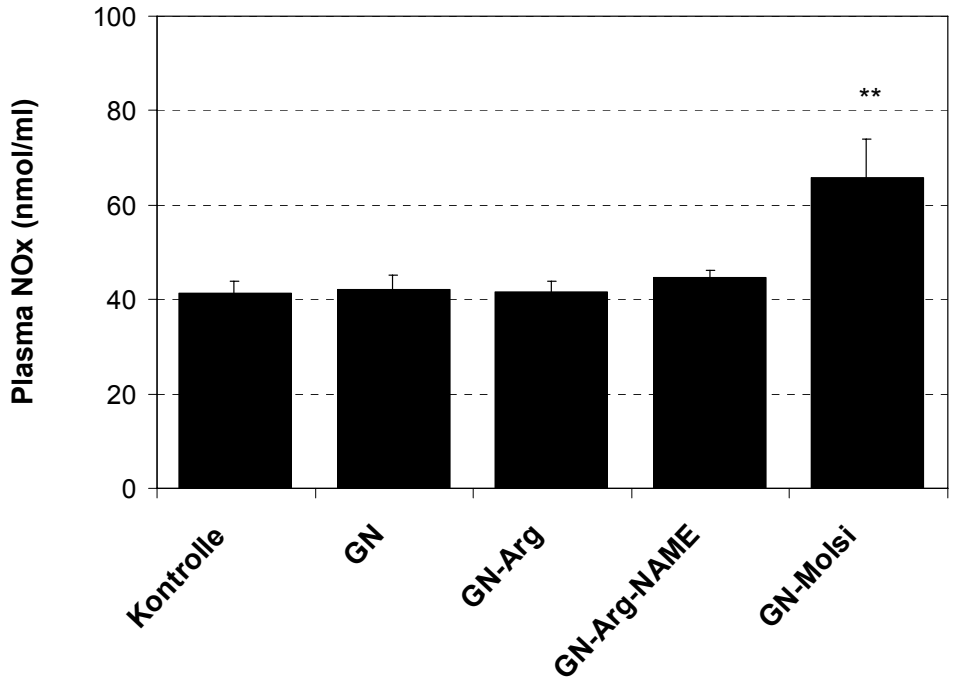

Abb. 24: Protokoll 2: Effekte auf die NOx-Spiegel im Plasma; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) zwölf Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN) Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. **P < 0,01 vs. GN

3.2.7.2 $NO2^-/NO3^-$ im Urin

Auch auf die NOx-Spiegel im Urin wurde allein durch Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis keine signifikanter Effekt nachgewiesen. Hier zeigten die gesunden Kontrolltiere (Kontrolle) 12,3 ± 0,45 µmol/24h und die nephritischen Tieren 11,6 ± 0,98 µmol/24h. Nach Gabe von L-Arginin (GN-Arg: 14,71 ± 1,92 µmol/24h) und auch L-Arginin kombiniert mit L-NAME (GN-Arg-NAME: 12,34 ± 2,0 µmol/24h) wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen (P=NS vs. GN und Kontrolle). Die Tiere mit NO-Donation via Molsidomin (GN-Molsi) dagegen zeigten einen signifikanten Anstieg der NOx-Produktion auf 32,39 ± 5,07 µmol/24h.

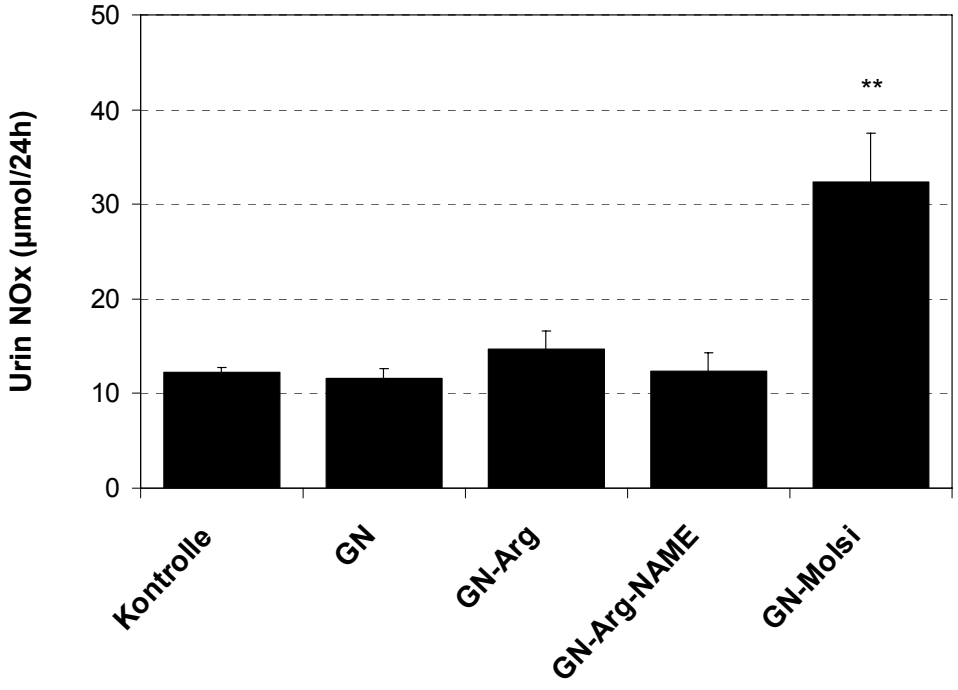

Abb. 25: Protokoll 2: Effekte auf die NOx-Spiegel im Urin; Behandlung mit L-Arginin (-Arg), Molsidomin (-Molsi) und L-Arginin + L-Name (-Arg-NAME) zwölf Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis (GN). Die Kontrolle erhielt eine PBS-Injektion. Die Behandlung begann 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion. **P < 0,01 vs. GN

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich über die Auswertung beider Versuchsprotokolle sagen, dass die Gabe der Aminosäure L-Arginin und auch die NO-Donation mit Molsidomin einen günstigen Effekt auf das Krankheitsgeschehen im Rahmen der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis hat. Es zeigten sich sowohl sieben Tage (der Matrixexpansionsphase der Glomerulonephritis) als auch in der beginnenden Ausheilungsphase der Erkrankung (zwölf Tage) nach Induktion der Glomerulonephritis signifikante Reduktionen der Krankheitsparameter TGF-ß, Fibronektin und PAI-1. Auch die histologische Auswertung zeigte signifikante Veränderungen über eine positive Beeinflussung des Krankheitsgeschehens. Der Einfluss auf die TGF-β-Überexpression lässt sich anhand des morphologischen Parameters des glomerulären Matrixgehalts nachweisen, der in beiden Protokollen durch NO-Donation und auch L-Arginin-Supplemetation reduziert wurde.

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass diese positiven Effekte durch L-Arginin-Gabe und gleichzeitiger Blockade der NO-Synthese mit L-NAME aufgehoben wurden. Die gemessenen Konzentration der Fibrosemarker TGF-ß, Fibronektin und PAI-1 näherten sich denen der unbehandelten, nephritischen Tiere an. Das Gleiche zeigte sich in der glomerulären Matrixexpansion. Auch hier stieg der Matrixgehalt auf ähnliche Werte wie die der unbehandelten nephritischen Tiere.

In beiden Versuchsprotkollen zeigte sich bei den nephritischen Tieren eine deutlich erhöhte Proteinausscheidung im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren. Dies spricht für die erfolgreiche Krankheitsinduktion. In der Sieben-Tage-Nephritis (Protokoll 1) fanden sich keine Unterschiede in den behandelten Tiergruppen. In Protokoll 2 (zwölf Tage nach Induktion der Glomerulonephritis) wurde eine erniedrigte Proteinurie der Gruppe, die eine NO-Donation erhielt, festgestellt. In der ANOVA-Testung zeigte sich hier jedoch keine Signifikanz zu den anderen nephritischen Behandlungsgruppen.

Die Daten zeigten desweiteren, dass TGF-β ein reproduzierbarer und sensitiver Marker für die Matrixakkumulation und damit für das gesamte Krankheitsgeschehen ist. Eine erfolgreiche Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis ist am 3,4-fachen Anstieg (Protokoll 1) und am 4,5-fachen

Anstieg (Protokoll 2) des TGF-β-Spiegels zu erkennen. Damit ist eine deutliche Unterscheidung der kranken von gesunden Tieren möglich und antifibrotische Effekte einer zu untersuchenden Therapie sind klar erkennbar. Dieser Sachverhalt wird durch die Ergebnisse der Positivkontrolle hervorgehoben. Auch der Einfluss von NO auf die glomeruläre TGF-ß-Synthese in vitro konnte eine signifikante, dosisabhängige Reduktion dieses Zytokins bewirken und damit auf einen direkten Zusammenhang zwischen NO und TGF-ß-Produktion hinweisen. Die Ergebnisse der glomerulären mRNA-Expression (Protokoll 1) der Krankheitsparameter TGF-ß, Fibronektin und PAI-1 unterstreichen die in Zellkultur und Histologie gefundenen Ergebnisse. Die signifikant erhöhten Spiegel der endogenen NO-Produktion (NOx-Spiegel) in Blut und Plasma weisen auf eine erfolgreiche NO-Donation mit Molsidomin hin.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen antifibrotischer Wirkung von L-Arginin und Stickoxid näher zu untersuchen. Im folgenden Teil der Arbeit sollen die erzielten Ergebnisse näher diskutiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Gabe der Aminosäure L-Arginin über die endogene Generierung von NO deutliche protektive Effekte auf die renale Matrixexpansion im Rahmen der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis ausübt.

4.1 Methodenkritik

4.1.1 Tiermodelle

In dieser Arbeit wurde mit dem Modell der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis der Ratte gearbeitet, um zu untersuchen, ob die antifibrotischen Effekte der Aminosäure L-Arginin über Stickoxid (NO) vermittelt werden. Das hier verwendete experimentelle Tiermodell ist gut etabliert und charakterisiert humane Erkrankungen. Die Anti-Thy-1-Glomerulonephritis zeigt Parallelen zur IgA-Nephropathie [51] und ist ein Modell der akuten renalen Matrixvermehrung [10]. Wesentlicher Vorteil dieses Modells ist die relativ klare zeitliche Staffelung der Wundheilungssequenz und die damit verbundene Möglichkeit, Untersuchungen zur Schädigungs– und Matrixexpansionsphase spezifisch vornehmen zu können. Die erste Schädigungsphase dieser Glomerulonephritis ist durch NO-vermittelte Lyse von Mesangialzellen charakterisiert [94]. Diese Schädigung der Niere geschieht in ähnlicher Weise wie bei der Lupusnephritis und der akuten Tubulusnekrose durch zytotoxische Mengen an NO [80;82]. An diese Schädigungsphase schließt sich die Phase der Matrixexpansion an, die durch Proliferation von Mesangialzellen und Matrixexpansion im Glomerulus charakterisiert ist [94;95]. Die molekularen Mechanismen der Matrixvermehrung in dieser Phase sind den Mechanismen der diabetischen und der hypertensiven Nierenfibrose sehr ähnlich [10]. Die Anti-Thy-1-Glomerulonephritis heilt allerdings auch ohne Therapie von selbst wieder aus. Das bedeutet, sie ist spontan reversibel [10] und dass es nur in einem begrenzten Zeitraum zur Akkumulation extrazellulärer Matrix kommt. Nach zwei bis vier Monaten ist die

geschädigte Niere zur restitutio ad integrum gekommen. Fraglich ist deshalb, ob dieses Modell einer akuten Glomerulonephritis von Bedeutung für die chronisch-progressive Nierenfibrose sein kann. Sicherlich ist diese Frage nicht eindeutig zu beantworten, dennoch sprechen folgende Punkte für eine Relevanz dieses Modells:

- Die molekularen Mechanismen der akuten und der chronischen Matrixvermehrung sind sich prinzipiell sehr ähnlich [2]. In beiden Formen sind die TGF-ß-Überexpression mit gesteigerter Matrixsynthese und entsprechend gehemmtem Matrixabbau kennzeichnend für die Erkrankung.
- Eine Überführung in eine chronische Form der Erkrankung im Rahmen der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis ist durch wiederholte Antikörperinjektionen beobachtet worden [96]. Dies stützt die Überlegung, dass der Unterschied zwischen akuten und chronischen Prozessen die Dauer des schädigenden Einflusses ist. Bei akuten Erkrankungen wirkt dieser nur kurz, bei der Chronifizierung über einen längeren Zeitraum und wiederholt ein.
- Ein weiteres Argument für die Relevanz der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis zeigt auch die Beobachtung, dass sich wirksame Therapiestrategien gegen die chronische Nierenfibrose, wie die Angiotensin-II-Blockade, Endothelin-Rezeptor-Blockade oder die diätetische Proteinrestriktion, ebenfalls positiv auf die Matrixproteinexpansion bei akut-reversiblen Erkrankungen auswirken [65;97].

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Stoffwechselweges, der die günstigen Effekte einer L-Arginin-Gabe bewirkt und ob diese Wirkungen über NO vermittelt werden. Für diese Untersuchungen ist die Anti-Thy-1-Glomerulonephritis ein geeignetes Modell. Es wurden in den Untersuchungen die frühe (Versuchsprotokoll 1, bis Tag 7) und auch die späte Matrixexpansionsphase (Versuchsprotokoll 2, bis Tag 12) einbezogen.

4.1.2 TGF-ß-Expression als zentraler Parameter für die Fibroseaktivität

In dieser Arbeit wurde auf die Expression des Transforming-Growth-Faktor auf Proteinebene sowie auf messenger RNA-Ebene besonderes Augenmerk gelegt. Desweiteren wurde in vitro die TGF-ß-Expression unter NO-Donation untersucht. Diese Akkumulation extrazellulärer Proteine steht im Vordergrund der renalen Gewebsfibrosierung. Diese besondere Betrachtung des Zytokins erfolgte, da TGF-ß eine Schlüsselrolle in der renalen Matrixakkumulation zugeschrieben wird [20;13;15;16;17;18;35] TGF-ß ist in eine große Reihe biologischer Funktionen verwickelt, wie der Embryogenese, der Zelldifferenzierung und vor allem bei der Wundheilung wurde eine vorherrschende Stellung dieses Zytokins dokumentiert [2;98]. Eine Arbeit von Border und Noble konnte diese zentrale Rolle von TGF-ß durch ein Experiment mit TGF-ß-neutralisierenden Antikörpern untermauern, indem gezeigt wurde, dass der Einsatz dieser Antikörper die Fibrose in der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis signifikant reduzieren konnte [16].

4.1.3 Weitere Parameter zur Messung der Fibroseaktivität

In beiden Versuchsprotokollen wurden neben dem zentralen Fibrosemarker TGF-ß auch noch die Matrixproteine Fibronektin und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 gemessen. Diese Messungen dienten unter anderem dazu, die TGF-ß-unabhängigen Wirkungen von L-Arginin, Molsidomin und der NOS-Inhibition zu untersuchen. Fibronektin als Bestandteil der extrazellulären Matrix dient als weiterer Marker für Matrixproduktion [99]. Mit der Messung von PAI-1 kann eine Aussage zur Matrixdegradation getroffen werden. PAI-1 stimuliert die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin und ist aufgrund seiner proteolytischen Eigenschaften am Abbau der Matrix beteiligt. Die Involvierung von PAI-1 in die Matrixdegradation konnte in einer Studie mit kultivierten Mesangialzellen und auch in einen in vivo-Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose gezeigt werden [100;101].

4.2 Wirkung der L-Arginin-Gabe, der NO-Donation und der Blockade der NO-Synthese auf den Blutdruck

Die im Rahmen der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis erfolgende Matrixakkumulation ist primär eine Antwort auf den immunulogisch verursachten Schaden. Ein durch veränderte Hämodynamik entstandener Gewebeschaden spielt in diesem Tiermodell wahrscheinlich keine größere Rolle [10]. Der Blutdruck bleibt während der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis normal und auch darüber liegende Blutdruckverhältnisse beeinflussen die Matrixakkumulation nicht [75]. In beiden Versuchsprotokollen wurde keinerlei Beeinflussung des systemischen Blutdrucks weder durch die Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis noch durch die Gabe von L-Arginin, Molsidomin oder L-NAME festgestellt. Die vorliegenden Ergebnisse der beiden Versuchsprotokolle weisen auf direkte, Blutdruck-unabhängige Wirkungen der relativ niedrigen NO-Spiegel hin, welche – vermutlich über die endotheliale NOS entstanden – auf der molekularen Kaskade der Gewebsreparatur eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Gewebeschäden der Niere verursacht durch Bluthochdruck ist ein Grund für die Entstehung und die Progression chronischer Nierenerkrankungen. Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass der positive Effekt einer L-Arginin Zufuhr mit niedrigeren Blutdruckwerten einherging [19;72]. Diese Daten ließen vermuten, dass L-Arginin die unzureichende endotheliale NO-Produktion steigert und aus diesem Grunde die Niere vor hypertensiven Gewebsschäden und damit auch vor einhergehender Matrixexpansion schützt.

4.3 Wirkung der pharmakologischen Intervention in den L-Arginin/NO-Stoffwechsel auf die Expression der Fibrosemarker TGF-ß, Fibronektin und PAI-1 sowie auf die Matrixexpansion

4.3.1 Effekte der diätetischen L-Arginin-Zufuhr

Die gefundenen Ergebnisse zeigen, dass eine hohe L-Arginin Zufuhr die glomeruläre Matrixproduktion und die Matrixakkumulation in der Reparationsphase der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis limitieren kann. In beiden Versuchsprotokollen wurde eine signifikante Reduktion der gemessenen Fibroseparameter TGF-ß, Fibronektin und PAI-1 gefunden. Das gilt für die Proteinexpressionsebenen wie auch für die mRNA dieser Matrixproteine. Auch in der histologischen Auswertung wurde eine signifikante Reduktion der Matrixakkumulation und Fibrosierung der Glomeruli gefunden. Charakteristisch für verschiedene Modelle von Nierenerkrankungen ist ein Mangel in der NO-Synthese [10;19;37;38;69]. Bei humanen Nierenerkrankungen wurde ein niedriger NO-Spiegel gefunden. Beispiele sind hier die IgA-Nephropathie, renale Hypertension und die chronische Niereninsuffizienz [69]. Auch in experimentellen Modellen wie der subtotalen Nephrektomie, der hypertensiven Nephropathie, der obstruktiven und der durch Cholesterol-Fütterung induzierten Nephropathie wurde eine reduzierte NO-Synthese nachgewiesen [10;64]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der NO-Produktion mit einem unzureichenden Angebot der Vorstufe von NO, L-Arginin, verknüpft war. Diese Aminosäure ist für Nagetiere wie auch für den Menschen semi-essentiell [20].

Dies bedeutet, dass unter normalen physiologischen Bedingungen die eigene, endogene L-Arginin-Generation für die Aufrechterhaltung des gesamten metabolischen Gleichgewichtes dieser Aminosäure ausreichend ist [20]. Ist der L-Arginin-Stoffwechsel aber reduziert, wie beispielsweise in Wachstumsphasen, bei Entzündungsvorgängen oder Reperaturprozessen von Gewebsdefekten kann die diätetische Zufuhr limitierend für die Stoffwechselwege werden, die L-Arginin metabolisieren [10;20]. In verschiedenen Arbeiten im Rahmen

experimenteller Nierenerkrankungen sind niedrige L-Argininspiegel dokumentiert worden, so auch im Modell dieser Arbeit, der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis [54;70].

4.3.2 Effekte der diätetischen L-Arginin-Zufuhr unter gleichzeitiger Hemmung der NO-Synthase mit L-NAME

Die günstigen, in diesem Tiermodell antifibrotischen Effekte der Aminosäure L-Arginin wurden aufgehoben, wenn eine niedrige Dosis des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME dazugegeben wird. Die glomeruläre Produktion für TGF-ß, Fibronektin und PAI-1 näherten sich in beiden Versuchsprotokollen den Werten der nephritischen, unbehandelten Tiere und diese Werte korrelierten mit der glomerulären Matrixakkumulation in der histologischen Auswertung.
L-NAME ist ein unspezifischer Inhibitor alle drei Isoformen (nNOS, iNOS, eNOS) der NO-Synthasen. Bis dato konnte noch kein spezifischer Hemmer der endothelialen NOS gefunden werden. L-NAME wird in vielen Studien zur Blockade der NO-Synthese verwendet [74;111;112;113] Hervorzuheben ist hierbei, dass L-NAME in der vorliegenden Studie in einer blutdruckunabhängigen Dosis (75 mg/die) verwendet wurde.

4.3.3 Effekte der NO-Donation mit Molsidomin

Die NO-Donation mittels Molsidomin zeigte ebenfalls antifibrotische Wirkungen auf die Anti-Thy-1-Glomerulonephritis in einer ähnlichen Weise wie L-Arginin. Auch hier wurde die Überexpression des profibrotischen Zytokins TGF-ß, sowie der Fibroseparameter Fibronektin und PAI-1 auf der Ebene der Proteinexpression sowie der mRNA-Expression signifikant gesenkt. In der histologischen Auswertung konnte eine Verringerung der Matrixakkumulation und eine daraus folgende Minderung der renalen Fibrosierungsprozesse dokumentiert werden. Diese Daten konnten auf einen molekularen Mechanismus hinweisen, der mit dem antifibrotischen Effekt des L-Arginin in engem Zusammenhang zu stehen scheint.
Verglichen mit der erhöhten L-Arginin-Zufuhr und der damit verbundenen NO-Generation ermöglicht eine direkte pharmakologische NO-Donation – wie hier

mittles Molsidomin – einen genauer definierten Anstieg der endogenen NO-Synthese. In dieser Studie wurde sich für Molsidomin als nitrat-ähnliche Substanz und zur Stoffklasse der Sydnomine zählend entschieden, da es für ein Aktivitätsverlust aufgrund einer Toleranzentwicklung weit weniger anfällig ist als die weit verbreiteten Nitrate (Salpetersäureester) [58]. Dieser Vorteil wurde damit in Verbindung gebracht, dass der aktive Metabolit des Molsidomin – SIN-1 – spontan NO freisetzt, während organische Nitrate eine enzymatische Biaoaktivierung brauchen. Organische Nitrate sind „Prodrugs“ und können erst nach NO-Freisetzung die Guanylylcyclase und damit die cGMP-Bildung stimulieren. Die Enstehung von NO aus organischen Nitraten ist in Gegenwart von SH-Donatoren (wie Cystin) möglich und der enzymatische Stoffwechselweg ist Cytochrom P450-abhängig. Molsidomin bzw. sein aktiver Metabolit setzt dagegen direkt NO frei.

Auf der Basis der hier erhobenen Daten der NOx-Spiegel in Plasma und Urin scheint Molsidomin die effektivere Wirkung einer NO-Donation auszumachen. Sicherlich mag das für den renalen und glomerulären Bereich allein nicht zutreffen, da NO - freigesetzt via SIN-1 - unspezifisch über den gesamten Körper verteilt wird [58]. Im Gegensatz dazu vermag eine L-Arginin-Gabe eine präzisere NO-Donation zu fördern, da dieser Stoffwechselweg NO exakt dort freisetzt, wo es physiologischerweise generiert wird. Das bedeutet, dass die Signal-Transduktionskaskade, die für die Wirkungen des NO benötigt wird, bereitgestellt ist. Die Ergebnisse, die im Rahmen der akuten, normotensiven renalen Matrixakkumulation gefunden wurden, stehen im Einklang mit neueren Daten, die in einem chronischen Erkrankungsmodell erhoben wurden [62]. Hier wurde eine Nephrektomie unter gleichzeitige Ligatur von zwei bis drei Gefäßzweigen der A. renalis der verbliebenen Niere durchgeführt. Diese renale Massenreduktion führt zu Hypertension. Das hier eingsetzte Molsidomin normalisierte den Blutdruck, reduzierte teilweise die Proteinurie und verbesserte die Überlebenszeit der Versuchstiere. Im Vergleich zu dem ebenfalls eingesetzten Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer (ACE-Hemmer) Lisinopril war aber die NO-Donation mit Molsidomin dennoch weniger effektiv. Weitere günstige Wirkungen des Molsidomin konnten andere Studien von Attia et al. und Öztürk et al. darstellen. In der ersten Arbeit wurde ein

Ischämie/Reperfusions-Model der Niere verwendet, die zweite Studie arbeitete mit einer durch Hypercholesterinämie induzierten Nephropathie [78;64]. Aber auch negative Wirkungen dieses NO-Donors wurden in einer weiteren Arbeit über Molsidomin in Zusammenhang mit dem Modell der proteinurischen Adriamycin induzierten Nephropathie beschrieben [63], in der Moslsidomin die renale kortikale Lipidperoxidation förderte. Dieser ungünstige Effekt wurde mit einer prooxidativen Aktivität in Zusammenhang gebracht, die NO-Donoren ausbilden können, denn freigesetztes NO besitzt eine zyto- und bakteriotoxische Wirkung. Reagiert NO mit einem Superoxid-Anion so entstehen Peroxinitrit und nach Zerfall Hydroxylradikale, eine sehr stark oxidative Verbindung, die zur Abtötung von Mikroorganismen führt, aber eben auch zur Gewebsschädigung beitragen kann [119;120;121].

4.4 Effekte auf die NOx-Konzentrationen in Blutplasma und Urin

In dieser Arbeit wurden Nitrat/Nitrit-Spiegel in beiden Versuchsprotokollen bestimmt. Blutplasma- oder Urin-Spiegel der NO-Abbauprodukte Nitrat/Nitrit werden als Indikator für die endogene NO-Produktion verwendet [71]. Die Verknüpfung zwischen L-Arginin-Gabe, NO-Generation und den günstigen Wirkungen auf die renale Fibrose führte zu der Annahme, dass die Aktivierung des L-Arginin/eNOS-Stoffwechselweges ein dafür verantwortlicher Mechanismus ist [71;113;72]. In beiden Versuchsprotokollen konnte die NO-Donation mit Molsidomin die NOx-Spiegel signifikant erhöhen. Sieben Tage nach Induktion der Glomerulonephritis stiegen die Urin-NOx-Spiegel auf das 2.0-fache und die Blutplasmaspiegel stiegen auf das 1,5-fache verglichen mit den NOx-Spiegeln der anderen Versuchsgruppen. Auch in Versuchsprotokoll 2, 12 Tage nach Krankheitsinduktion, stiegen die NOx-Konzentrationen in Plasma und Urin auf das 1,6-fache bzw. das 1,4-fache an.

Diese Ergebnisse sind sicherlich deskriptiv zu bewerten und beweisen NO als alleinigen Mediator nicht. Die NOx-Spiegel in Plasma und Urin repräsentieren die NO-Generation des gesamten Körpers und sind nicht sensitiv genug, um Veränderungen im renalen NO-Stoffwechsel zu beschreiben [71]. Die L-Arginin Gabe erhöhte die NOx-Spiegel in Plasma und Urin wenig, aber nicht signifikant in der Phase der Gewebsreparation der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis. Auch in

anderen Studien wurde die Hemmung der NO-Synthese parallel zu L-Arginin-Administration angewendet, um den L-Arginin/NO-Stoffwechselweg zu untersuchen [72;73]. Eine Arbeit von Ribeiro et al. konnte zeigen, dass systemische Hemmung der NO-Synthese mit hoher Dosis des Inhibitors L-NAME zu renaler Fibrosierung führt [74]. Es ist aber auch zu bedenken, dass in Gegenwart einer vorbestehenden Nierengewebsschädigung eine NO-Inhibition die renale Matrixexpansion in synergistischem Sinne fördern kann. Das bedeutet, dass eine Umkehr der günstigen Wirkungen einer erhöhten L-Arginin Gabe nicht unbedingt beweisend für die NO-Abhängigkeit des Stoffwechselweges sein muß. Um diese möglichen methodischen Grenzen zu überwinden, wurde sich in dieser Arbeit für eine zweifache pharmakologische Herangehensweise entschieden, nämlich der NO-Synthese-Hemmung mit L-NAME und einer NO-Donation via Molsidmin.

4.5 TGF-ß und NO

Diese Ergebnisse der kultivierten Glomeruli deuten ferner darauf hin, dass NO mit der TGF-ß-Überexpression in vivo interagiert und dass die Matixexpansion direkt mit einem blutdruck-unabhängigen Mechanismus verknüpft zu sein scheint. Der NO-Donor DETA NONOate reduzierte die TFG-ß-Produktion direkt in kultivierten Glomeruli nephritischer unbehandelter Tiere und in denen gesunder Kontrolltiere. Diese Daten sind übereinstimmend mit den Ergebnissen einer Studie von Craven et al. [45]. In unter Zusatz eines NO-Donors kultivierten Ratten-Mesangialzellen, wurde ebenfalls eine deutliche Reduktion der TGF-ß Produktion und der damit nachfolgenden Kollagensynthese gefunden. Dieses Ergebnis fand sich auch bei gleichzeitiger Kultivierung der Mesangialzellen mit endothelialen Zellen innerhalb dieser Studie [45]. Andere Arbeiten konnten zeigen, dass NO-Gabe in vitro die Matrixproteinsynthese in Mesangialzellen und glatte Gefäßmuskelzellen von Ratten reduzierte [73]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass hier ein direkter, parakriner Mechanismus vorliegt, der sowohl bei fibrotischen Nierenerkrankungen in vivo eine Rolle spielt, als auch für die antifibrotischen Wirkungen des L-Arginin relevant ist, die bei hypertensiver renaler Fibrose beobachtet wurde.

4.6 Proteinurie

Die Ausscheidung von Proteinen im Urin ist ein Zeichen glomerulärer Schädigung und für die Glomerulonephritis charakteristisch. In beiden Versuchsprotokollen stieg die Proteinurie nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis signifikant an, aber durch die Gabe von L-Arginin, Molsidomin oder die Kombination L-Arginin und NOS-Inhibitor L-NAME wurde keine weitere Beeinflussung auf diesen Krankheitsparameter beobachtet. Die Induktion der Erkrankung wurde im Hinblick auf die glomeruläre Schädigung erreicht. Im Gegensatz zur Proteinproduktion der Fibroseparameter TGF-ß, Fibronektion, PAI-1 und der mRNA-Expression dieser Parameter wurde in dieser Arbeit die Proteinurie nicht durch die Herangehensweise, die renale NO-Synthese zu verändern, beeinflusst. Mit Blick auf die erhöhte L-Arginin-Zufuhr wurde dieses Ergebnis auch in einer anderen Studie der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis gefunden [54]. Die Gründe für dieses Phänomen sind unklar. Es könnte aber sein, dass sie im Zusammenhang mit dem Model der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis zu sehen sind. Es ist bereits beschrieben worden, dass manche Rattenstämme keine Proteinurie im Rahmen dieser Erkrankung entwickeln, während bei anderen Stämmen das Ausmaß der Proteinurie weit mehr als das der fibrotischen Gewebsantwort variiert [102]. Dies hängt auch mit der Art des Antikörpers oder des Antiserums zusammen, welches zur Krankheitsinduktion verwendet wird [54].

4.7 L-Arginin – eine Aminosäure mit gegensätzlichen Wirkungen

Auch für eine erhöhte L-Arginin-Zufuhr sind günstige Effekte wie auch negative Ergebnisse auf den Krankheitsverlauf in verschiedenen Modellen dokumentiert worden. In immunvermittelten Nierenerkrankungen mit einer vermehrten Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) [10;35]. NO, dass in hohen Konzentrationen durch die iNOS produziert wurde, vergrößert den renalen Gewebeschaden (z.B. NO-vermittelte Zell-Lyse) und ist über diesen Mechanismus ein starker Stimulus für die Expression des profibrotisch wirkenden Zytokins TGF-ß. Je größer der Gewebschaden ist, desto höher ist die nachfolgende Expression des Zytokins. Eine L-Arginin-Gabe sowie die

Induktion der iNOS im Zusammenhang mit einem progressiven Krankheitsbild wurde in Modellen des hypoxischen Lungenschaden, der toxischen Kolitis und im Rahmen der Hirnreperfusion dokumentiert [85;86;87].

In experimentellen Nierenerkrankungen konnte diese induzierbare NO-Synthase als ein Schlüssel-Mediator identifiziert werden, der sowohl im Rahmen der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis für die Mesangialzellyse, als auch bei der murinen Lupusnephritis, der Nierentransplantatabstoßung und der akuten Tubulusnekrose für den Gewebeschaden verantwortlich gemacht wurde [51;80;81;82]. Auch in humanen renalen Erkrankungen wie der mesangioproliferativen Glomerulonephritis, der Wegener´schen Granulomatose und bei der Abstoßungsreaktion von Nierentransplantaten wurde eine hohe Rate an Proteinexpression der iNOS und ihrer mRNA festgestellt [10;83]. Diese Daten korrelierten mit den histologischen Befunden des renalen Schadens und mit einem Verlust der Nierenfunktion [83]. Die diätetische L-Arginin-Gabe führte auch in anderen Studien zu einem höheren immun-vermittelten Gewebeschaden mit nachfolgender Matrixakkumulation während der akuten Phase der Mesangialzellyse der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis [35]. Sie zeigte gleiche negative Wirkungen mit beschleunigter renaler Fibrosierung und verkürzter Überlebenszeit im chronischen Modell der experimentellen Lupusnephritis bei MRL/lpr Mäusen [84].

Im Rahmen der Infiltration inflammatorischer Zellen scheint der Effekt einer erhöhte L-Arginin-Zufuhr mit dem experimentellen Modell zu variieren. In der experimentellen obstruktiven Nephropathie und der Puromycin-induzierten Nephrose konnte die Gabe dieser Aminosäure die Zellinfiltration reduzieren [88]. Auch in einer Reihe von hypertensiven renalen Erkrankungen wurde das Krankheitsbild positiv beeinflusst [88;89;90]. Diese günstigen Effekte sind wahrscheinlich auf die Involvierung der endothelialen NOS zurückzuführen. In normotensiven Modellen wie der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis reduzierte die L-Arginin-Zufuhr ebenfalls die Zeichen der renalen Fibrose, wenn die Aminosäure nach der Verletzungsphase dieses Erkrankungsmodells gegeben wurde [54]. Auch bei kardiovaskulären Erkrankungen, wie Hypertension, Herzversagen, Erkrankungen der peripheren Arterien und der Herzkranzgefäße konnten günstige Wirkungen der L-Arginin-Gabe festgestellt werden [91]. Für

die koronare Herzkrankheit konnten Studien zeigen, dass systemische oder orale L-Arginin-Gabe die kardiovaskuläre Funktion verbessert und myokardiale Ischämie vermindern konnte. Als Beispiel sei hier eine Arbeit von Maxwell und Cooke genannt, die zeigte, dass intrakoronare L-Arginin-Infusion eine Dilatation der Koronarstenose bei Patienten mit stabiler Angina pectoris induzieren kann und dass die Verminderung des arteriellen Mitteldrucks, des systemischen Gefäßwiderstandes und die Steigerung des Herzschlagvolumens mit einer L-Arginin-Gabe korrelierte [110]. Watanabe et al. zeigten, dass auch die renale Hämodynamik bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz durch L-Arginin positiv beeinflusst werden konnte [109].

Die vorliegende Arbeit zeigt die Geschehnisse der Matrixexpansionsphase und der nach ungefähr zwölf Tagen beginnenden Ausheilungsphase dieses Erkrankungsmodells. Die hier gefundenen Ergebnisse sprechen für die günstigen Effekte einer diätetischen L-Arginin-Zufuhr im experimentellen Modell der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis. Die ersten Versuche, L-Arginin bei renalen Erkrankungen des Menschen anzuwenden, zeigten keinerlei Effekte auf den Krankheitsverlauf. Bei Patienten mit chronischer Glomerulonephritis, denen über sechs Monate 15 g L-Arginin/Tag zugeführt wurden, stiegen zwar die Plasma-Spiegel des L-Arginin und der NO-Endprodukte NOx, aber Blutdruck, Proteinurie oder renale Funktionsparameter blieben unbeeinflusst. [92] Ein ähnlicher acht-Wochen-Versuch mit der Aminosäure bei nierentransplantierten Patienten veränderte ebenfalls weder die Proteinurie noch die Nierenfunktion [93]. Interessanterweise gingen aber beide Arbeiten mit dem Nachweis einer erhöhten iNOS-Expression einher. Der Grund für diese Ergebnisse sind bislang unklar. Sie scheinen aber darauf hinzuweisen, dass die günstigen Wirkungen einer L-Arginin-Gabe durch die gleichzeitigen negativen Effekte einer gesteigerten, durch die induzierbare NO-Synthase vermittelten, NO-Generierung aufgehoben werden. Das würde bedeuten, dass ein erhöhtes Angebot an L-Arginin für eine - das Gewebe schädigende - NO-Produktion, vermutlich via iNOS, und für ein gesteigertes Krankheitsbild verantwortlich ist. Dafür sprechen auch die Daten im Modell der experimentellen Lupusnephritis. Im Gegensatz zu einem erhöhten Angebot an L-Arginin, reduzierten eine Niedrigprotein-Diät und der L-Arginin-Entzug die Expression dieser

induzierbaren NO-Synthase. Die darauf folgende – schädigende - NO-Produktion sowie die renale Fibrosierung wurden gesenkt, und es zeigte sich eine gesteigerte Überlebenszeit der Versuchstiere [84].

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, den Stoffwechselweg zu identifizieren, der für die günstige Wirkung der Aminosäure L-Arginin auf die glomeruläre Matrixexpansion und TGF-ß-Überepxression nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis verantwortlich ist. Hierzu wurde die folgende Fragestellung formuliert: „Wird die antifibrotische Wirkung von L-Arginin auf die renale Matrixexpansionsphase der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis über NO vermittelt?“. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Effekte von L-Arginin, des NO-Donors Molsidomin und des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME auf die glomeruläre Protein-Expression der Fibrosemarker TGF-ß, Fibronektin, PAI-1 und die renale Matrixakkumulation sieben bzw. zwölf Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis untersucht. Im Hinblick auf die glomeruläre messenger-RNA-Expression von TGF-ß, Fibronektin und PAI-1 wurden die Wirkungen von L-Arginin, Molsidomin und L-NAME sieben Tage nach Induktion der Glomerulonephritis analysiert. Des weiteren wurde die Effekte von NO-Donoren auf die TGF-ß-Produktion von kultivierten Glomeruli in vitro untersucht. Als Kontrollen dienten jeweils gesunde und unbehandelte nephritische Tiere.
Aus diesen Untersuchungen konnten folgende wesentliche Ergebnisse festgestellt werden:

I. Der systemische systolische Blutdruck wurde durch die Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis nicht beeinflusst. Die Tiere aller Versuchsgruppen waren normotensiv. Es kann davon ausgegangen werden, dass die gefundenen Effekte der pharmakologischen Intervention mit L-Arginin, Molsidomin und L-NAME blutdruckunabhängig sind.

II. In Versuchsprotokoll 1, sieben Tage nach Induktion der Glomerulonephritis, konnte gezeigt werden, dass die glomerulären TGF-ß-Überexpression durch die Gabe von L-Arginin und die NO-Donation mittels Molsdomin im Vergleich zu unbehandelten nephritischen Tieren signifikant reduziert wurde.

III. Ähnliche Ergebnisse konnten für das Versuchsprotokoll 2, zwölf Tage nach Induktion der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis gefunden werden.

Auch hier reduzierte die L-Arginin-Gabe und die NO-Donation mit Molsidomin die glomerulären TGF-ß-Überexpression signifikant.

IV. Die weiteren renalen Fibroseparameter, die glomeruläre Matrixakkumulation und die Expression von Fibronektin und PAI-1 korrellierten mit dem Verlauf der TGF-ß-Expression auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene.

V. Es konnte gezeigt werden, dass die günstigen Effekte, die L-Arginin und NO-Donation bewirkten, durch die gleichzeitige Hemmung der NO-Synthese über L-NAME aufgehoben wurden.

VI. Es konnte in vitro gezeigt werden, dass durch NO-Gabe die TGF-ß-Produktion kultivierter normaler und nephritischer Glomeruli signifikant und dosisabhängig gesenkt werden konnte.

VII. In beiden Versuchen konnte als Nachweis der Bioverfügbarkeit der NO-Donation mit Molsidomin ein signifikanter Anstieg der NOx-Konzentrationen in Blutplasma und Urin nachgewiesen werden.

VIII. Im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren zeigte die Induktion der Glomerulonephritis in beiden Versuchsprotokollen einen signifikanten Anstieg der Proteinurie, während die Behandlung mit L-Arginin, Molsidomin oder L-NAME die Proteinurie nicht signifikant beeinflusste.

Eine günstige Wirkung von NO-Donoren wie Molsidomin auf humane fibrotische Nierenerkrankung ist bislang noch nicht in klinischen Studien untersucht worden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass günstige Effekte der L-Arginin-Gabe auf die Überexpression von TGF-ß, Fibronektin und PAI-1 sowie auf die Matrixproteinakkumulation im Rahmen der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis durch NO vermittelt werden. Sie lassen ferner vermuten, dass NO die TGF-ß-Produktion auch über einen blutdruck-unabhängigen, parakrinen Mechanismus reduziert. Im Hinblick auf die klinische Anwendung dieser Ergebnisse lässt vermuten, dass die pharmakologische NO-Donation eine mögliche Strategie sein könnte, die die Grenzen der L-Arginin-Gabe im Rahmen der Behandlung fibrosierender Nierenerkrankungen überwinden könnte.

6 Literaturverzeichnis

1 Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I : The progression of renal disease. N Engl J Med. 1988, *318*, S.1657-1666,

2 Border WA, Noble NA: Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. N Engl J Med. 1994, *331*, S.1286-1292,

3 Reyes AA, Purkerson ML, Karl I, Klahr S: Dietary supplementation with L-arginine ameliorates the progression of renal disease in rats with subtotal nephrectomy. Am J Kid Dis. 1992, *20*, S.168-176,

4 Katoh T, Takahashi K, Klahr S, Reyes AA, Badr KF: L-arginine decreases the infiltration of the kidney by macrophages in obstructive nephropathy and puromycin-induced nephrosis. Kidney Int. 1994, *45*, S.1346-1354,

5 Reyes AA, Karl IE, Kissane J, Klahr S: L-arginine administration prevents glomerular hyperfiltration and decreases proteinuria in diabetic rats. J Am Soc Nephrol. 1993, *4*, S.1039-1045,

6 Andrade L, Campos SB, Seguro AC: Hypercholesterolemia aggravates radiocontrast nephrotxicity: protective role of L-arginine. Kidney Int. 1998, *53 (6)*, S.1736-1742,

7 Reckelhoff JF, Kellum JA, Jr., Racusen LC, Hildebrandt DA: Long-term dietary supplementation with L-arginine prevents age-related reduction in renal function. Am J Physiol. 1997, *272*, S.R1768-1774,

8 Bohle A: Die Bedeutung des Niereninterstitiums für die Nierenfunktion. Klin Wochenschr. 1982, *60*, S.1186-1190,

9 Peters H, Border WA, Noble NA: Angiotensin I und L-arginine in tissue fibrosis: more than blood pressure. Kid Int. 1997, *51*, S.1481-1486,

10 Peters H, Border WA, Noble NA: From rats to men: A perspective on dietary L-arginine supplementation in human renal disease. Nephrol Dial Transplant. 1999, *14*, S.1640-1660,

11 Klahr S, Levey AS, Beck GJ, Caggiula AW, Hunsicker L, Kusek JW, Striker G: The effects of dietary protein restriction and blood-pressure control on the progression of chronic renal disease. Modification of Diet in Renal Disease Study Group11. N Eng J Med. 1994, *330*, S.877-884,

12 Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD: The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study. N Engl J Med. 1993, *329*, S.1456-1462,

13 Okuda S, Nakamura T,Yamamoto T, Rouslahti E, Border WA: Dietary protein restriction rapidly reduces transforming growth factor beta 1 expression in experimental glomerulonephritis. Procl Natl Acad Sci USA . 1991, *88*, S.9765-9769,

14 Ohta K, Kim S, Hamaguchi A, Yukimura T, Miura K, Takaori K, Iwao H: Role of angiotensin II in extracellular matrix and transforming growth factor beta 1 expression in hypertensive rats. Eur J Pharmacol . 1994, *269*, S.115-119,

15 Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E: Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. Nature. 1992, *360*, S.361-364,

16 Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E: Suppresion of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. Nature. 1990, *346*, S.371-374,

17 Border WA, Ruoslathi E: Transforming growth factor beta in disease: the dark side of tisue repair. J Clin Invest. 1992, *90*, S.01. Jul,

18 Noble NA, Border WA: Angiotensin II in renal fibrosis: Should TGF-beta rather than blood pressure be the therapeutic target?. Semin Nephrol. 1997, *17*, S.455-466,

19 Reyes AA, Karl I, Klahr S: Role of arginine in health and in renal disease. Am J Physiol. 1994, *267*, S.F331-F346,

20 Barbul A: Arginine: biochemistry, physiology an therapeutic implications. J Parenter Enteral Nutr. 1986, *10*, S.227-238,

21 Furchgott RF, Zawadzki JV: the obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle cells by acetylcholin. Nature. 1980, *288*, S.373-376,

22 Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrne RE, Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor produced from artery and vein is nitric oxide. Proc Nat acad Sci. 1987, *84*, S.9265-9269,

23 Palmer RMJ, Ferrige AJ, Moncada S: Nitric oxide releases accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. Nature. 1987, *327*, S.524-526,

24 Castillo L, Sanchez M, Vogt J, Chapman TE, DeRojas Walker TC, Tannenbaum SR, Ajami AM, young VR: Plasma arginine, citrulline and ornithine kinetics in adults with observation on nitric oxide synthesis. Am J Physiol. 1995, *268*, S.E360-E367,

25 Kone BS, Baylis C: Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. Am J Physiol. 1997, *272*, S.F561-F578,

26 Moncada S: Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. Ann NY Acad Sci. 1997, *811*, S.60-67,

27 Bachmann S, Mudel P: Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization and function. Am J Kid Dis. 1994, *24*, S.112-129,

28 Beckmann JS, Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. Am J Physiol. 1996, *271*, S.C1424-C1437,

29 Sandau K, Pfeilschifter J, Brune B: Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. Kid Int. 1997, *52*, S.378-386,

30 Knowle RG, Moncada S: Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J . 1994, *298*, S.249-258,

31 Nathan C, Xie QW: Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem. 1994, *269*, S.13725-13728,

32 Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z: Macrophage cytotoxicity: role for deaminase and iminonitrogen oxidation to nitrate. Science. 1987, *235*, S.473-476,

33 Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM: Nitric oxide a cytotoxic activated macrophageeffector molecule. Biochem Biophys Res Comm. 1988, *157*, S.87-94,

34 Pfeilschifter J, Eberhardt W, Hummel R, Kunz D, Muhl H, Nitsch D, Pluss C, Walker G: Therapeutic strategies für the inhibition of inducible nitric oxide-synthase - Potential for a novel class of anti-inflammatory agents. Cell Biol Int. 1996, *20*, S.51-58,

35 Peters H, Border WA, Noble NA: L-arginine supplementation increases mesangial cell injury and subsequent tissue fibrosis in experimental glomerulonephritis. Kid Int. 1999, *55*, S.2264-273,

36 Peters H, Noble NA: dietary L-arginine in renal disease. Sem Nephrol. 1996, *16 No. 6*, S.567-575,

37 Noris M, Remuzzi G: Physiology and Pathophysiology of nitric oxide in chronic renal disease. Proc Assoc Am Physicians. 1999, *111*, S.602-610,

38 Kone BC: Nitric oxide in renal health and disease. Am J Kid Dis. 1997, *30*, S.311-333,

41 Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, nakane M, Schwar P, Gath I, Kleinert H: Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning and functions. Hypertension. 1994, *23*, S.1121-1131,

43 Trachtmann H, Futterweit S, Singhal P: Nitric oxide modulates the synthesis of extracellulär matrix proteins in cultured rat mesangial cells. Biochem Biophys Res Commun. 1995, *207*, S.120-125,

44 Trachtmann H, Futterweit S, Garg P, Reddy K, Singhal P: Nitric oxide stimulates the activity of a 72-kDa neutral matrix metalloproteinase in cultured rat mesangial cells. Biochem Biophys Res Commun. 1996, *218*, S.704-708,

45 Craven PA, Studer RK, Felder J, Phillips S, DeRubertis FR: Nitric oxide inhibition of transfoorming grwoth factor-beta and collagen sythesis in mesangial cells. Diabetes. 1997, *46*, S.671-681,

46 Shultz PJ, Schorer AE, Raij L: Effects of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide on rat mesangial cells. Am J Physiol. 1990, *258*, S.F162-F167,

47 Hogan M, Cerami A, Bucala R: Advanced glycolisation endproducts block the antiproliferative effect of nitric oxide. Role in the vascular and renal complications of diabetes mellitus. J Clin Invest. 1992, *90*, S.1110-1115,

50 Bagchus WM, Hoedemaker PJ, Rozing J, Bakker WW: Glomerulonephritis induced by monoclonal Anti-thy-1.1antibodies. Lab Invest. 1986, *55*, S.680-687,

51 Narita I, Border WA, Ketteler M, Noble NA: Nitric oxide mediates immunologic injury to kidney mesangium in experimental glomerulonephritis. Lab Invest. 1995, *72*, S.17-24,

52 Schlondorff D, Nelson PJ, Luckow B, Banas B: Chemokines and renal disease. Kidney Int. 1997, *51*, S.610-621,

53 Floege J, Grone HJ: Progression of renal failure: What is the role of Zytokines. Nephrol Dial Transplant. 1995, *10*, S.1575-1586,

54 Peters H, Border WA, Noble NA: Tandem antifibrotic actions of L-arginine supplementation and low protein diet during the repair phase of experimental glomerulonephritis. Kidney Int. 2000, *57*, S.922-1001,

55 Rerolle JP, Hertig A, Nguyen G, Sraer JD, Rondeau EP: Plasminogen activator inhibitor type 1 is a potential target in renal fibrosis. Kidney Int. 2000, *58*, S.1841-1850,

56 Tierschutzgesetz vom 02.09.1975. Band BGBI. 2002 S.2313-2610 Ref. Type: Patent,

57 Tierschutzgesetz in der Fassung vom 17.02.1993. Band BGB1. 1993 S.254 zuletzt geändert durch Artikel 86 des EWR-Ausführungsgesetzes vom 27.04.1993 BGB II S. 512 Ref. Type: Patent,

58 Feelisch M : The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. Nauyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1998, *358*, S.113-122 ,

59 Baylis C, Mitruka B, Deng A: Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. J Clin Invest. 1992, *90*, S.278-281,

61 van den Meiracker A, van der Linde N, Broere A, Derkx F, Boomsma F: Effects of L-Arginine and L-NAME on the renal function in hypertensive and normotensive subjects. Nephron. 2002, *91*, S.444-451,

62 Benigni A, Zoija C, Norris M et al: Renoprotection by nitric oxide donor and lisinopril in the remnant kidney model. Am J Kidney Dis. 1999, *33*, S.746-753,

63 Rangan GK, Wang Y, Harris DC: Pharmacologic modulators of nitric oxide exacerbate tubulointerstitial inflammation in proteinuric rats. J Am Soc Nephrol. 2001, *12*, S.1696-1705,

64 Attia DM, Ni ZN, Boer P et al.: Proteinuria is preceeded by decreased nitric oxide synthesis and prevented by a NO donor in cholesterol-fed rats. Kidney Int. 2002, *61*, S.1776-1787,

65 Peters H, Noble NA, Border WA: Targeting TGF-beta overexpression in renal disease: Maximizing the antifibrotic action of angiotensin II blockade. Kidney Int. 1998, *54*, S.1575-1583,

66 Vodovotz Y, Kwon NS, Pospischil M, Manning J, Paik J, Nathan C: Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN-gamma and bacterial lipopolysaccharide, J Immunol. 1994, *152*(8), S. 4110-8,

67 Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF: Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991, *88*(17), S. 7773-7777,

68 Rennard SI, Berg R, Martin GR, Foidart JM, Robey PG: Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue components. Anla Biochem. 1980, *104*, S.205-214,

69 Schmidt RJ, Baylis C: Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. Kidney Int. 2000, *58*, S.1261-1266,

70 Reyes AA, Karl IE, Yates J, Klahr S: Low plasma and renal tissue levels in rats with obstructive nephropathy. Kidney Int. 1994, *45*, S.782-787,

71 Baylis C, Vallance P: Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine - What does this measure tell us about the activity of the enogenous nitric oxide system?. Curr Opin Nephrol Hypertens. 1998, *7*, S.59-62,

72 Chen PY, Sanders PW: L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. J Clin Invest. 1991, *88*, S.1559-1567,

73 Shihab FS, Yi H, Bennet WM, Andoh TF: Effect of nitric oxide modulation on TGF-beta1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephrotoxicity. Kidney Int. 2000, *58*, S.1174-1185,

74 Ribeiro MO, Antunes E, Muscara MN et al.: Nifedipine prevents renal injury in rats with chronic nitric oxide inhibition. Hypertens. 1995, *26*, S.150-155,

75 Wenzel UO, Wolf F, Thaiss F et. al: Renovascular hypertension does not influence repair of glomerular lesions induced by anti-thymocyte glomerulonephritis. Kidney Int. 2000, *58*, S.1135-1147,

76 Vandenbossche GM, De Muyunck C, Colardyn F, Remon JP: Light stability of molsidominein infusion fluids. J Pharm Pharmacol. 1993, *45*, S.486-488,

77 Mattson DL, Wu F: Nitric oxide synthase activity and isoforms in rat renal vasculatur. Hypertens. 2000, *35*, S.337-341,

78 Öztürk H, Aldemir M, Büyükbayram H et al.: The effects of the nitric oxide donor molsidomine prevent warm ischemia-reperfusion injury in the rat renal-A functional and histopathological study. Int Urol Nephrol. 2001, *32*, S.601-607,

79 Rangan GK, Wang Y, Harris DC: Pharmacological modulators of nitric oxide exacerbate tubuloinstertial inflammation in proteinuric rats. J Am Soc Nephrol. 2001, *12*, S.1696-1705,

80 Nori E, Peresleni T, Miller F, Goligorsky MS: In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodesoxynucleotides protects rat kidney against ischemia. J Clin Invest. 1996, *97*, S.1377-2383,

81 Vos IH, Joles JA, Schurink M, et al.: Inhibition of inducible nitric oxide synthase improves graft function and reduces tubulointerstitial injury in renal allograft rejection. Eur J Pharmacol. 2000, *391*, S.31-38,

82 Noiri E, Peresleni T, Miller F, Goligorsky MS: The role of nitric oxide in the pathogenesis of spontaneus murine autoimmune disease: Increased nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in MRL-lpr/lpr mice, and reduction of spontaneous glomerulonephritis and arthritis by orally administered NG-Monomethyl-L-Arginine. J Clin Invest. 1996, *97*, S.2377-2383,

83 Kashem A, Endoh M, Yano N, et al.: Expression of inducible-NOS in human glomerulonephritis. The possible source is infiltrating monocytes/macrophages. Kidney Int. 1996, *50*, S.392-399,

84 Peters H, Border WA, Rückert M et al.: L-Arginine supplementation accelerates renal fibrosis and shortens life span in experimental lupus nephritis. Kidney Int. 2003, *63*, S.1382-1392,

85 Nozik ES, Huang YC, Piantadosi CA: L-Arginine enhances injury in the isolated rappit lung during hypoxia. Respir Physiol. 1995, *100*, S.63-74,

86 Neilly PJ, Kirk SJ, Gardiner KR et al.: Manipulation of the L-arginine-nitric oxide pathway in experimental colitis. BR J Surg. 1995, *82*, S.1188-1191,

87 Zhang F, Casey RM, Ross ME, Iadecola S: Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. Stroke. 1996, *27*, S.317-323,

88 Reyes AA, Porras BH, Chasalow FI, Klahr S: L-Arginine decreases the infiltration of the kidney by macrophages in obstructive nephropathy and puromycin-induced nephrosis. Kidney Int. 1994, *45*, S.782-787,

89 Reyes AA, Klahr S: Dietary supplementation of L-arginine ameliorates renal hypertrophy in rats fed a high-protein diet. Proc Soc Exp Biol Med. 1994, *206*, S.157-161,

90 Katoh T, Takahashi k, Klahr S, et al.: Dietary supplementation with L-arginine ameliorates glomerular hypertension in rats with subtotal nephrectomy. J Am Soc Nephrol. 1994, *4*, S.1690-1694,

91 Wu G, Meininger CJ: Arginine nutrition and cardiovascular function. J Nutr. 2000, *130*, S.2626-2629,

92 De Nicolal, Bellizzi V, Minutolo R, et al.: Randomized, double-blind, placebo-controlled study of arginine supplementation in chronic renal failure. Kidney Int. 1999, *56*, S.674-684,

93 Eisenberger: Abstract. J Am Soc Nephrol. 1999, *10*, S.727-728A,

94 Ketteler M, Ikegaya N, Brees DK, Border WA, Noble NA: L-arginine metabolism in immune-mediated glomerulonephritis in the rat. Am J Kidney Dis. 1996, *28*, S.878-887,

95 Narita I, Border WA, Ketteler M, Ruoslahti E, Noble NA: L-arginine may mediate the therapeutic effects of low protein diets. Proc Natl Acad Sci USA. 1995, *92*, S.4552-4556,

96 Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA: Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. Kidney Int. 1994, *45*, S.916-927,

97 Benigni A, Perico N, Remuzzi G: Enothelin antagonists and renal protection. J Cardiovasc Pharmacol. 2000, *35*, S.75-78,

98 Sporn MB, Roberts AB: A major advance in the use of growth factors to enhance wound healing. J Clin Invest. 1993, *92*, S.2565-2566,

99 Romberger DJ: Fibronectin. Int J Biochem Cell Biol. 1997, *29*, S.939-943,

100 Baricos WH, Cortez SL, El-Dahr SS, Schnaper HW: ECM degradation by cultured human mesangial cells is mediated by a PA/plasmin/MM-2 cascade. Kidney Int. 1995, *47*, S.664-671,

101 Eitzman DT, McCoy RC, Zheng X, Fay WP, Shen T, Ginsburg D, Simon RH: Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. J Clin Invest. 1996, *97*, S.232-237,

102 Yamamoto T, Mundy CA, Wilson CB: Quantitative and qualitative studies of antibody induced mesangial cell damage in the rat. Kidney Int. 1987, *32*, S.514-525,

103 Eberhadt W, Beeg T, Beck KF et al.: Nitric oxide modulates expression of metalloproteinase-9 in rat mesangial cells. Kidney INt. 2000, *57*, S.59-69,

104 Arnal FJ, Warin L, Miche JB: Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. J Clin Invest. 1992, *90*, S.647-652,

105 Frei U, Schober-Halstenberg HJ: Nierenersatztherapie in Deutschland. Band QuaSi-Niere Jahresbericht 2001/2002. Berlin ,

106 United States Renal Data Systems: Annual Data Report 2003. Minneapolis, USA,

107 Green LC, Wagner DA, Glogowki J et al.: Analysis of nitrate, nitrite and 15N-nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 1982, *126*, S.131-138,

108 Watanabe N, Kamei S, Ohikubo A et al.: Urinary protein as measured with a pyrogallol-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automatic analyzer. Clin Chem. 1986, *32*, S.1551-1554,

109 Watanabe G, Tomiyama H, Doba N: Effects of oral administration of L-arginine on renal function in patients with heart failure. J Hypertens. 2000, *18*, S.229-234,

110 Maxwell AJ, Cooke JP: Cardiovascular effects of L-arginine. Curr Opin Nephrol Hypertens. 1998, *7*, S.63-70,

111 Sigmon DH, Gonzales-Feldman E, Cavasin MA, Potter DL, Beierwal WH: Role of nitric oxide in the renal hemodynamic response to unilateral nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2004, *15(6)*, S.1413-1420,

112 Six I, Van Belle E, Bordet R, Corseaux D, Callebert J, Dupuis B, Bauters C, Bertrand ME: L-Arginine and L-NAME have no effects on the reendotheliazation process after arterial balloon injury. Cardiovascular Research. 1999, *43*, S.731-738,

113 Ashab I, Peer G, Blum M et al.: Oral administration of L-arginine and captopril in rats prevents chronic renal failure by nitric oxide production. Kidney Int. 1995, *47*, S.1515-1521,

114 Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F: Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. Brain Res Bull. 2004, *62(6)*, S. 505-15,

115 Marletta, MA: Nitric oxide synthase structure and mechanism. J Biol Chem. 1993, *268*, S. 12231- 12234,

116 Murad, F: Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. Braz J Med Biol Res. 1999, *32* (11), S. 1317-1327,

117 Nathan C, Xie QW: Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem. 1994, *269*, S. 13725- 13728,

118 Malinski T, Taha Z: Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. Nature. 1992, *358* (6388), S. 676-678,

119 Sandau KB, Brune B: Molecular actions of nitric oxide in mesangial cells. Histol Histopathol. 2000, *15(4)*, S. 1151-1158,

120 Murad F: The excitement and rewards of research with our discovery of some of the biological effects of nitric oxide. Circ Res. 2003, *92(4)*, S. 339-341,

121 Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA: Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J Biol Chem. 1991, *266(7)*, S. 4244-4250,

122 Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: Nitric oxide: A physiologic messenger. Ann Intern Med. 1994; *120(3)*, S. 227-237

7 Erklärung an Eides Statt

Die vorliegende Arbeit ist von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt worden. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 16.12.2004

8 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

1. H. Peters, **U. Daig**, M. Rückert, F. Schäper, L. Liefeldt, S. Krämer H.-H. Neumayer. NO mediates the antifibrotic action of L-arginine supplementation in acute anti-thy-1 glomerulonephritis.
Kidney Int 64: 509-518 (2003)

2. H. Peters, R. Eisenberg, **U. Daig**, J. Gaedeke, L. Liefeldt, S. Krämer, H.-H. Neumayer. Platelet inhibition limits TGF-ß overexpression and matrix expansion following induction of anti-thy-1 glomerulonephritis.
Kidney In 65: 2238-48 (2004)

Abstracts/Poster

1. H. Peters, R. Eisenberg, **U. Daig**, M. Rückert und H.-H. Neumayer. Spezifische Thrombozytenhemmung vermindert TGF-ß-Überexpression bei anti-thy-1-Glomerulonephritis (GN). Med. Klinik 92: Abstract-Band 1: p 161 (2001)

2. H. Peters, **U. Daig**, F. Schäper, M. Rückert, J. Gaedeke, S. Krämer and H.-H. Neumayer. The beneficial effect of L-arginine supplementation in experimental glomerulonephritis is mainly mediated by nitric oxide. Kidney Blood Press Res 24: p 226 (2001)

3. H. Peters, R. Eisenberg, **U. Daig**, M. Rückert, J. Gaedeke and H.-H. Neumayer. Specific platelet inhibition limits matrix accumulation following induction of acute anti-thy-1 glomerulonephritis (GN). Kidney Blood Press Res 24: p 268 (2001)

4. H. Peters, **U. Daig**, F. Schäper, M. Rückert, J. Gaedeke, S. Krämer and H.-H. Neumayer. Nitric oxide mediates antifibrotic actions of L-arginine supplementation following induction of experimental glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol 12: p 713A (2001)

5. H. Peters, R. Eisenberg, **U. Daig**, M. Rückert and H.-H. Neumayer. Specific platelet inhibition limits TGF-ß overexpression following induction of anti-thy-1 glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol 12: p 713A (2001)

6. H. Peters, **U. Daig**, F. Schäper, M. Rückert, J. Gaedeke, S. Krämer und H.-H. Neumayer. Stickoxid (NO) vermindert die Überexpression von TGF-ß nach Induktion von anti-thy-1-Glomerulonephritis (GN). Med. Klinik 93: Abstract-Band 1: p 122 (2002)

7. H. Peters, S. Martini, M. Rückert, Y. R. Wang, **U. Daig**, S. Krämer, H.-H. Neumayer Matrix expansion in acute anti-thy-1 glomerulonephritis is partly mediated by lymphocytes. Kidney Blood Press Res 25: p 158 (2002)

8. S. Krämer, S. Martini, R. Woydt, M. Rückert, Y. R. Wang, **U. Daig**, F. Shimizu, H. Kawachi, H-H. Neumayer, H. Peters. MMF versus enalapril in chronic-progressive anti-thy-1 glomerulonephritis. Kidney Blood Press Res 25: p 160 (2002)

9. H. Peters, S. Martini, M. Rückert, Y. R. Wang, **U. Daig**, S. Krämer, H.-H. Neumayer. Lymphocytes mediate partly matrix expansion in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis (GN). J Am Soc Nephrol 13: p 133A (2002)

10. S. Krämer, S. Martini, R. Woydt, M. Rückert, Y. R. Wang, **U. Daig**, F. Shimizu, H. Kawachi, H-H. Neumayer, H. Peters. Effect of MMF on chronic progressive anti-thy-1 glomerulonephritis: Comparison with ACE inhibition. J Am Soc Nephrol 13: p 542A (2002)

11. S. Martini, S. Krämer, M. Rückert, Y. Wang, **U. Daig**, H.-H. Neumayer, H. Peters. Antifibrotischer Effekt von FTY720 bei akuter Anti-thy-1-Glomerulonephritis. Med. Klinik 98: Abstract-Band 1: p 079 (2003)

12. S. Krämer, S. Martini, R. Woydt, M. Rückert, Y. Wang, **U. Daig**, F. Shimizu, H. Kawachi, H.-H. Neumayer and H. Peters. MMF is as effective as enalapril in slowing the progression of chronic anti-thy-1 glomerulonephritis. Nephrol Dial Transpl 18: 588 (2003)

Danksagung

Mein Dank gilt dem gesamten Team des Nephrologischen Forschungslabors, Campus Charité Mitte. Ohne sie alle wäre diese Arbeit nicht gelungen.

Vor allem Tanja Loof und Stefanie Krämer bin ich für die exzellente Unterstützung bei zahlreichen laborchemischen Herausforderungen sehr verbunden, Matthias Rückert für seine geduldigen Erläuterungen, Sebastian Martini für die vielen humorvolle Momente, die in mancher Durststrecke sehr bereichernd waren, Pia Hambach und Christine Lehmann für die kollegiale Einführungsarbeit sowie Andrej Karpinski für seine unermüdliche technical and mental assistance bei problemorientierter Rechnertherapie.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Harm Peters, der die Durchführung dieser Arbeit möglich gemacht hat, mir mit Rat und Hilfe zur Seite stand und auch für produktive wissenschaftliche Diskussionen immer ein kompetenter Ansprechpartner war.