Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

HABILITATION

Wirkungen der L-Argininingabe bei immun-vermittelter akuter und chronischer Glomerulofibrose

Zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

Innere Medizin

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dr. med. Harm Peters
aus Sandhorst/Aurich

Präsident: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Meyer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. h.c. Eberhard Ritz

2. Prof. Dr. Gerhard A. Müller

Eingereicht am: 21.01.2000

Habiliation am: 12.12.2000

1. EINLEITUNG

1.1. Pathogenese und Therapie chronisch-fortschreitender Nierenerkrankungen
1.1.1 Histologische und molekulare Kennzeichen
1.1.2 Sequenz renaler Wundheilung
1.1.3 Therapeutische Ansätze bei chronischer Nierenfibrose

1.2 Renaler L-Argininstoffwechsel
1.2.1 L-Arginin-NO-Stoffwechsel
1.2.2 L-Arginin-L-Ornithin-Stoffwechsel
1.2.3 L-Arginin-Agmatin-Stoffwechsel

1.3 Wirkung von L-Arginin bei experimentellen Nierenkrankheiten

1.4 Fragestellung

2. MATERIAL, VERSUCHSPROTOKOLLE UND METHODEN

2. 1 Materialien

2.2 Tiermodelle
2.2.1 Anti-Thy1-Glomerulonephritis der Ratte
2.2.2 Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus

2.3 Studienprotokolle
2.3.1 Vorarbeiten
2.3.2 Wirkung der L-Argininingabe auf die Mesangialzellschädigung bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Protokoll 1)
2.3.3 Wirkung der L-Argininingabe auf die TGF-ß-Expression und Matrixexpansion nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis(Protokoll 2)
2.3.4 Wirkung der L-Argininingabe auf den Verlauf der Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus (Protokoll 3)

2.4 Methoden
2.4.1 Diäten
2.4.2 Anti-Thy1-Antikörper
2.4.3 Akute Anti-Thy1-Glomerulonephritis
2.4.4 Blutdruckmessung
2.4.5 Proteinurie und Albuminurie
2.4.6 Nieren- und Blutentnahme
2.4.7 Isolation und Kultur der Glomeruli
2.4.8 Kortikale Präparation
2.4.9 Bestimmung von TGF-ß1-, Fibronektin- und PAI-1-Protein
2.4.10 Bestimmung von TGF-ß1-, Fibronektin-, PAI-1- und NOS II-mRNA
2.4.11 Histologische Untersuchungen
2.4.12 Plasma-L-Argininbestimmung
2.4.13 Antikörper gegen Doppelstrang-DNS
2.4.14 Nitrit- und Nitratbestimmung
2.4.15 Statistische Analyse

3. ERGEBNISSE
3.1.1 Isolation von Glomeruli einzelner Tiere
3.1.2 Matrixproteinsynthese kultivierter Glomeruli im Zeitverlauf

3.1.3 Vergleich der Matrixproteinsynthese kultivierter Glomeruli mit dem glomerulärem Matrixproteingehalt
3.1.4 Matrixproteinexpression im Zeitverlauf der Anti-Thy1-Glomerulonephritis
3.1.5 Vergleich steigender OX-7-Dosen auf die Matrixproteinsynthese am Tag 6 nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis

3.2 Wirkung der L-Argininingabe auf die Anti-Thy1-induzierte Mesangialzellschädigung bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Protokoll 1)
3.2.1 Basisdaten
3.2.2 Materialentnahme sechs Stunden nach Induktion der Glomerulonephritis
3.2.3 Materialgewinnung sechs Tage nach Induktion der Glomerulonephritis

3.3 Wirkung der L-Argininingabe auf die TGF-ß1-Expression und Matrixexpansion nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Protokoll 2)
3.3.1 Basisdaten
3.3.2 Plasma-L-Argininspiegel
3.3.3 Systolischer Blutdruck
3.3.3 Proteinurie
3.3.4 Marker der Matrixvermehrung sechs Tage nach Induktion der Glomerulonephritis
3.3.5 Parameter der NO-Synthese

3.4 Wirkung der L-Argininingabe auf den Verlauf der Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus (Protokoll 3)
3.4.1 Basisdaten
3.4.2 Albuminurie
3.4.3 Überlebensanalyse
3.4.4 Marker der Matrixakkumulation
3.4.5 Anti-dsDNS-Antikörper
3.4.6 Parameter der NO-Synthese

4. DISKUSSION

4.1 Methodenkritik
4.1.1 Tiermodelle
4.1.2 Messung der Fibroseaktivität bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis
4.1.3 Maximierung der Differenz zwischen normaler und nephritischer Matrixproteinexpression
4.1.4 Expression von TGF-ß1 als zentraler Meßparameter

4.2 Wirkung der L-Argininingabe bei immun-vermittelter akuter und chronischer Glomerulofibrose
4.2.1 Wirkung der L-Argininingabe auf die Mesangialzellschädigung bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Protokoll 1)
4.2.2 Wirkung der L-Argininingabe auf die TGF-ß1-Expression und Matrixexpansion nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Protokoll 2)
4.2.3 Wirkung der L-Argininingabe auf den Verlauf der Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus (Protokoll 3)

4.3 Bedeutung der experimentellen Ergebnisse für humane Nierenerkrankungen

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Hintergrund und Fragestellung

5.2 Methoden und Ergebnisse

5.3 Schlußfolgerungen

6. REFERENZEN

Abkürzungen:

ACE	= Angiotensin converting enzyme
ADC	= Arginin-Decarboxylase
AGE	= Advanced glycosylation end product
+Arg	= L-Argininingabe
GFR	= glomeruläre Filtrationsrate
GN	= Glomerulonephritis
GN-NP	= Glomerulonephritis mit Normalproteindiät
GN-LP	= Glomerulonephritis mit Niedrigproteindiät
GAPDH	= Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase
LN	= Lupusnephritis
LN-NP	= Lupusnephritis mit Normalproteindiät
LN-LP	= Lupusnephritis mit Niedrigproteindiät
MCP-1	= Monocyte chemoattractant protein-1
MW	= Mittelwert
NO	= Stickoxid (nitric oxide)
NOS	= NO-Synthase
NOS I	= neuronale NOS
NOS II	= induzierbare NOS
NOS II	= endotheliale NOS

L-NAME = L-Nitro-Arginin-Methylester

L-NMMA = L-Nitro-Monomethyl-Arginin

OAT = Ornithin-Aminotransferase

ODC = Ornithin-Decarboxylae

PAI-1 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1

PBS = Phophat-buffered saline

PDGF = Platelet-derived growth factor

TGF-ß = Transforming growth factor-ß

1. Einleitung

Die Glomerulonephritis ist eine der häufigsten Ursachen des terminalen Nierenversagens. Wie andere chronische Nierenerkrankungen sind viele Formen der Glomerulonephritis durch einen progressiven Funktionsverlust bis zum vollständigen Organversagen gekennzeichnet[1;2]. Trotz deutlicher Fortschritte in dem Verständnis der Pathogenese von chronischer Glomerulonephritis kann mit den heutigen Therapiemöglichkeiten die Geschwindigkeit der Funktionsverschlechterung nur verlangsamt, nicht jedoch aufgehalten werden[1;3-7].

Die Gabe von L-Arginin hat kürzlich in einer Reihe von hypertensiven Modellen renaler Erkrankungen günstige Effekte auf die gestörte Hämodynamik und renale Matrixexpansion gezeigt[8-20]. L-Arginin ist eine semi-essentielle Aminosäure und ist Vorstufe für eine Reihe von Metaboliten, die im Verlauf von Nierenleiden eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Hierzu gehören das "ambivalente" NO (Vasodilatator und zytotoxisches Effektormolekül), Polyamine (Proliferationsmediatoren), L-Prolin (wichtigster Kollagenbaustein) und möglicherweise auch Agmatin (Hemmstoff anderer L-Argininstoffwechselwege)(Übersicht in[21-26]).

In dieser Habilitationsarbeit wurde geprüft, ob die Gabe von L-Arginin auch bei akuter und chronischer Glomerulonephritis/Glomerulofibrose von Nutzen sein könnte. Bevor die genaue Fragestellung dieser Arbeit näher definiert wird, soll zunächst ein aktueller Überblick der Pathogenese und Therapie von chronisch-fortschreitenden Nierenerkrankungen und zur Rolle des renalen L-Argininstoffwechsels gegeben werden.

1.1. Pathogenese und Therapie chronisch-fortschreitender Nierenerkrankungen

1.1.1 Histologische und molekulare Kennzeichen

Die Funktionsverschlechterung bei chronischer Glomerulonephritis geht, wie bei der diabetischen oder hypertensiven Nephropathie, auf histologischer Ebene uniform mit einer zunehmenden Bindegewebsvermehrung bzw. Nierenfibrose einher[1;2]. In der

Niere korreliert insbesondere die Zunahme von Narbengewebe im Tubulointerstitium eng mit dem Grad der renalen Funktionseinschränkung[27]. Durch verbesserte Methodik konnte in den letzten Jahren aufgezeigt werden, daß auf molekularer Ebene dem uniformen histologischen Bild der Nierenfibrose ein gleichermaßen relativ uniformer Prozeß mit Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen zugrunde liegt[2]. Die Akkumulation von extrazellulärer Matrix resultiert dabei aus drei wichtigen Einzelkomponenten[2;28]:

1. einer gesteigerten Synthese von Matrixproteinen (u. a. Fibronektin, Proteoglykane, Kollagen I, III und IV, Laminin, Vitronectin, Tenascin, Heperansulfat);

2. eines gehemmten Matrixabbaus durch die verminderte Bildung von Gewebsproteinasen (z. B. Matrix-Metalloproteinasen = MMP´s, MMP-1 = Kollagenase I, MMP-2 = Gelatinase A, MMP-9 = Gelatinase B, Elastase, Serin-Proteasen) und durch die gesteigerte Bildung von Protease-Inhibitoren (z. B. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases = TIMP´s, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Type-1 = PAI-1);

3. der 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).

Das Konzept, daß fortschreitender Funktionsverlust von fibrotischem Organumbau begleitet wird, ist nicht allein auf die Niere beschränkt. In vergleichbarer Weise findet sich dieser Zusammenhang auch bei der chronischen Abnahme der Auswurfleistung des Herzens (Myokardfibrose), des Gasaustausches der Lunge (Lungenfibrose) und der Entgiftungs- und Syntheseleistung der Leber (Leberzirrhose)[2].

Die Überexpression des profibrotischen Zytokins TGF-ß nimmt wahrscheinlich eine Schlüsselrolle bei der Matrixakkumulation in der Niere und anderen Organen ein[2;28]. In verschiedenen Zellkultursystemen konnte TGF-ß als besonders starker Stimulator der Matrixproduktion sowie als potenter Inhibitor des Matrixabbaus identifiziert werden[29]. In-vivo-Daten deuten in die gleiche Richtung. Im Modell der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis wurde erstmals dokumentiert, daß durch die spezifische Hemmung von TGF-ß, z.B. mittels TGF-ß-neutralisierender Antikörper oder den natürlich vorkommenden TGF-ß-Antagonisten Decorin, die Matrixvermehrung

signifikant vermindert werden kann[30]. Im Modell der diabetischen db/db-Maus konnte kürzlich die profibrogene Schlüsselrolle von TGF-ß auch bei chronischer renaler Matrixexpansion dokumentiert werden[31]. In diesem Modell wurde TGF-ß darüber hinaus als wichtigster Mediator der diabetischen Nierenhypertrophie identifiziert. Vergleichbare günstige Wirkungen von Anti-TGF-ß-Strategien wurden mittlerweile auch für die Fibrose des Herzens, der Lunge, der Leber, der Gefäße und des Gehirns belegt[2;29].

1.1.2 Sequenz renaler Wundheilung

Die Expansion extrazellulärer Matrix in der Niere und anderen Organen findet sich als relativ uniforme Antwort auf unterschiedlichste Schädigungsreize, wie z. B. Hypertension, Hyperglykämie oder Inflammation[26]. Oft findet sich auch eine gesteigerte Zellproliferation[32]. Dabei ist die renale Matrixexpansion Teil eines normalen Wundheilungsprozesses, der zeitlich gestaffelt aus Phasen der Schädigung, Matrixexpansion und schließlich der Resolution mit Normalisierung der extrazellulären Matrixmenge und der Zellzahl besteht.

Bei akuten, reversiblen Erkrankungen ist die Schädigungsphase oft zeitlich begrenzt und die Wundheilung mit Normalisierung von Funktion und Struktur gelingt[26;33]. Ein gut charakterisiertes Modell für eine akute, reversible Form der renalen Matrixexpansion ist die Anti-Thy1-Glomerulonephritis der Ratte[34]. Induziert wird diese Form der Glomerulonephritis durch die Injektion von Antikörpern, die gegen das Thy1-Epitop von Mesangialzellen gerichtet sind. Diese führen zu einer kurzzeitigen, NO-vermittelten Lyse von Mesangialzellen **(Schädigungsphase)**[35]. Es folgt eine zeitlich relativ klar abgegrenzte Phase der Matrixexpansion im Glomerulum **(Matrixexpansionsphase)**. Während der Schädigungs- und Matrixexpansionsphase besteht kein erhöhter Blutdruck, so daß das Ausmaß der glomerulären Matrixvermehrung im wesentlichen der Antikörper-induzierten Mesangialzellschädigung zugeschrieben wird. Den Höhepunkt erreicht die Matrixexpansion 5-10 Tage nach Antikörperinjektion. Im weiteren Verlauf (innerhalb von ca. 2 Monaten) normalisiert sich der glomeruläre Matrixgehalt wieder **(Ausheilungsphase)**. Die zeitliche Staffelung der Wundheilungssequenz bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis ermöglicht es, die einzelnen Phasen der renalen Wundheilung spezifisch zu untersuchen.

Im Gegensatz zu akut, reversiblen Erkrankungen wirken die Schädigungsreize bei chronisch-fortschreitenden Krankheiten in der Regel kontinuierlich auf die Niere ein. Als Folge finden sich parallel und fortlaufend ablaufende Reparatursequenzen mit fortwährender Matrixexpansion. Die Wundheilung gelingt nur unvollständig. Es kommt zur Verselbständigung der Matrixvermehrung, die schließlich in einer kompletten Organfibrose mündet. In diesem Konzept wird die Nierenfibrose als ein „zuviel an normaler Wundheilung" verstanden[2].

Ein gut etabliertes Modell für eine chronisch-fortschreitende Form der renalen Matrixexpansion ist die Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus. Dieser Mäusestamm entwickelt spontan eine Erkrankung, die dem humanen systemischen Lupus erythematodes sehr verwandt ist und zur Immunkomplexnephritis führt[36]. Wie bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis wird auch hier der immunologische Nierenschaden über die Produktion von zytotoxischen Mengen NO vermittelt[37]. In Folge der fortwährenden Nierenschädigung kommt es zu einer chronisch-fortschreitenden Matrixvermehrung, die von einer zunehmenden Einschränkung der Nierenfunktion begleitet wird[38]. Die Mäuse versterben schließlich an den Folgen der Urämie.

Beim Fortschreiten von akuter zu chronischer Matrixvermehrung nimmt die Überexpression von TGF-ß eine Schlüsselrolle ein. Während bei akuten, reversiblen Nierenerkrankungen, wie der Anti-Thy1-Glomerulonephritis, sich die TGF-ß-Spiegel wieder normalisieren und die Matrixexpansion beendet wird, findet sich bei chronisch

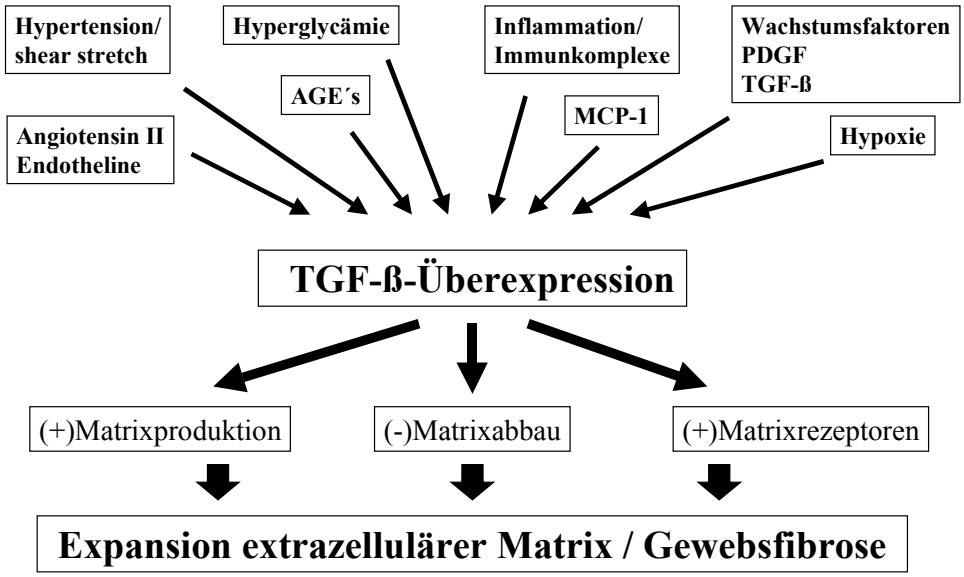

Abb. 1: Schlüsselrolle von TGF-ß zwischen renaler Gewebsschädigung (oben) und Matrixvermehrung (unten).

fortschreitenden Nierenleiden, wie der Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus, ein Fortbestehen der TGF-ß-Überexpression mit fortlaufender Matrixvermehrung. Eine Schlüsselrolle nimmt die Überexpression von TGF-ß auch im zeitlichen Ablauf der Wundheilungssequenz ein (Abb. 1) Für eine Reihe von bekannten, die Niere schädigende Faktoren wurde gezeigt, daß sie direkt die Expression von TGF-ß induzieren (Übersicht in[26;29]). Hierzu gehören u. a. hämodymanische Faktoren (shear stress, mesangialer Zellstretch), Wachstumsfaktoren (platelet-derived growth factor, Angiotensin II, Endotheline), Chemokine (macrophage chemotactic protein-1), hohe Glucose-Spiegel, Hypoxie, AGE´s und Immunmediatoren (Immunkomplexe, freie Radikale). Die Überexpression von TGF-ß wiederum vermittelt dann die renale Matrixexpansion.

1.1.3 Therapeutische Ansätze bei chronischer Nierenfibrose

In der Behandlung von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz sind heute nur die ACE-Hemmer-Behandlung und die Restriktion der Eiweißzufuhr etabliert[1;3-7]. Mit beiden Therapieformen kann die Progression der chronischen Niereninsuffizienz nur verlangsamt, nicht jedoch aufgehalten oder gar rückgängig gemacht werden.

In mehreren große klinischen Studien konnte für die ACE-Hemmer-Therapie ein günstiger Einfluß auf die Progression chronischer Nierenerkrankungen dokumentiert werden[3-5;7]. Gezeigt wurden signifikante Einflüsse der ACE-Inhibition auf die Proteinausscheidung, den Abfall der GFR sowie die Inzidenz von terminalem Nierenversagen. Auch für die Beschränkung der diätetischen Proteinzufuhr konnten günstige Wirkungen auf die Progression von chronischen Nierenerkrankungen in mehreren, wenn auch nicht allen, klinischen Studien belegt werden[3;6;39].

Tierexperimentelle Daten haben gezeigt, daß der günstige Effekt der ACE-Hemmung und der Proteinrestriktion sehr eng mit der Verminderung renaler Matrixexpansion und TGF-ß-Expression korrelieren[40;41] und möglicherweise hierüber auch vermittelt wird. Für die ACE-Hemmung konnten kürzlich bei humaner IgA-Nephropathie vergleichbare Ergebnisse erhoben werden[42]. Diese Daten sind im Einklang mit dem Konzept dieser Arbeit, daß TGF-ß-Überexpression und Matrixexpansion eine zentrale Rolle für die Verschlechterung der Nierenfunktion bei chronischer Nierenkrankheit spielen.

Infolge deutlicher Fortschritte in dem Verständnis chronischer Nierenleiden wurden in den letzten Jahren eine Reihe von neuen und vielversprechenden Ansätzen zur Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz identifiziert. Vielbeforschte Kandidaten sind neben der in dieser Arbeit im Vordergrund stehenden Gabe von L-Arginin u. a. Endothelin-Rezeptor-Blocker, TGF-ß-neutralisierende Strategien, Chemokine-Rezeptor-Antagonisten sowie antiproliferative Ansätze[26;29]. Im folgenden soll zunächst ein Überblick über den L-Argininstoffwechsel gegeben werden.

1.2 Renaler L-Argininstoffwechsel

Die Aminosäure L-Arginin ist über seine endogenen Metabolite NO, Polyamine, L-Prolin und Agmatin in vielschichtiger Weise mit renaler Physiologie und Pathophysiologie verbunden (Abb. 2). Die körpereigene L-Argininproduktion findet im wesentlichen in den proximalen Tubuluszellen der Niere statt[26]. In geringerem Umfang wird L-Arginin auch von Endothelzellen und Makrophagen gebildet. L-Arginin ist eine semi-essentielle Aminosäure[21;26;43]. Unter physiologischen Verhältnissen ist die körpereigene L-Argininproduktion ausreichend, um das metabolische Gleichgewicht aufrecht zu erhalten. Die L-Argininsynthese ist jedoch so gering, daß bei erhöhtem Verbrauch die Zufuhr mit der Nahrung essentiell für die Unterhaltung der verschiedenen L-Argininstoffwechselwege wird.

1.2.1 L-Arginin-NO-Stoffwechsel

1.2.1.1 Synthese und Wirkung von NO

Unter physiologischen Bedingungen werden ca. 1% der täglichen L-Argininzufuhr zu NO verstoffwechselt[44]. Die Reaktion wird durch NADPH-abhängige Oxidoreduktasen unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff vermittelt. Co-Faktoren sind eine Cytochrom-P-450-Hämgruppe, Calmodulin, FAD, FMA und Tetrahydrobiopterin[45;46]. Die Nicht-Protein-Aminosäure L-Citrullin ist Co-Produkt.

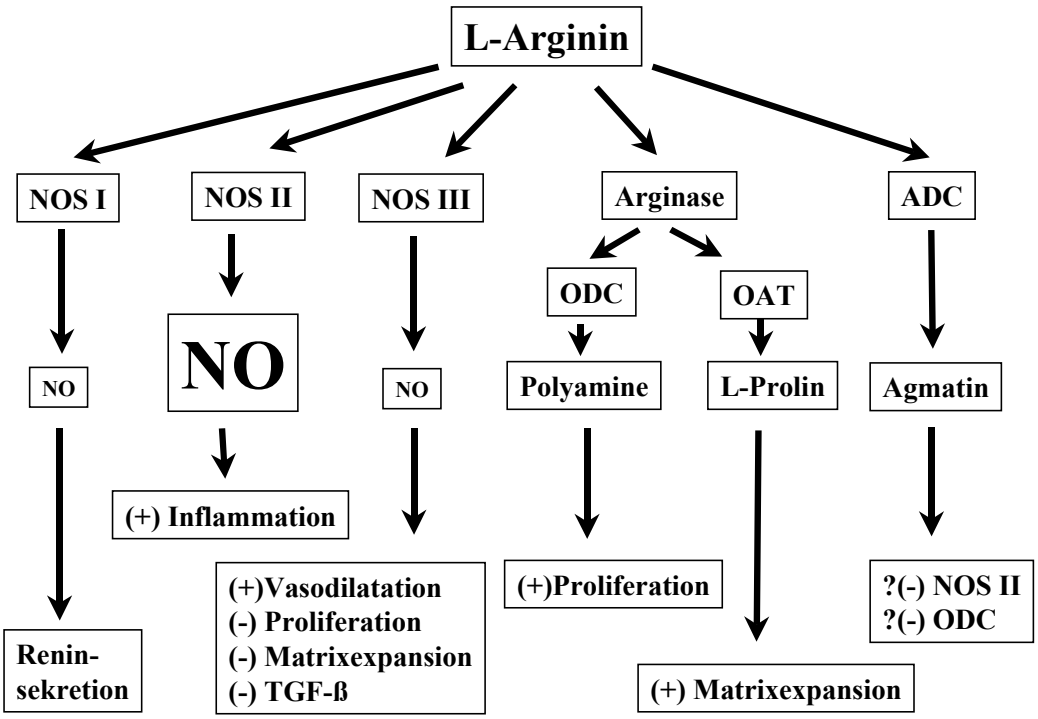

Abb. 2: L-Argininstoffwechsel in Relation zu pathophysiologisch wichtigen Ereignissen bei renaler Gewebsschädigung und Matrixexpansion.

NO ist ein hoch reagibles, gasförmiges Molekül mit wichtiger lokaler Messenger- und Effektorfunktion (Übersicht in[21-23;45]). NO spielt u. a. eine zentrale Rolle bei der Neurotransmission, Vasodilatation, Inflammation und Regulation des zellulären Phänotyps. Aufgrund seines hohen Diffusionskoeffizienten kann NO frei durch die meisten Gewebe diffundieren. Seine Wirkung ist jedoch lokal begrenzt, da es beim Eintritt ins Gefäßlumen rasch durch die Hämgruppen des Hämoglobins inaktiviert wird.

NO ist ein "ambivalentes" Molekül, das in niedrigen, physiologischen Konzentrationen überwiegend als Signalmolekül fungiert[21-23;45]. Wichtigster Signaltransduktionsweg für NO ist die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase. Steigende cGMP-Spiegel vermitteln wichtige NO-Effekte, wie z.B. die Relaxation glatter Muskelzellen sowie die Hemmung der Thrombozytenaggregation und Leukozytenmigration[45]. In hohen

Konzentrationen wird NO zu einem wichtigen Effektormolekül des Immunsystems mit einer Schlüsselrolle bei der Infektabwehr und der Autoimmunität. Ein Großteil der zytostatischen und zytotoxischen Wirkung von NO wird der Reaktion mit Superanionen zur Bildung des starken Oxidants Peroxynitrit zugeschrieben[45;47;48]. Beide Radikale, Peroxynitrit und NO, hemmen u. a. Schlüsselenzyme der Atmungskette durch Inaktivierung ihrer eisenhaltigen katalytischen Zentren (Aconitase, Cytochrome), führen zur DNA-Fragmentation und induzieren Apoptose[26;45;49]. NO hemmt darüber hinaus die Integrin-vermittelte Einbettung von Zellen in ihre lokale extrazelluläre Umgebung[50].

1.2.1.2 NOS-Isoenzyme

In der Niere sind mindestens drei strukturell unterschiedliche NO-Synthasen identifiziert worden (Übersicht in[21;22;26;45;51]).

1.2.1.2.1 NOS I: neuronale NO-Synthase

Das von der NOS I produzierte NO ist ein wichtiger Neurotransmitter bei Gedächtnisleistungen, Lernen und im Sexualverhalten[45]. In der Niere wird die NOS I überwiegend in der Makula Densa exprimiert und ist an der Regulation des tubulo-glomerulären Feedbacks und der Renin-Produktion beteiligt[45]. Die NOS I, wie auch die weiter unten beschriebene NOS III, wird überwiegend konstitutiv exprimiert und produziert NO rasch einsetzend, in kleinen Mengen und über kurze Zeiträume. Die Aktivität der NOS I und NOS III wird durch Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels reguliert. Im geringeren Umfang findet sich auch eine transkriptionelle Regulation, z. B. durch Veränderungen der Salzzufuhr oder bei Gewebshypoxie. NOS I-knock-out-Mäuse haben einen normalen Blutdruck und sind weniger empfindlich auf zerebrale Ischämie[52].

1.2.1.2.2 NOS II: induzierbare NO-Synthase

Das der von NOS II gebildete NO ist ein wichtiger Effektormechanismus des

Immunsystems[21;22;45;48;51]. Die Expression der NOS II wird über pro-inflammatorische Stimuli, wie LPS oder Tumor Necrosis Factor-α, Interleukin-1 und γ-Interferon, unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-$\kappa\beta$ induziert. Die NOS II produziert NO in hoher Konzentration und über längere Zeiträume. Ihre Aktivität ist stark vom extrazellulären L-Argininangebot abhängig[33]. Mäuse mit einem NOS II-knock-out reagieren empfindlicher auf intrazelluläre Mikroben und zeigen einen verminderten Blutdruckabfall nach LPS-Gabe[52]. Bei experimenteller und humaner Nephritis wurde die Expression der NOS II in infiltrierenden Makrophagen und in Mesangial- und Tubuluszellen dokumentiert[45;53]. Wie bereits unter 1.1.2 aufgeführt, wird die Gewebsschädigung bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis und der MRL/lpr-Lupusnephritis ganz wesentlich durch die NOS II vermittelt[33;35;54].

1.2.1.2.3 NOS III: endotheliale NO-Synthase

Das von der NOS III im Gefäßbett gebildete NO ist ein wichtiger Vasodilatator[21;22;26;45;51]. Mäuse mit NOS III-Gen-knock-out haben einen erhöhten Blutdruck und erleiden frühzeitig eine zerebrale Ischämie[52]. In der Niere vermittelt die endotheliale NO-Synthese eine Zunahme des effektiven renalen Plasmaflusses und der glomerulären Filtrationsrate. Als Folge wird der glomeruläre Filtrationsdruck gesenkt. Zusätzlich ist die NOS III wahrscheinlich der wichtigste Gegenspieler der vasokonstriktorischen Wirkung von Angiotensin II an der efferenten Arteriole.

Neben der Bedeutung für die renale Hämodynamik vermittelt die endotheliale NO-Synthese wahrscheinlich auch wichtige antifibrotische und antiproliferative Wirkungen. In verschiedenen renalen Zellkultursystemen ist gezeigt worden, daß NO dosis- und zeitabhängig die Matrixproteinsynthese vermindert[55;56]. Diese Wirkung ist wahrscheinlich Folge einer NO-vermittelten Abnahme der TGF-ß-Expression[57]. Vielfach wurde auch eine proliferationshemmende Wirkung von NO auf renale Zellen in-vitro belegt[58-60]. Proliferation und Matrixvermehrung sind zentrale Kennzeichen vieler chronischer Nierenkrankheiten, so daß über die endotheliale NOS III auch parakrin günstige Wirkungen der L-Argininingabe vermittelt sein könnten.

1.2.2 L-Arginin-L-Ornithin-Stoffwechsel

Über eine Gruppe von Arginasen wird L-Arginin auch zu L-Ornithin und Harnstoff

verstoffwechselt (Übersicht in[53;61]). Während die Arginase I hauptsächlich in der Leber als Teil des Harnstoffzyklus aktiv ist, findet sich die Arginase II in Makrophagen und verschiedenen Nierenzellen.

Die Bildung von L-Ornithin ist der erste Schritt zur Synthese von Polyaminen und L-Prolin. Polyamine (Putreszin, Spermin und Spermidin) sind von essentieller Bedeutung für die Zellteilung und Differenzierung[62] und daher möglicherweise wichtig für die proliferative Antwort nach Gewebsverletzung. Schlüsselenzym für die Polyaminbildung ist die L-Ornithin-Decarboxylase (ODC)[61]. Viele Wachstumsfaktoren führen zu einer raschen und substantiellen Zunahme der ODC-Aktivität. Die ODC-Aktivität ist hoch in proliferierenden und niedrig in ruhenden Zellen. Es gibt Hinweise, daß der L-Arginin-L-Ornithin-Stoffwechselweg auch über die L-Argininzufuhr mit der Nahrung reguliert wird. So konnte in einem Mäuse-Tumormodell dokumentiert werden, daß die L-Argininrestriktion über verminderte L-Arginin- und Polyaminspiegel das Tumorwachstum verminderte[63].

L-Ornithin wird endogen auch zu L-Prolin verstoffwechselt[53;61]. Die Reaktion wird über die L-Ornithin-Amino-Transferase (OAT) und die P5C-Reduktase vermittelt. L-Prolin macht ca. 11-13% der Aminosäureresiduen von Säuger-Kollagen aus. Hydroxyliertes L-Prolin (4-Hydroxy-L-Prolin) macht weitere 8-10% der Residuen aus. In kultivierten Knorpelzellen werden mehr als 20% des Kollagen-L-Prolins aus L-Ornithin gebildet[64]. Ob dieser Stoffwechselweg über das L-Argininangebot mit der Nahrung reguliert wird, ist unklar.

1.2.3 L-Arginin-Agmatin-Stoffwechsel

Die Decarboxylierung von L-Arginin mittels spezifischer L-Arginin-Decarboxylasen (ADC) zu Agmatin wurde in Säuger-Geweben erstmals vor 6 Jahren belegt[65]. Agmatin bindet an Alpha-2-Adrenorezeptoren und Imidazol-Guanidin-Rezeptoren. Die Niere hat eine hohe ADC-Aktivität[66]. Bislang ist jedoch nur wenig über die physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Agmatin und ihre Beeinflußbarkeit durch Veränderungen der L-Argininzufuhr bekannt. Erste Daten zeigen, daß Agmatin die glomeruläre Filtration und die tubuläre Reabsorption erhöht[67;68]. In-vitro-Daten belegen, daß Agmatin die NOS II und die Polyaminsynthese hemmt[69;70]. Beides sind Effekte, die sich potentiell günstig auf den Verlauf von Nierenerkrankungen auswirken könnten.

1.3 Wirkung von L-Arginin bei experimentellen Nierenkrankheiten

Die Gabe von L-Arginin hat seit Beginn der neunziger Jahre in einer Reihe von

Modellen hypertensiver Nierenerkrankungen günstige Effekte auf die gestörte Hämodynamik und pathologische Matrixexpansion gezeigt[8-20]. In Pionierarbeiten bei Ratten mit subtotaler Nephrektomie führte die Gabe von 1% L-Arginin im Trinkwasser zu verbessertem renalen Blutfluß, höherer GFR, weniger Proteinurie und geringerer Nierenfibrose[8]. In Folgearbeiten wurde gezeigt, daß die L-Argininingabe bei Dahl/Rapp-Ratten mit Salz-sensitivem Hypertonus den Blutdruck normalisiert und die Entwicklung von Nephrosklerose verhindert[14;71]. Bei Tieren mit Cyclosporin-A-Nephrotoxizität führte die L-Argininfütterung zur deutlichen Besserung der beeinträchtigten Hämodynamik[15]. Bei Raten mit bilateraler Ureter-Obstruktion oder Puromycin-Nephrose bewirkte L-Arginin signifikante Verbesserungen von GFR und renalem Plasmafluß[10;11]. In beiden Modellen wurde auch eine starke Verminderung der Makrophagen-Infiltration beobachtet. Bei Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes war die L-Argininingabe mit geringerer Proteinausscheidung verbunden[13].

Allen diesen Modellen renaler Erkrankungen ist gemeinsam, daß erhöhter Blutdruck eine wichtige Rolle als Schädigungsreiz für die Niere spielt[26]. Es wird daher angenommen, daß die günstige Wirkung von L-Arginin über eine verstärkte endotheliale NO-Synthese vermittelt wird. Diese senkt den renalen und glomerulären Druck und führt so über einen geringeren hypertensiven Nierenschaden zu geringerer Nierenfibrose. Unbeantwortete Fragen in diesem Zusammenhang sind, ob 1) die Gabe von L-Arginin, ähnlich wie es für die Angiotensin II-Blockade gezeigt wurde, antifibrotische Wirkungen auch in Abwesenheit von Bluthochdruck ausübt und ob 2) die antifibrotische Wirkung von L-Arginin über eine verminderte Expression von TGF-ß vermittelt wird?

Ziel dieser Arbeit war es, den potentiellen Nutzen der L-Argininingabe bei akuter und chronischer Glomerulonephritis/Glomerulosklerose zu prüfen. Für die L-Argininingabe sind wichtige anti-inflammatorische Eigenschaften belegt worden. Hierzu gehören die Hemmung der Makrophagen–Einwanderung und der Chemokine-Expression sowie die Stimulation der Kortisolproduktion[10;72]. Andererseits lassen andere Vorarbeiten vermuten, daß sich die Gabe von L-Arginin bei Glomerulonephritis vielleicht sogar negativ auswirken könnte [35;37]. So führte bei Anti-Thy1-Glomerulonephritis die Vorbehandlung mit dem NO-Synthase-Hemmer L-NMMA zur signifikanten Verringerung der Mesangialzellyse und der nachfolgenden Matrixvermehrung[35]. Bei muriner Lupusnephritis bewirkte die NOS-Hemmung mittels L-NAME eine Verminderung der Proteinurie, der histologischen Fibrosezeichen sowie der Sterblichkeit der Tiere[37]. Vor diesem Hintergrund wurden die drei folgenden, offenen formulierten Fragestellungen entwickelt.

1.4 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der L-Argininingabe für die akute und chronisch-fortschreitende Matrixexpansion bei immun-vermittelter Glomerulonephritis/ Glomerulosklerose zu untersuchen. Im Modell der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis der Ratte und der chronisch-progredienten Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus wurden das therapeutische Potential, die proinflammatorischen Risiken sowie die zugrunde liegenden Mechanismen der L-Argininingabe charakterisiert.

Die drei folgenden, offen formulierten Fragestellungen wurden untersucht:

1. Welche Wirkung hat die Gabe von L-Arginin auf die kurzzeitige, NO-vermittelte Nierenschädigung? In diesem Protokoll wurde L-Arginin bei Ratten mit Anti-Thy1-Glomerulonephritis vor der Injektion der Anti-Thy1-Antikörper gegeben **(Protokoll 1, Vorbehandlung)**[33]. Der Nierenschaden wurde anhand der Zahl von lysierten Mesangialzellen bestimmt. Gefragt wurde: Führt die L-Argininingabe zu einer Verstärkung der Mesangialzellyse? Wenn ja, ist dieses über ein größeres Substratangebot für die NOS II oder eine stärkere NOS II-Expression vermittelt? Wenn nein, gehen protektive Wirkungen der L-Argininingabe mit einer geringen Infiltration von Makrophagen einher? Führt die stärkere Nierenschädigung auch zu einer stärkeren Matrixexpansion im Verlauf der Glomerulonephritis, bzw. bedeutet die verminderte Mesangialzellyse auch weniger nachfolgende Matrixexpansion?

2. Welche Wirkung hat die Gabe von L-Arginin auf die vom Blutdruck unabhängige, immunologisch-induzierte Matrixexpansion[73;74]? In diesem Protokoll wurde L-Arginin während der Matrixexpansionsphase der Anti-Thy1-Glomerulonephritis gegeben. Die L-Argininingabe wurde 24 Stunden nach Antikörpergabe **(Protokoll 2, Nachbehandlung)** und damit nach abgelaufener Mesangialzellschädigung begonnen. Wie in Protokoll 1, waren hier sowohl günstige als auch ungünstige Wirkungen von L-Arginin vorstellbar. Gefragt wurde: Führt die L-Argininingabe zu einer Zunahme der renalen Matrixakkumulation? Wenn ja, geht dieses mit einer gesteigerten Bildung von Polyaminen und L-Prolin einher? Oder führt die L-Argininingabe zu einer verminderten Matrixexpansion? Wenn ja, ist dieses über eine verstärkte endotheliale NOS-Aktivität vermittelt? Gehen antifibrotische Wirkungen mit verminderter Expression des profibrotischen Zytokins TGF-ß einher? Wie ist

die antifibrotische Wirksamkeit von L-Arginin im Vergleich zum Therapiestandard Eiweißrestriktion?

3. Welche Wirkung hat die Gabe von L-Arginin bei fortwährender NOS-II-vermittelter Nierenschädigung auf die chronisch-fortschreitende Matrixexpansion? In diesem Protokoll wurde L-Arginin bei MRL/lpr-Mäusen mit manifester Lupusnephritis (16. Lebenswoche) gegeben **(Protokoll 3)**. Zu diesem Zeitpunkt laufen die NO-abhängige Schädigungsphase und die TGF-ß-vermittelte Matrixexpansionsphase parallel zu einander ab. Gefragt wurde: Verstärkt oder vermindert die L-Argininingabe die renale Matrixvermehrung bei chronisch-fortschreitender Glomerulonephritis? Gehen die Wirkungen von L-Arginin mit Veränderungen der Inzidenz von terminalem Nierenversagen einher (Tod der Tiere)? Über welchen Metaboliten ist die L-Argininwirkung vermittelt? Wie ist die Wirkung der L-Argininingabe im Vergleich zur Proteinrestriktion als Therapiestandard?

In allen drei Versuchsprotokollen wurde die Wirkung von L-Arginin unmittelbar in Beziehung zu histologischen und molekularen Markern der Fibroseaktivität als zentrale Kennzeichen von chronisch-fortschreitender Niereninsuffizienz gesetzt. Zusätzlich wurde die Wirkung der L-Argininingabe auf die Aktivität des endogenen NO-Stoffwechsels bestimmt.

Protokoll 1 und 2 dienten dazu, den Einfluß von L-Arginin auf die immun-vermittelte Schädigungsphase und der nachfolgenden Phase der Matrixexpansion getrennt voneinander zu definieren und gegebenenfalls gegensätzliche Wirkungen aufzuzeigen. Im Protokoll 3 wurde gefragt, wie sich die Einzeleffekte von L-Arginin bei kontinuierlich ablaufender Gewebsreparatur in ihrer Gesamtheit auf die Nierenfibrose und Funktion auswirken?

2. Material, Versuchsprotokolle und Methoden

2. 1 Materialien

Alle Materialien wurden von Sigma-Aldrich geliefert. Ausnahmen hiervon waren:
(in alphabetischer Reihenfolge)

Albustix (Albuminteststreifen, Miles Scientific, Rockford, USA)
cDNA-Labeling Kit (Boehringer Biochemicals, Mannheim)
Diäten (Teklad Premier Laboratory Diets, Madison, USA),
Doppelstrang-DNS (Oncor, Heidelberg)
Fluorescin-konjugierter Anti-Mausantikörper (Dianova, Hamburg)
Kaninchen-Anti-Fibronektin-Antikörper (Upstate Biotech, USA)
Kaninchen-Anti-NOS II-Antikörper (Alexis Corporation, San Diego, USA)
Kaninchen-Anti-PAI-1-Antikörper (American Diagnostica, Sulzfeld)
Maus-Anti-ED-1-Antikörper (Serotec, Oxford, United Kingdom)
Nitrat-Reduktase (Boehringer Biochemicals, Mannheim)
OX-7 (European Collection of Animal Cell Culture, United Kingdom)
Peroxidase-konjungierter Schaff-Anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova, Hamburg)
Protein-G-Säulen (Biorad, München)
Quantikine™ für TGF-ß1 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
Ratten-PAI-1-Antigen (American Diagnostica, Sulzfeld)
Rhodamin-markierter Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove USA)
Trizol®-Reagenz (GibcoBRL, Berlin)

2.2 Tiermodelle

Alle Tierversuche erfolgten im Einklang mit der Deklaration von Helsinki zur Durchführung von Tierversuchen und unter Einhaltung der lokal gültigen Tierschutzgesetze.

2.2.1 Anti-Thy1-Glomerulonephritis der Ratte

Die Anti-Thy1-Glomerulonephritis der Ratte ist ein Modell mit akuter, reversibler Matrixexpansion [34]. Sie wird durch die Injektion von Anti-Thy1-Antikörpern (z.B. vom OX-7 Hybridom) induziert. Diese binden spezifisch an ein Thy-1-Epitop, das in der Niere nur von Mesangialzellen exprimiert wird. Die Anti-Thy1-Antikörper führen rasch und zeitlich begrenzt zur einer Komplement- und NO-vermittelten Mesangialzellyse (Schädigungsphase)[35]. In der Folge kommt es zu einer zeitlich relativ klar abgegrenzten Phase der Matrixexpansion im Glomerulum (Matrixexpansionsphase). Zwischengeschaltet sind Thrombozytenaggregation, moderate Monozyten/Makrophagen-Infiltration und deutlich gesteigerte Proliferation[32;75]. Histologisch findet sich in der Phase der Matrixexpansion das Bild einer mesangioproliferativen Glomerulonephritis. Innerhalb von ca. 2 Monaten nach Induktion der Glomerulonephritis kommt es zu einer fast kompletten Normalisierung des histologischen Bildes (Ausheilungsphase).

2.2.2 Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus

Die Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus ist ein Modell der chronisch-fortschreitenden Matrixexpansion. Dieses Modell ist dem humanen Lupus erythematodes verwandt[36]. MRL/lpr-Mäuse (lpr=lymphoproliferativ) entwickeln spontan große Mengen Autoantikörper (u. a. Anti-Nukleäre Antikörper, Einzelstrang- und Doppelstrang-DNS-Antikörper). Genetischer Hintergrund der Lupuserkrankung dieser Mäuse ist eine Mutation des im lpr-Genlocus gelegenen FAS-Gens, welches die Apoptose von aktivierten autoreaktiven Lymphozyten verhindert[76].

In Folge der ungezügelten Antikörperproduktion kommt es bei MRL/lpr-Mäusen zur Bildung von Immunkomplexen, die sich bevorzugt in den Nieren der Tiere ablagern und zu einer kontinuierlichen, inflammatorischen Schädigung der Niere führen. Der immunologische Nierenschaden wird im wesentlichen über die Produktion von zytotoxischen Mengen NO vermittelt[37]. Erste Zeichen der Lupusnephritis (Proteinurie, histologische Veränderungen) sind ab ca. der 14. Lebenswoche nachweisbar. In Folge der fortwährenden Nierenschädigung kommt es zu einer chronisch-fortschreitenden Matrixvermehrung, die von einer zunehmenden Einschränkung der Nierenfunktion begleitet wird[38]. Die Mäuse versterben schließlich an den Folgen der Urämie in ca. der 23./24. Lebenswoche[37].

2.3 Studienprotokolle

Wie in der Einleitung beschrieben, sind TGF-ß-Überexpression und Matrixvermehrung von besonderer Bedeutung für den Funktionsverlust bei chronischen Nierenleiden. In den folgenden Versuchsprotokollen wurde daher die Wirkung der L-Argininingabe in erster Linie in Beziehung zur histologisch meßbaren Matrixexpansion und zu Markern der TGF-ß-Expression gesetzt. Neben der direkten Messung von TGF-ß-mRNA und Protein wurden dabei die Matrixproteine Fibronektin (Indikator der Matrixsynthese) und PAI-1 (Indikator der Matrixdegradation) als indirekte Parameter der in-vivo-Aktivität von TGF-ß verwandt[33;73;74].

Im folgenden sind zunächst die verschiedenen Versuchsprotokolle im Ablauf beschrieben. Die jeweils eingesetzten Methoden sind dann im Abschnitt 2.4 beschrieben.

2.3.1 Vorarbeiten

Die Vorarbeiten dienten dazu, eine neue Meßmethodik für das Modell der Anti-Thy1-Glomerulonephritis zu entwickeln. Ziel war eine sensitive, objektivierbare und valide Methodik zur Messung der Fibroseaktivität mit möglichst großer Differenz zwischen normaler und pathologischer Matrixproteinexpression. Die folgenden Einzelpunkte wurden untersucht:

2.3.1.1 Isolation von Glomeruli einzelner Tiere

Bei der Isolation von Glomeruli werden normalerweise die Nieren von 3–4 Ratten zusammengeführt, um ausreichende Materialmengen für weitere Untersuchungen zu erhalten. Ziel war hier die Isolation von Glomeruli einzelner Tiere. Hierzu bedienten wir uns 4 Metallsiebe (150, 125, 106 und 75 μ Mesh-Größe) mit einem Durchmesser von 10 cm. Glomeruli von je 4 normalen und nephritischen Tieren wurden isoliert. Zahl und Reinheitsgrad der Glomeruli wurden lichtmikroskopisch erfaßt.

2.3.1.2 Matrixproteinsynthese kultivierter Glomeruli im Zeitverlauf

In diesem Vorversuch wurde analysiert, über welchen Zeitraum die kultivierten Glomeruli konstant die Matrixproteine TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 in den Kulturüberstand abgeben. Glomeruli von 4 nephritischen Tieren (Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis) wurden von einzelnen Tieren isoliert und in einer Konzentration von 2000 Glomeruli pro ml in DMEM für 24, 48 und 72 Stunden bei 37 Grad und 5% CO2 kultiviert. Die Kulturlösung war Serum-frei und enthielt als Zusätze 0,1 U/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin und 100 μg/ml Streptomycin. Im Überstand wurden dann die Matrixproteine TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 mittels ELISA gemessen.

2.3.1.3 NO-Synthese kultivierter Glomeruli im Zeitverlauf

Analog zu 2.3.1.2 untersuchten wir die NO-Synthese kultivierter Glomeruli im Zeitverlauf. Hierzu wurden Glomeruli von je 4 normalen und 4 nephritischen Tieren (6 Stunden nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis) isoliert und in phenolrotfreiem DMEM mit 0,1 U/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin und 100 μg/ml Streptomycin bei 37 Grad und 5% CO2 kultiviert. Nach 24, 48 und 72 h wurde im Überstand die Konzentration von Nitrit (Endprodukt von NO) mittels der Griess-Reaktion bestimmt.

2.3.1.4 Vergleich der Matrixproteinsynthese kultivierter Glomeruli mit dem glomerulärem Matrixproteingehalt

In diesem Versuch wurde die Matrixproteinsynthese in Kultur mit der tatsächlichen glomerulären Konzentration dieser Matrixproteine in-vivo verglichen. Glomeruli von jeweils 4 normalen und 4 nephritischen Tieren (Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis) wurden isoliert. Die Glomeruli wurden in einer Dichte von 2000/ml in DMEM mit 0,1 U/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin und 100 μg/ml resuspendiert. Ein Teil wurde für 72 Stunden bei 37 Grad und 5% CO2 kultiviert, der andere direkt nach der Isolation mittels Ultraschall lysiert (3 Zyklen a 10 Sekunden auf Eis). Anschließend wurde die Konzentration von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 im Kultur- bzw. Lysatüberstand mittels ELISA ermittelt.

2.3.1.5 Matrixproteinexpression im Zeitverlauf der Anti-Thy1-Glomerulonephritis

Um das Maximum der Matrixproteinexpression im Verlauf der Anti-Thy1-Glomerulonephritis zu ermitteln, wurden jeweils 4 Versuchstiere 6 und 12 Stunden und 1, 3, 6, 8, 10, 14 und 28 Tage nach Induktion der Glomerulonephritis untersucht. Die Glomeruli von Einzeltieren wurden isoliert und für 72 Stunden in DMEM mit 0,1 U/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin und 100 μg/ml Streptomycin bei 37 Grad und 5% CO2 kultiviert. Im Kulturüberstand wurden die Matrixproteine TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 mittels ELISA gemessen.

2.3.1.6 Vergleich steigender OX-7-Dosen auf die Matrixproteinsynthese am Tag 6 nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis

Um zu ermitteln mit welcher Dosis des OX-7-Antikörpers die höchste Matrixproteinexpression bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis zu erzielen ist, wurden steigenden Dosen des Antikörpers (0,5 , 1, 1,5, 2 und 2,5 mg pro kg Körpergewicht)

injiziert. Am Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis wurde die glomeruläre Matrixakkumulation histologisch an PAS-Schnitten bestimmt sowie wurden Glomeruli isoliert und in DMEM mit 0,1 U/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin und 100 μg/ml Streptomycin für 72 Stunden bei 37 Grad und 5% CO2 kultiviert. Im Kulturüberstand wurden die Matrixproteine TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 mittels ELISA gemessen.

2.3.2 Wirkung der L-Argininingabe auf die Mesangialzellschädigung bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Protokoll 1)

In diesem Protokoll wurde die Wirkung der L-Argininingabe auf die Anti-Thy1-Antikörper-induzierte Mesangialzellyse der Anti-Thy1-Glomerulonephritis untersucht.[33] Hierzu wurde den Versuchstieren für eine Woche vor Antikörperinjektion 1% L-Arginin im Trinkwasser gegeben. Ein Teil der Tiere wurde sechs Stunden nach Antikörperinjektion untersucht, um den Einfluß auf die Mesangialzellyse und auf Parameter des L-Arginin-NO-Stoffwechsels zu erfassen.

Bei dem anderen Teil der Tiere wurde die L-Argininingabe kurz nach Antikörperinjektion beendet. Am Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis wurde untersucht, ob sich Effekte auf die Mesangialzellyse in einer veränderten Matrixexpansion und TGF-ß1-Expression im weiteren Verlauf der Glomerulonephritis widerspiegeln. Alle Tiere erhielten eine Diät mit normalen Proteingehalt (22% Kasein).

A) Materialentnahme 6 Stunden nach Antikörperinjektion

Drei Gruppen Sprague Dawley-Ratten (n=8 pro Gruppe) wurden gebildet:

1. Normale Kontrolltiere (Norm)
2. Glomerulonephritis (GN)
3. Glomerulonephritis mit 1% L-Arginin im Trinkwasser (GN+Arg)

Sechs Stunden nach Induktion der Glomerulonephritis wurden folgende Parameter bestimmt:

1. Mesangialzellyse anhand von PAS-gefärbtem Nierengewebe
2. NO-Produktion kultivierter Glomeruli
3. L-Arginin- und NOx-Spiegel im Plasma
4. NOx-Ausscheidung im Urin
5. Immunhistologie für NOS II und Makrophageninfiltration

B) Materialentnahme 6 Tage nach Antikörperinjektion

Drei Gruppen mit je 8 Sprague Dawley-Ratten wurden gebildet:

1. Normale Kontrolltiere (Norm)
2. Glomerulonephritis (GN)
3. Glomerulonephritis mit 1% L-Arginin im Trinkwasser (GN+Arg)

Bei diesen Tieren wurde die L-Argininingabe 16 Stunden nach Antikörperinjektion beendet. Bis zum Versuchsende erhielten alle Tiere eine normale L-Argininzufuhr.

Im Verlauf des Experiments wurde ein 24-Stundenurin am Tag 8 und 1 vor, sowie am Tag 2 und 5 nach Induktion der Glomerulonephritis gesammelt.

Sechs Tage nach Induktion der Glomerulonephritis wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. glomeruläre Proteinexpression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 aus dem Überstand von kultivierten Glomeruli
2. histologisches Grading der glomerulären Matrixakkumulation anhand von PAS-gefärbtem Nierengewebe

2.3.3 Wirkung der L-Argininingabe auf die TGF-ß-Expression und Matrixexpansion nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis(Protokoll 2)

In diesem Versuchsprotokoll wurde die Wirkung der L-Argininingabe auf die blutdruckunabhängige TGF-ß-Überexpression und Matrixakkumulation nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis untersucht[73;74]. Hierzu wurde den Versuchstieren ab Tag 1 nach Antikörperinjektion, d. h. nach Ablauf der Mesangialzellyse, 1% L-Arginin ins Trinkwasser gegeben.

Neben Tieren mit normaler Proteinzufuhr (NP, 22% Kasein) wurde L-Arginin auch bei Tieren mit diätetischer Proteinrestriktion (LP, 6% Kasein) gegeben. Am Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis wurde die Wirkung der L-Argininingabe auf die Marker der glomerulären Matrixexpansion untersucht und in Relation zu Parametern des endogenen L-Arginin-NO-Stoffwechsels gestellt.

Die folgenden Gruppen mit je 8 Sprague Dawley-Ratten wurden gebildet:

1. Normale Kontrolltiere (Norm)
2. Glomerulonephritis mit normaler Proteinzufuhr (GN-NP)
3. Glomerulonephritis mit normaler Proteinzufuhr und 1% L-Arginin in Trinkwasser (GN-NP+Arg)
4. Glomerulonephritis mit verminderter Proteinzufuhr (GN-LP)
5. Glomerulonephritis mit verminderter Proteinzufuhr und 1% L-Arginin in Trinkwasser (GN-LP+Arg)

Fünf Tage nach Antikörperinjektion wurde der systolische Blutdruck schwanzplethysmographisch gemessen und eine 24-h-Urinsammlung begonnen.

Sechs Tage nach Induktion der Glomerulonephritis wurden folgende Parameter gemessen:

1. glomeruläre mRNS-Expression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1
2. glomeruläre Proteinexpression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 aus dem Überstand von kultivierten Glomeruli
3. Plasmabestimmung von L-Arginin

4. Plasma-, Urin- und Gewebskonzentration der NO-Synthesemarker
5. histologisches Grading der glomerulären Matrixakkumulation anhand von PAS-gefärbtem Nierengewebe

2.3.4 Wirkung der L-Argininingabe auf den Verlauf der Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus (Protokoll 3)

In diesem Protokoll wurde die Wirkung der L-Argininingabe auf den Verlauf der Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus untersucht. L-Arginin wurde als 1%ige Lösung mit dem Trinkwasser gegeben. Wie in Protokoll 2 (2.3.3) wurde neben der Normalproteindiät auch wieder eine Niedrigproteindiät eingesetzt. Die Behandlungen wurden in Lupusmäusen mit manifester Nephritis (16. Lebenswoche) begonnen.

In Mäusen (n=18 je Gruppe) mit manifester Lupusnephritis wurden folgende Gruppen gebildet:

1. Lupusnephritis mit Normalproteindiät (LN+NP)
2. Lupusnephritis mit Normalproteindiät plus 1% L-Arginin im Trinkwasser (LN-NP+Arg)
3. Lupusnephritis mit Niedrigproteindiät (LN-LP)
4. Lupusnephritis mit Niedrigproteindiät plus 1% L-Arginin im Trinkwasser (LN-LP+Arg)

Als Versuchsende wurde der Zeitpunkt festgelegt, an dem in einer der 4 Gruppen 50% der Mäuse (9 von 18) gestorben sind. Dieses Vorgehen bietet zum einen ausreichend Daten für den statistischen Vergleich der Überlebenszeiten. Zum anderen können bei den noch lebenden Mäusen gleichzeitig relevante Marker für die Aktivität des Krankheitsgeschehens gemessen werden. Bei MRL/lpr-Mäusen mit normaler Proteinzufuhr sind in der Regel in der 23./24. Lebenswoche 50% der Tiere verstorben[37].

Am Versuchsende wurde ein 24-Stundenurin in metabolischen Käfigen gesammelt. Das Körpergewicht wurde wöchentlich bestimmt. Die Mäuse wurden täglich visiert. Tote Mäuse wurden aus den Käfigen entfernt und der Todeszeitpunkt dokumentiert.

Am Versuchsende wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. kortikale Proteinexpression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 aus dem kortikalen Gewebshomogenat
2. Plasmabestimmung von Doppelstrang-DNS-Antikörpern
3. Plasmakonzentration von NO-Synthesemarkern
4. histologisches Grading der glomerulären und tubulointerstitiellen Nierenverän-derungen anhand von PAS-gefärbtem Nierengewebe
5. Analyse der Überlebenszeiten

2.4 Methoden

2.4.1 Diäten

Zwei Diäten wurden verwandt:

a) Normalproteindiät mit einem Proteinanteil von 22% (Teklad No. 86550)

b) Niedrigproteindiät mit einem Proteinanteil von 6% (Teklad No. 86551)

Die Diäten waren isokalorisch. Hierzu wurde der Zuckeranteil angepaßt. Als Protein wurde Kasein eingesetzt. Der Anteil an Fetten, Vitaminen und Spurenelementen war bei beiden Diäten identisch.

2.4.2 Anti-Thy1-Antikörper

OX-7 wurde als Antikörper zur Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis verwandt. OX-7 ist ein monoklonaler IgG1 Anti-Thy1-Antikörper und wurde aus dem Kulturüberstand des Mäusehybridoms OX-7 hergestellt. Die IgG-Fraktion des Kulturüberstandes wurde mittels Protein-G-Säulen aufgetrennt. Nach mehrfacher Dialyse gegen PBS und spektographischer Konzentrationseinstellung (bei 280 nm auf 1 mg/ml) wurde der Antikörper bei -70 Grad gelagert.

2.4.3 Akute Anti-Thy1-Glomerulonephritis

Das Modell der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis ist ausführlich unter 2.2.1 beschrieben. Die Anti-Thy1-Glomerulonephritis wurde in männlichen Sprague Dawley-Ratten (200-250g Körpergewicht) durch die einmalige i.v. Injektion des OX-7-Antikörpers (1,5 mg/ kg Körpergewicht) unter Methoxyflurannarkose induziert.

2.4.4 Blutdruckmessung

Der systolische Blutdruck wurde mittels Schwanzplethysmographie (Fa. Havard Apperatus, United Kingdom) bei wachen Tieren gemessen. Der Mittelwert aus drei Messungen wurde gebildet.

2.4.5 Proteinurie und Albuminurie

Die Proteinurie und Albuminurie wurde im 24-Stundenurin gemessen. Zur Sammlung des Urins wurden die Versuchstiere für 24 Stunden in Stoffwechselkäfigen gehalten. Bei den Sprague Dawley-Ratten wurde der Proteingehalt des Urin mittels der Bradtfordmethode bestimmt. Bei den Lupusmäusen wurde die Albuminurie mittels eines Albumin teststreifens (Albustix, Miles Scientific, Rockford, USA) bestimmt.

2.4.6 Nieren- und Blutentnahme

Die Entnahme der Nieren erfolgte unter tiefer Äthernarkose und nach in situ-Perfusion mit eiskalter PBS-Lösung (pH 7,4). Bei den MRL/lpr-Mäusen erfolgte die Blutentnahme und die anschließende Perfusion über den linken Ventrikel, bei den Sprague Dawley-Ratten über die Bauchaorta. Die entfernten Nieren wurden dann unmittelbar in eiskalte PBS-Lösung gebracht, und die Tiere mit einer Überdosis an Barbituraten getötet. Für die spätere histologische Aufarbeitung wurde je ein kleines Stück des Nierenkortex in 10%igem Formalin fixiert oder in Methylbutan eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.4.7 Isolation und Kultur der Glomeruli

Bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis wurden die Glomeruli je Einzeltier mittels einer abgestuften Siebtechnik (150, 125, 106 und 75 µm Mesh Porengröße) isoliert. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle des Reinheitsgrades wurden die Glomeruli zu drei gleichen Teilen aufgeteilt. Ein Teil wurde in Serum-freiem DMEN mit 0.1 U/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in einer Dichte von 2000 Glomeruli/ml für 72 Stunden bei 37 Grad und 5% CO2 kultiviert. Der Kulturüberstand wurde für die späteren ELISA-Messungen bei –20 Grad eingefroren. Ein weiterer Teil wurde in 5 ml Trizol®-Reagenz (GibcoBRL) für die spätere RNA-Isolation homogenisiert und bei -70 Grad gelagert. Der Rest wurde für spätere Proteinanalysen unmittelbar bei –70 Grad eingefroren.

2.4.8 Kortikale Präparation

Bei der Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus sind sowohl die Glomeruli als auch das Tubulointerstitium erkrankt[37]. Als Untersuchungsmaterial wurde daher Nierenkortexgewebe verwandt. Für die Proteinbestimmung von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 wurde kortikales Gewebe gewogen und in 2 ml PBS gegeben. Anschließend wurde das Material grob mit einem Gewebshomogenisator zerkleinert und dann 3 Mal für je 15 Sekunden mit Ultraschall lysiert. Der Überstand wurde bei –70 Grad gelagert.

2.4.9 Bestimmung von TGF-ß1-, Fibronektin- und PAI-1-Protein

Die Bestimmung von TGF-ß1-Protein aus dem Kulturüberstand oder Gewebslysat erfolgte mit einem kommerziellen Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) entsprechend den Vorgaben des Herstellers. Die Fibronektin- und PAI-1-Konzentration der Proben wurde mittels selbst entwickelter kompetitiver Inhibitions-ELISA-Systeme gemessen. Für den Fibronektin-ELISA wurde als Antigen Ratten-Fibronektin und als primärer Antikörper ein Kaninchen-Anti-Fibronektin-Antikörper verwandt{169}. Für den PAI-1-ELISA wurde als Antigen rekombinantes Ratten-PAI-1 und als primärer Antikörper ein Kaninchen-Anti-PAI-1-Antikörper eingesetzt. Bei beiden wurde ein Peroxidase-konjungierter Schaff-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper als sekundärer Antikörper verwandt. Nach Exposition mit o-Phenylenediamin-Dihydrochlorid wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die Konzentration der Matrixproteine wurde anhand spezifischer Standards ermittelt. Bei der glomerulären Kultur ist sie als ng/ml pro 2000 Glomeruli und bei dem kortikalen Gewebshomogenat als ng/mg Naßgewicht angegeben.

2.4.10 Bestimmung von TGF-ß1-, Fibronektin-, PAI-1- und NOS II-mRNA

Die Bestimmung der TGF-ß1-, Fibronektin-, PAI-1- und NOS II-mRNA-Expression erfolgte mittels Northern Blotting. Hierzu wurde Gesamt-RNA von isolierten Glomeruli mittels dem Trizol®-Reagenz (GibcoBRL, Berlin) entsprechend der Anleitung des Herstellers isoliert. Für die Northern-Blot-Analyse wurden je 20 μg RNA mittels Gelelektrophorese (0.9% Agarose/2.2M Formaldehyd) mobilisiert und auf eine Nylonmembran transferiert. Es folgte Crosslinking mittels UV-Behandlung und Hybridisierung mit entsprechenden 32P-CTP-markierten cDNA-Proben. Murine TGF-ß1-, GAPDH- sowie Ratten-Fibronektin-, PAI-1- und NOS II-cDNA-Proben wurden verwandt[33;77].

Die spezifische Bindung der Proben wurde autoradiographisch unter Verwendung eines Densitometers erfaßt und in Relation zur Dichte der GADPH-Bande derselben RNA-Probe als "house-keeping enzyme" gestellt.

2.4.11 Histologische Untersuchungen

Alle histologischen Untersuchungen wurden von "geblindeten" Untersuchern durchgeführt.

2.4.11.1 PAS-Färbung

Für die PAS-Färbung wurden 2 μm-Schnitte der in Paraffin eingebetteten Gewebsblöcke geschnitten und mit Perjodsäure-Schiff (PAS) und Hämatoxylin/Eosin (H&E) gefärbt. Zur Bestimmung der Mesangialzellyse wurde die Zahl der Zellkerne pro glomerulärer Schnittfläche (Größe 80-100 μm) von mindestens 30 Glomeruli pro Tier gezählt. Für den Matrixscore wurde die glomeruläre Fläche, die von Matrix eingenommen wird, wie folgt erfaßt: 0=0%, 1=25%, 3=75% und 4 = 100%. Mindestens 30 Glomeruli pro Tier wurden ausgewertet.

Bei den Lupusmäusen wurde die glomeruläre und tubulointerstitielle Matrixexpansion in Anlehnung an Berden und Mitarbeiter bestimmt[78]. Die glomerulären Matrixablagerungen wurden wie folgt bewertet: 0=keine Veränderungen, 1= weniger als 25% des Glomerulums sind betroffen, 2=25-50% des Glomerulums sind betroffen, 3=mehr als 50% des

Glomerulums sind betroffen. Mindestens 20 Glomeruli pro Tier wurden ausgewertet. Die tubulointerstitiellen Veränderungen (Fibrose und Inflammation) wurden wie folgt bewertet: 0=keine Veränderungen, 1=bis zu 25% der Fläche sind betroffen, 2=25-50% der Fläche sind betroffen, 3= mehr als 50% der Fläche sind betroffen. Mindestens 15 Felder pro Tier in niedriger Vergrößerung (10X) wurden ausgewertet. Zur Bestimmung des renalen Matrixscores wurden bei den Lupusmäusen die Werte von glomerulären und tubulointerstitiellen Scores addiert.

2.4.11.2 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden 1 μm-Schnitte angefertigt. Für den Makrophagennachweis bei der Anti-Thy1-Glomerulonephrits wurde ein ED-1-Antikörper verwandt. Mindestens 20 Glomeruli pro Tier wurden ausgewertet. Die Färbung des NOS II-Proteins erfolgte mit einem primären Kaninchen-Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde ein Rhodamin-markierter Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper verwandt. Die Immunfluoreszenz-Intensität wurde mit einer 4-Gradskala wie folgt erfaßt: 0=keine Färbung, 1=schwache oder punktuelle Färbung, 2=moderate und segmentale Färbung, 3=stärkere segmentale oder diffuse Färbung und 4=starke über das ganze Glomerulum verteilte Färbung.

2.4.12 Plasma-L-Argininbestimmung

Für die Bestimmung der L-Argininkonzentration im Plasma wurde ein Standard-Aminosäure-Analysator mit HPLC-Technik verwandt[79].

2.4.13 Antikörper gegen Doppelstrang-DNS

Die Bestimmung der Antikörper gegen dsDNS erfolgte mittels ELISA-Technik. Für diesen ELISA wurden 96-well-Mikrotiterplatten mit dsDNS beschichtet und dann mit 1:10 verdünnten Plasma-Proben der Lupusmäuse inkubiert. Der Überstand wurde nach 2 Stunden verworfen und ein Peroxidase-konjungierter Schaff-Anti-Maus-IgG-Antikörper zugegeben. Nach Exposition mit o-Phenylenediamin-Dihydrochlorid wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Der relative Titer an Anti-dsDNS-Antikörper wurde als die im ELISA erreichte relative optische Dichte dargestellt.

2.4.14 Nitrit- und Nitratbestimmung

Beides sind End-Produkte der NO-Synthese. Sie wurden im Plasma, Urin und Kulturüberstand mittels der Griess-Reaktion{168} nach Nitrat-Reduktase-Behandlung bestimmt.

2.4.15 Statistische Analyse

Alle Daten sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwertes(MW±SEM) angegeben. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppe erfolgte mittels ANOVA und nachfolgender t-Testung mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestung. Die Überlebensanalysen bei den Lupusmäuse erfolgte nach Kaplan-Meier.

Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als signifikant unterschiedlich bewertet.

3. Ergebnisse

Vorarbeiten

Die Vorarbeiten dienten dazu, eine neue sensitive, objektivierbare und valide Methodik zur Messung der „Fibroseaktivität" bei der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis zu entwickeln. In den Vorversuchen waren die Fallzahl pro Gruppe relativ klein, so daß keine statistische Analyse vorgenommen wurde.

Wie im Kapitel 2 „Material und Methoden" beschrieben, wurden dabei folgende Neuerungen bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis entwickelt und validiert:

3.1.1 Isolation von Glomeruli einzelner Tiere

Um zu ermitteln, mit welcher Ausbeute bei der Isolation von Glomeruli einzelner Tiere zu rechnen ist, wurden die Glomeruli von 4 normalen und 4 nephritischen Tieren (Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis) mit unserem neuen Siebverfahren isoliert.

Wie in der Tab. 1. zu sehen ist, wurden bei den normalen Tieren im Durchschnitt 34600 Glomeruli pro Tier gewonnen. Bei den nephritischen Tieren waren es im Durchschnitt 51200 Glomeruli pro Tier. Die Reinheit der Glomeruli wurde lichtmikroskopisch erfaßt und lag in allen Fällen über 90% (Daten nicht gezeigt). Bei den normalen Tieren konnte die Zahl der gewonnenen Glomeruli nicht durch Verwendung feinerer Auffangsiebe (52 µ oder 63 µ anstelle des 75 µ Mesh) erhöht werden. Da die Glomeruli normaler Tiere eine sehr homogene Population darstellen, dürfte sich die geringere Ausbeute bei den gesunden Kontrollen in den folgenden Messungen nicht auswirken.

Gruppe	Zahl der Glomeruli (MW +SEM)
Normale Kontrollen	34600+3600
Anti- Thy 1-Glomerulonephritis	51200+5200

Tab. 1: Zahl der Glomeruli, die pro Tier geerntet wurden. Isoliert wurden jeweils die Glomeruli von 4 normalen und 4 nephritischen Tieren. Bei den nephritischen Tieren wurden die Glomeruli 6 Tage nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis geerntet. Die Zahl der Glomeruli pro Tier war ausreichend für die glomeruläre Kultur (Bedarf 5 x 2000 Glomeruli) und für die Bestimmung des in-vivo-Gehalts an Matrixproteinen (5 x 2000 Glomeruli). Für die Isolation von mRNA war die Zahl der verbleibenden Glomeruli pro Tier jedoch nicht ausreichend (ca. 5-10 µg pro Tier), so daß hier weiter Glomeruli von 3-4 Tieren gepoolt werden mußten.

3.1.2 Matrixproteinsynthese kultivierter Glomeruli im Zeitverlauf

In diesem Vorversuch wurde analysiert, über welchen Zeitraum die Matrixproteine TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 konstant von Glomeruli in den Kulturüberstand

sezerniert werden.

Wie in Abb. 3 zu sehen ist, wird TGF-ß1 über drei Tage mit relativ konstanter Rate von den Glomeruli in den Überstand abgegeben. Nach 24 Stunden Kultur fand sich 611±52 pg/ml TGF-ß1 im Überstand. Nach 48 Stunden stieg die Konzentration auf 1007±74 pg/ml und nach 72 Stunden auf 1187±68 pg/ml im Kulturmedium an.

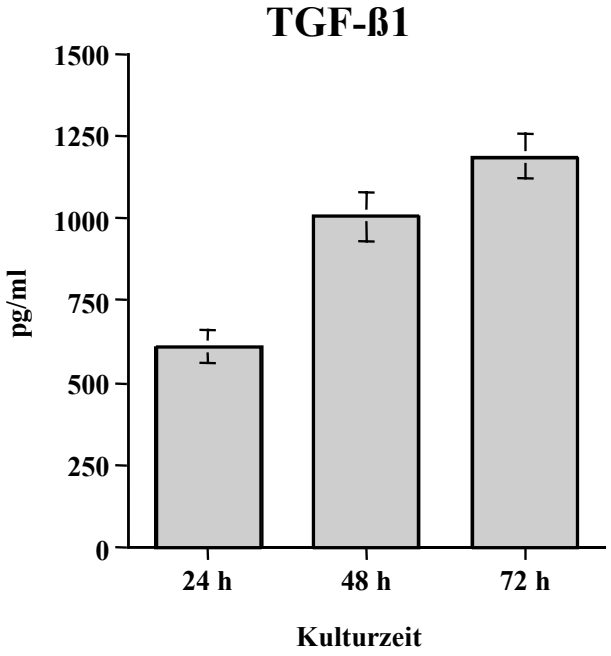

Abb. 3: Produktion von TGF-ß1 in Kultur im Zeitverlauf. Jeweils 2000 Glomeruli pro ml Kulturmedium von 4 nephritischen Tieren wurden für 24, 48 und 72 Stunden kultiviert. Die Konzentration von TGF-ß1 im Kulturüberstand wurde mittels ELISA gemessen. Die Glomeruli wurden sechs Tage nach Induktion der Glomerulonephritis isoliert.

Für die Matrixproteine Fibronektin und PAI-1 (Abb. 4) konnten vergleichbare Zeitverläufe dokumentiert werden. Die Menge Fibronektin stieg von 1083±149 ng/ml nach 24 Stunden, über 1654±172 ng/ml nach 48 Stunden auf 2344±291 ng/ml nach 72 Stunden stetig an. Für PAI-1 fanden sich entsprechend 33±5, 39±11 bzw. 59±16 ng/ml nach 24, 48 und 72 Stunden im Kulturüberstand.

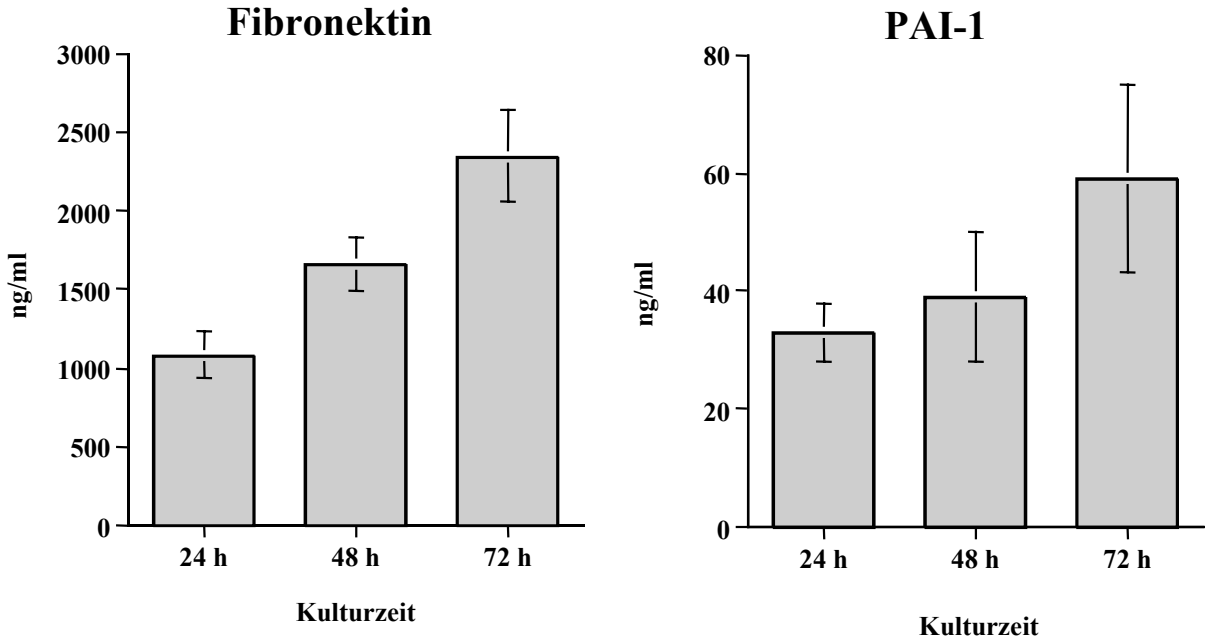

Abb. 4: Produktion von Fibronektin und PAI-1 in Kultur im Zeitverlauf. Jeweils 2000 Glomeruli pro ml Kulturmedium von 4 nephritischen Tieren wurden für 24, 48 und 72 Stunden kultiviert. Fibronektin und PAI-1 wurde mittels ELISA gemessen. Die Glomeruli wurden 6 Tage nach Induktion der Glomerulonephritis isoliert.

NO-Synthese kultivierter Glomeruli im Zeitverlauf

Vergleichbar zu der Fragestellung in 3.1.1 haben wir die NO-Synthese von Glomeruli in Kultur über die Zeit untersucht. Verwandt wurden jeweils Glomeruli von 4 normalen und 4 nephritischen Tieren. Bei den nephritischen Tieren wurden die Glomeruli sechs Stunden nach Induktion der Glomerulonephritis isoliert. Bei den normalen Tieren entspricht die NO-Produktion der Aktivität der endothelialen NOS III, bei den nephritischen Tieren der induzierbaren NOS II.

Wie in Abb. 5 zu sehen ist, gaben die normalen und nephritischen Glomeruli NO über insgesamt 72 Stunden mit relativ konstanter Rate in den Kulturüberstand ab. Bei den

Glomeruli von normalen Tieren war die NO-Produktion relativ gering. Nach 24 Stunden fanden sich 0,6±0,2 nmol/ml Nitrit im Überstand. Nach 48 Stunden waren es 1,2±0,1 nmol/ml und nach 72 Stunden 1,7 nmol/ml Nitrit im Überstand. Bei den nephritischen Glomeruli war die NO-Produktion deutlich höher. Hier fanden sich 4,2±1,4 nmol/ml Nitrit nach 24 Stunden, 8,6±3,5 nmol/ml nach 48 Stunden und 11,2±4,8 nmol/ml nach 72 Stunden im Kulturüberstand.

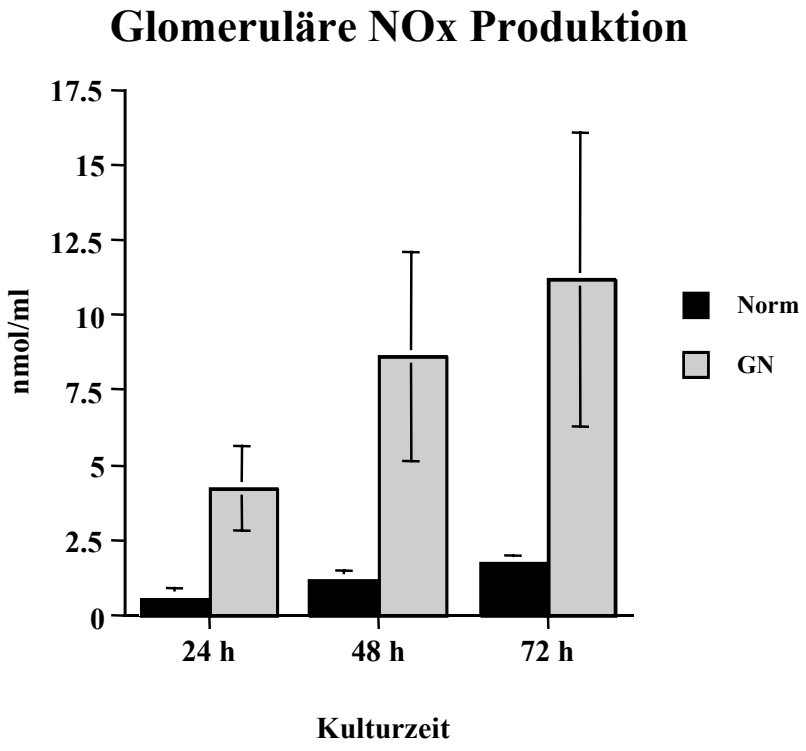

Abb. 5: Produktion von Nitrit(Abbauprodukt von NO=NOx) in Kultur im Zeitverlauf. Jeweils 2000 Glomeruli pro ml Kulturmedium von 4 normalen und 4 nephritischen Tieren wurden für 24, 48 und 72 Stunden kultiviert. Die Glomeruli der nephritischen Tiere wurden sechs Stunden nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis isoliert. Nitrit wurde mit der Griess-Reaktion gemessen.

Aus dem Vorversuch 3.1.1 und 3.1.2 leiteten wir ab, daß Glomeruli über mindestens 72 Stunden in Kultur vital bleiben.

3.1.3 Vergleich der Matrixproteinsynthese kultivierter Glomeruli mit dem glomerulärem Matrixproteingehalt

In diesem Versuch wurde die Frage untersucht, ob die Matrixproteinsynthese in Kultur der tatsächlichen in-vivo-Konzentration dieser Matrixproteine entspricht. Zur Beantwortung dieser Frage wurden von jeweils 4 normalen und 4 nephritischen Tieren die Glomeruli isoliert. Ein Teil wurde für 72 Stunden kultiviert, der andere direkt nach der Isolation mittels Ultraschall lysiert. Anschließend wurde die Konzentration von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 im Kultur- bzw. Lysatüberstand verglichen.

Wie in Abb. 6 dargestellt, findet sich bei Glomeruli von normalen Tieren in-vivo und im Kulturüberstand nur eine geringe Konzentration von TGF-ß1. Im Lysat wurden 81±10 pg/ml TGF-ß1 und im Kulturüberstand 117±11 pg/ml TGF-ß1 gemessen. Die Glomeruli

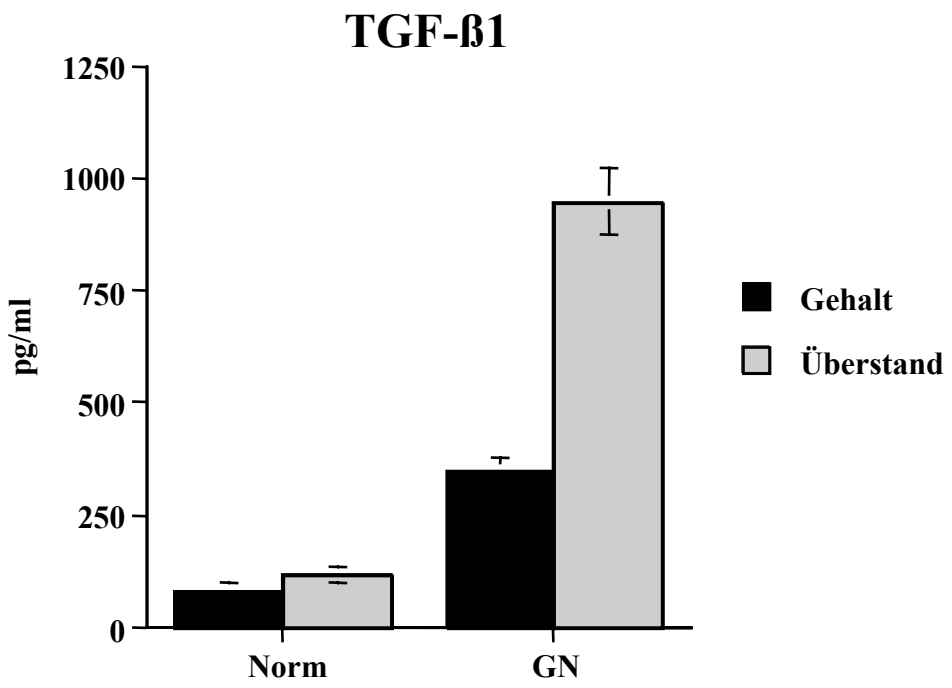

Abb. 6: Konzentration von TGF-ß1 im Kulturüberstand nach 72 h oder im direkt gewonnenen Lysat (in-vivo-Gehalt). Die Glomeruli wurden jeweils in einer Konzentration von 2000 pro ml eingesetzt. Untersucht wurden die Glomeruli von jeweils 4 normalen und 4 nephritischen Tieren (Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis).von nephritischen Tieren zeigten deutliche höhere TGF-ß1-Werte. Im Lysat wurden 347±30 pg/ml TGF-ß1 und im Kulturüberstand 948 pg/ml TGF-ß1 gemessen. Vergleicht man den relativen Anstieg von normaler zu nephritischer TGF-ß1-Konzentration, ist der Unterschied im Lysat 428% und im Kulturüberstand 810%.

Vergleichbare Daten wurden für die Matrixproteine Fibronektin und PAI-1 gefunden (Abb.7). Bei den normalen Tieren fand sich 168±16 ng/ml Fibronektin im Lysat und 463±47 ng/ml Fibronektin im Kulturüberstand. Bei den nephritischen Tieren wurden entsprechend 988±207 ng/ml und 4132±356 ng/ml Fibronektin gemessen. Hieraus ergibt sich eine relative Differenz von normaler zu nephritischer Fibronektin-Konzentration von 588% im Lysat und von 892% im Kulturüberstand.

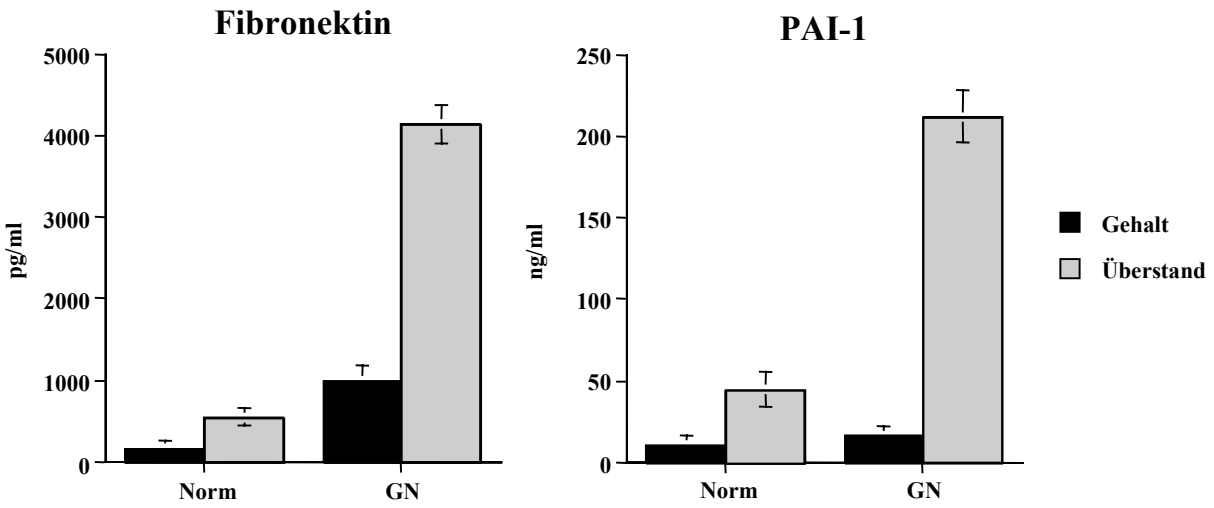

Abb. 7: Konzentration von Fibronektin und PAI-1 im Kulturüberstand nach 72 h oder im direkt gewonnenen Lysat (in-vivo-Gehalt). Die Glomeruli wurden jeweils in einer Konzentration von 2000 pro ml eingesetzt. Untersucht wurden die Glomeruli von jeweils 4 normalen und 4 nephritischen Tieren (Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis).

Für PAI-1 fanden sich bei den normalen Tieren 11±5 pg/ml im Lysat und 16±7 pg/ml im Kulturüberstand (Abb. 7). Bei dem nephritischen Tieren stieg die PAI-1 Konzentration auf 45±10 pg/ml im Lysat und auf 212±33 pg/ml im Kulturüberstand an. Dieses ergibt einen relativen Unterschied von normaler zu nephritischer PAI-1-Konzentration von 409% im Lysat und von 1325%, wenn der Kulturüberstand gemessen wurde.

Die Daten aus 3.2.3 zeigen somit, 2) daß die Matrixproteinproduktion in den Kulturüberstand der tatsächlichen Konzentration dieser Matrixproteine in-vivo entspricht; 2) daß die Glomeruli in Kultur Matrixproteine in einer Menge produzieren, die der in-vivo-Situation entspricht, aus der heraus sie isoliert wurden; und 3) daß bei der Messung der Matrixproteine im glomerulären Kulturüberstand weitaus größere Unterschiede zwischen normaler und nephritischer Expression von TGF-ß1, Fibronektin und PAi-1 zu finden sind.

3.1.4 Matrixproteinexpression im Zeitverlauf der Anti-Thy1-Glomerulonephritis

Um den Zeitpunkt mit der größten Differenz zwischen normaler und maximaler Expression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 zu ermitteln, wurden jeweils 4 Versuchstiere 6 und 12 Stunden sowie 1, 3, 6, 8, 10, 14 und 28 Tage nach Induktion der Glomerulonephritis untersucht. Die Matrixproteine wurden im Kulturüberstand gemessen.

Wie in Abb. 8 dargestellt, zeigte die TGF-ß1-Expression im Verlauf der Anti-Thy1-Glomerulonephritis einen biphasischen Verlauf. Bei den normalen Tieren wurde 224±42 pg/ml TGF-ß1 im Kulturüberstand gemessen. Am Tag 1 nach Glomerulonephritis-Induktion stieg die TGF-ß1-Expression auf 935 pg/ml, fiel am Tag 3 auf 473±48 pg/ml, um dann am Tag 6 wieder auf 767 pg/ml anzusteigen. Im weiteren Verlauf fielen die TGF-ß1-Werte allmählich wieder ab und waren am Tag 28 bei 155±59 pg/ml.

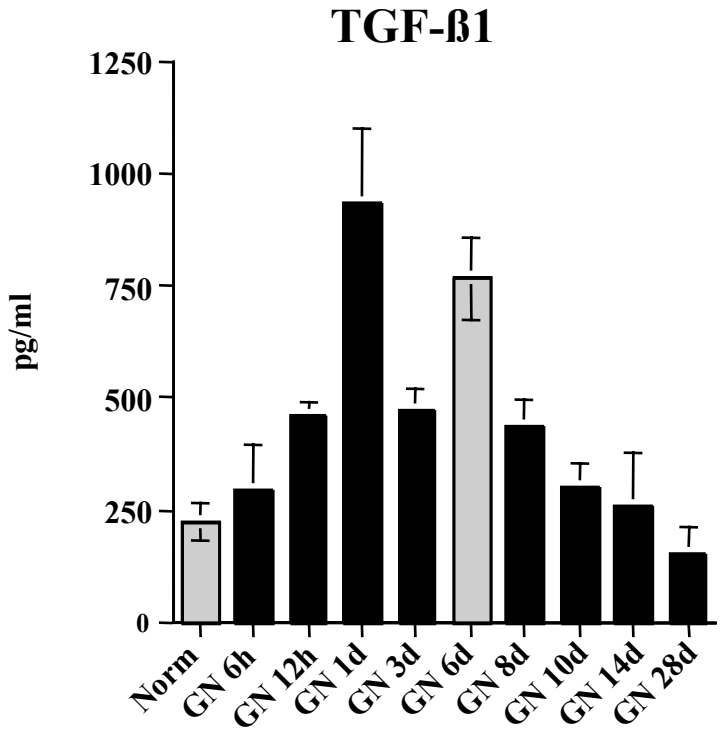

Abb. 8: Expression von TGF-ß1 im Zeitverlauf der Anti-Thy1-Glomerulonephritis. Glomeruli einzelner Tiere wurden zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Die Konzentration von TGF-ß1 wurde mittels ELISA im Überstand nach 72stündiger Kultur gemessen.

Die Fibronektin- und PAI-1-Expression zeigte einen ähnlichen Verlauf. Fibronektin stieg innerhalb der ersten 24 Stunden rasch von 852±160 ng/ml auf 3207±657 ng/ml an (Abb. 9). Das Maximum fand sich am Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis mit 4617±496 ng/ml im Kulturüberstand. Im weiteren Verlauf fiel die Fibronektin-Expression dann stetig auf fast normale Werte am Tag 28 (1422±282 ng/ml) wieder ab.

PAI-1 zeigte den stärksten Anstieg innerhalb der ersten 24 Stunden (Abb. 9). Die PAI-1-Expression stieg von 20±6 ng/ml bei normalen Glomeruli auf 218±47 ng/ml an. Nach einen Abfall bis zum Tag 3 (62±11 ng/ml) wurde am Tag 6 nach Induktion der

Glomerulonephritis ein zweiter Gipfel mit 123±30 ng/ml beobachtet. Im weiteren Verlauf fiel die PAI-1-Expression wieder ab, ohne jedoch bis zum Tag 28 (58±13 ng/ml) wieder normale Werte zu erreichen.

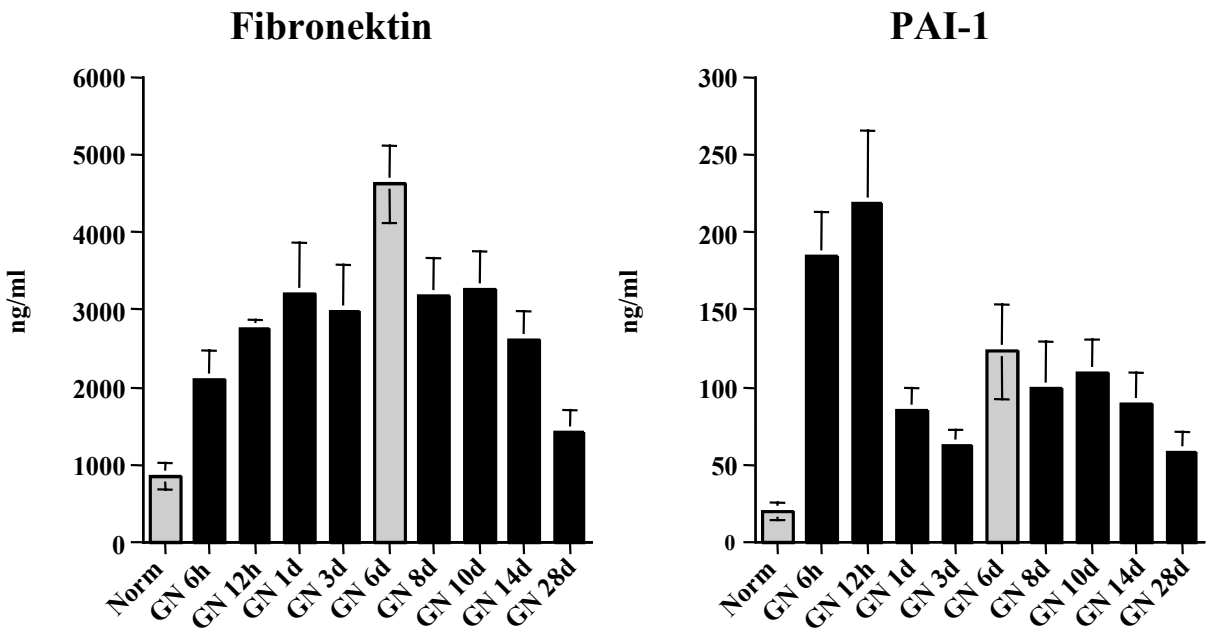

Abb. 9: Expression von Fibronektin und PAI-1 im Zeitverlauf der Anti-Thy1-Glomerulonephritis. Glomeruli einzelner Tiere wurden zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Die Konzentration von Fibronektin wurde mittels ELISA im Überstand nach 72stündiger Kultur gemessen.

Aus diesem Versuch ergibt sich, daß die höchste Produktion von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 sechs Tage nach Induktion der Glomerulonephritis zu finden ist. Der Anstieg der Matrixproteine in den ersten 24 Stunden ist wahrscheinlich Folge der abgelaufenen Mesangialzellyse und nicht Ausdruck einer gesteigerten glomerulären Synthese. In den folgenden Experimenten zur Matrixexpansionsphase der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis wurde die Messung der „Fibroseaktivität" immer am Tag 6 vorgenommen.

3.1.5 Vergleich steigender OX-7-Dosen auf die Matrixproteinsynthese am Tag 6 nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis

Im Modell der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis entspricht der Grad der glomerulären Matrixakkumulation dem Ausmaß der vorangegangenen Mesangialzellyse. Um auch hier eine möglichst große Differenz zwischen normaler und nephritischer Matrixproteinexpression zu erzielen, wurden Versuchstieren steigende Dosen des Anti-Thy1-Antikörpers OX-7 injiziert. Am Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis wurde die Matrixakkumulation histologisch erfaßt sowie die Expression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 im Kulturüberstand bestimmt.

Bei der glomerulären Matrixakkumulation fand sich erwartungsgemäß ein Dosis-abhängiger Effekt (Abb. 10). Mit der geringsten Dosis OX-7 wurde ein PAS-Score von 2,49±0,29 erzielt. Der maximaler Effekt wurde bei 1,5 mg/kg KG OX-7 beobachtet (2,83±0,11). Bei der höchsten OX-7-Dosis nahm die glomeruläre Matrixexpansion wieder ab (1,88±0,12).

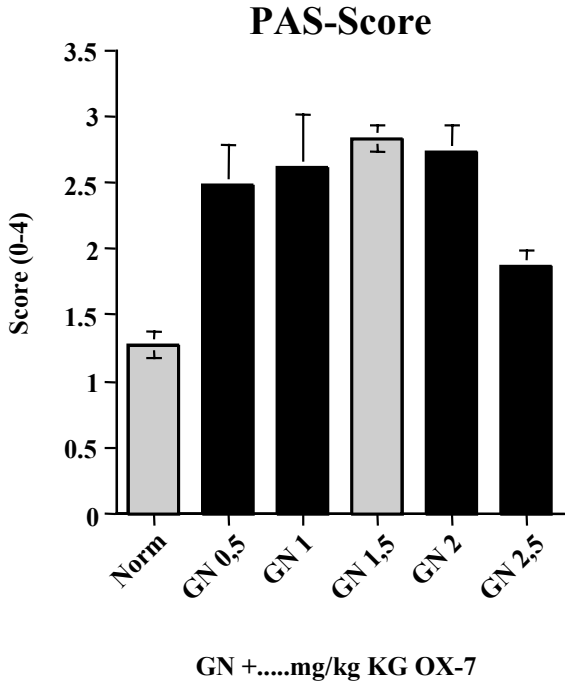

Abb. 10: Glomeruläre Matrixakkumulation sechs Tage nach Induktion der Glomerulonephritis. Injiziert wurden steigende Dosen des Antikörpers OX-7.

Wie in Abb. 11 dargestellt, zeigte die TGF-ß1-Expression einen angedeutet Dosis-abhängigen Verlauf. Mit der geringsten OX-7-Dosis wurde nur eine moderate TGF-ß-Überexpression erzielt. Ein maximaler Effekt wurde ab 1 mg/kg KG beobachtet. Die Varianz zwischen den Einzeltieren war bei 1,5 mg/kg KG am geringsten. Bei der höchsten OX-7-Konzentration nahm die TGF-ß1-Expression wieder ab.

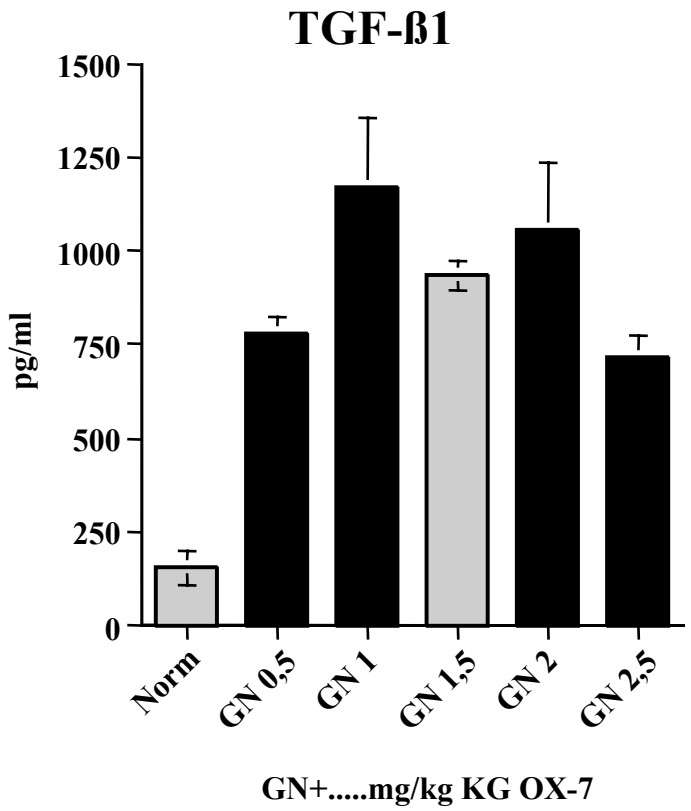

Abb. 11: Expression von TGF-ß1 im glomerulären Kulturüberstand sechs Tage nach Induktion der Glomerulonephritis. Injiziert wurden steigende Dosen des Antikörpers OX-7.

Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Fibronektin- und PAI-1-Expression (Abb. 12) beobachtet. Hier fand sich eine maximale Induktion der Synthese ab 1 mg/ kg KG OX-7 und die geringste Streuung der Einzelwerte bei 1,5 mg/kg KG OX-7.

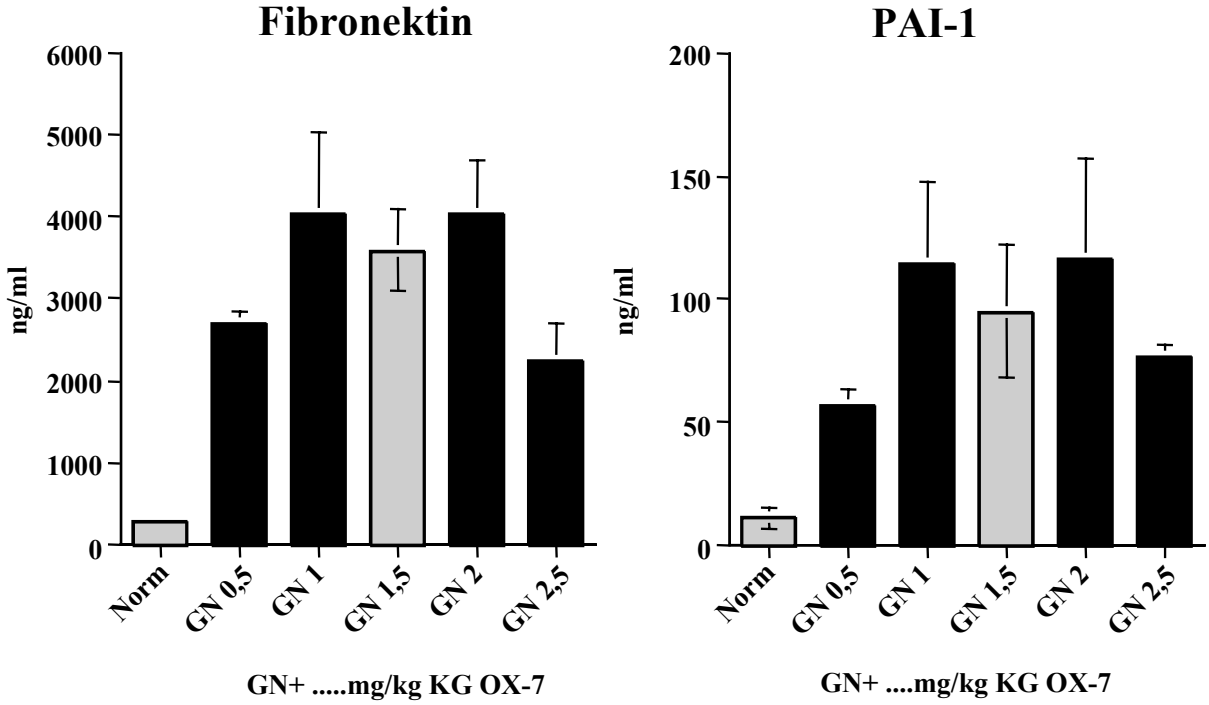

Abb. 12: Expression von Fibronektin im glomerulären Kulturüberstand sechs Tage nach Induktion der Glomerulonephritis. Injiziert wurden steigende Dosen des Antikörpers OX-7.

Zusammenfassend zeigt dieser Vorversuch, daß die höchste Expression der Matrixproteine TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 mit dem OX-7-Antikörper in einer Dosis von 1 bis 2 mg pro kg KG erzielen ist. Da die Standardabweichung zwischen den einzelnen Tieren am geringsten in der Gruppe mit 1,5 mg OX-7 pro kg KG war, wurde in den folgenden Versuchen diese Konzentration für die Induktion der Anti-Thy1-Glmerulonephritis gewählt.

3.2 Wirkung der L-Argininingabe auf die Anti-Thy1-induzierte Mesangialzellschädigung bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Protokoll 1)

3.2.1 Basisdaten

Die Gabe von 1% L-Arginin im Trinkwasser führte zu einer ca. 4-fachen Erhöhung der L-Argininzufuhr (614±46 mg/Tag) im Vergleich zu Tieren mit normalen Trinkwasser (Norm 158±13 mg/Tag, GN mit normalem Trinkwasser 153±18 mg/Tag) (Abb. 14). Futterverbrauch und Gewichtszunahme zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen (Daten nicht gezeigt).

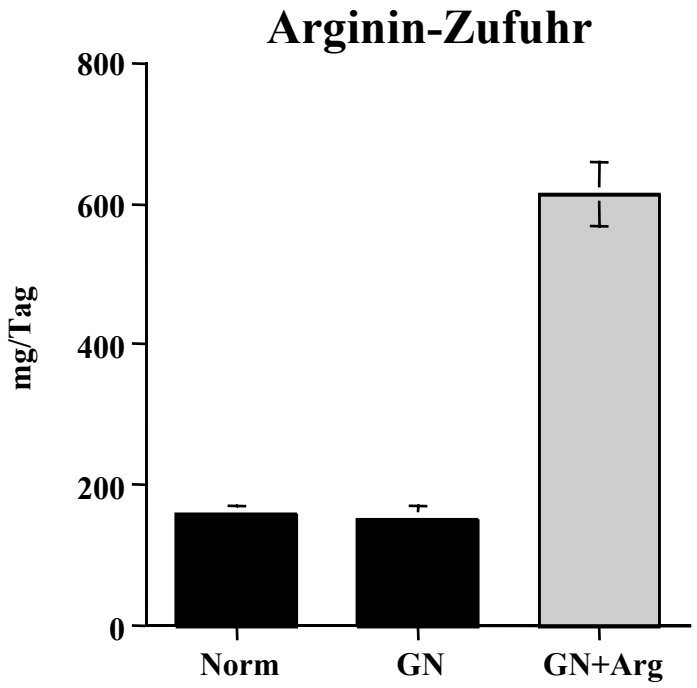

Abb. 14: L-Argininzufuhr in den einzelnen Versuchstiergruppen. Angegeben ist jeweils die mittlere L-Argininzufuhr pro Tag und Tier. L-Arginin wurde im Trinkwasser (1%) gegeben.

3.2.2 Materialentnahme sechs Stunden nach Induktion der Glomerulonephritis

3.2.2.1 Mesangialzellschädigung

Die Injektion von Anti-Thy1-Antikörpern führte erwartungsgemäß zu einer starken Abnahme der glomerulären Zellzahl sechs Stunden nach Induktion der Glomerulonephritis (Abb. 15). In den normalen Kontrolltieren fanden sich im Mittel 64,2±0,1 Zellen pro Glomerulum. Bei den Tieren mit Anti-Thy1-Antikörper-Injektion verringerte sich die Zellzahl pro Glomerulum auf 53,4±0,7 ($p<0,01$ vs. Norm). Dieses entspricht einem Mesangialzellverlust von 11,8±0,7 pro Glomerulum. In den Tieren mit L-Argininvorbehandlung war die Zellzahl noch weiter auf 50,8±0,7 pro Glomerulum gesunken. Dieses entspricht einem Mesangialzellverlust von 13,6±0,7 ($p<0,05$ vs. GN). Diese Daten zeigen, daß die L-Argininingabe zu einer leichten, aber signifikanten Zunahme der glomerulären Mesangialzellyse geführt hat.

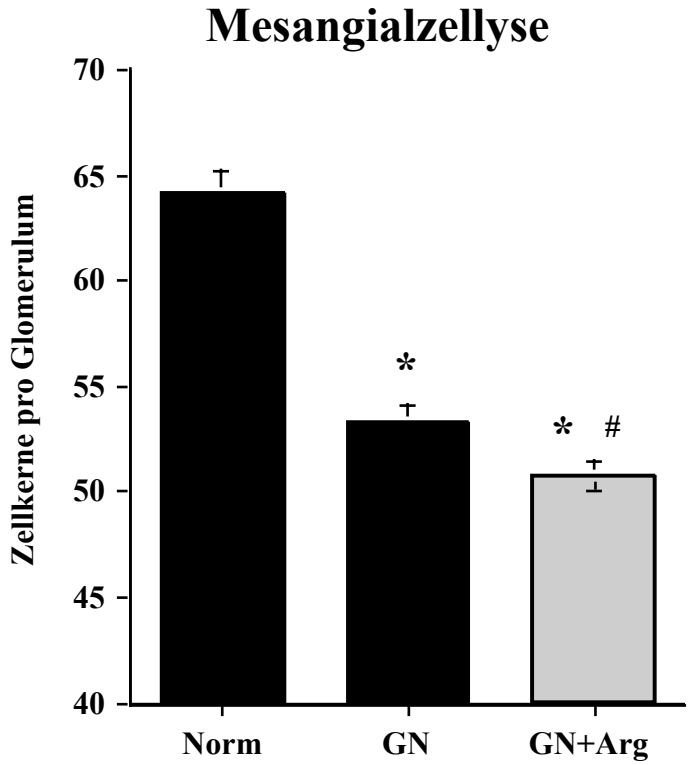

Abb. 15: Mesangialzellyse sechs Stunden nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis (GN). Dargestellt ist die glomeruläre Zellzahl. Die normalen Kontrolltiere (Norm) wurden mit PBS injiziert. L-Arginin wurde im Trinkwasser (1%) beginnend 7 Tage vor Antikörperinjektion gegeben (* p<0,01 vs. Norm, ,# p<0,05 vs. GN).

3.2.2.2 Glomeruläre Makrophageninfiltration

Im Vergleich zu den normalen Kontrolltieren (0,6 ±0,2) nahm die Zahl der Makrophagen pro Glomerulum in den GN-Tieren mit normaler L-Argininzufuhr signifikant zu (5,1±0,6, p<0,01 vs. Norm) (Abb. 16). In den nephritischen Tieren, die mit L-Arginin vorbehandelt waren, war die Zahl ED-1-positiver Zellen hiervon statistisch nicht signifikant unterschiedlich (5,8±0,5, p= NS vs. GN, p<0,01 vs. Norm). Die L-Argininingabe hatte also keinen bedeutsamen Einfluß auf die Makrophageninfiltration.

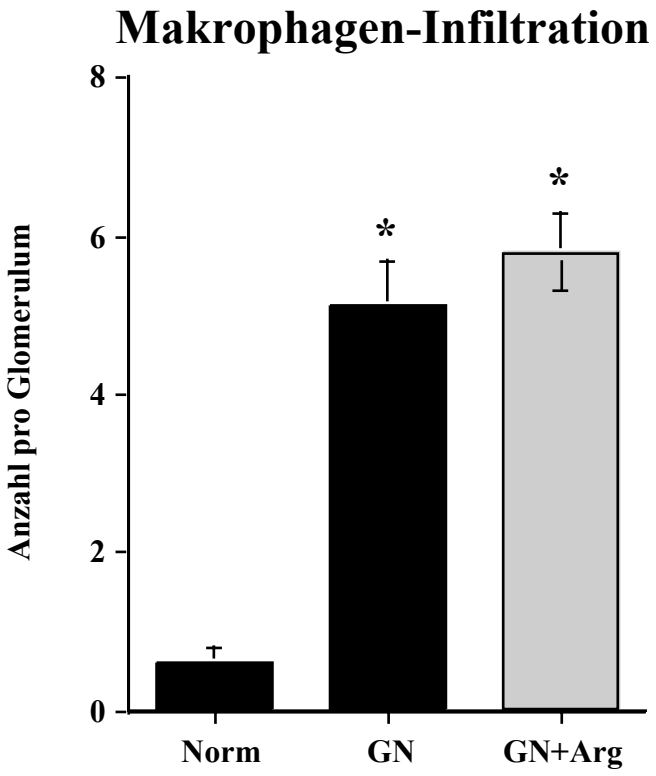

Abb. 16: Glomeruläre Monozyten-/Makrophageninfiltration sechs Stunden nach Induktion der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis. Dargestellt ist die Anzahl der ED-1-positiven Zellen pro Glomerulum (* p<0,01 vs. Norm)

3.2.2.3 Expression der NOS II

Im Vergleich zu den Kontrollen fand sich bei den nephritischen Tieren mit normaler L-Argininzufuhr ein ca. 104-facherAnstieg der NOS II-mRNA-Expression (104±24 vs. 1±0, p< 0,001 GN vs. Norm) im Northern-Blot sechs Stunden nach Gabe des Anti-Thy1-Antikörpers (Abb. 17). In der Immunhistologie wurde ein ca. 9-facher Anstieg der NOS II-Proteinexpression (1,7±0,2 vs. 0,2±0,1, p<0,001, GN vs. Norm) gemessen (Abb. 18). Die Vorbehandlung mit L-Arginin hatte keinen weiteren Einfluß auf das Ausmaß der NOS II mRNA-Expression (104±19 vs. 1±0, p<0,001 vs. Norm, p=NS vs. GN) und der NOS II-Proteinexpression (1,6±0,3 vs. 0,2±0,1, p<0,001 vs. Norm, p=NS vs. GN) (Abb. 17 und 18)

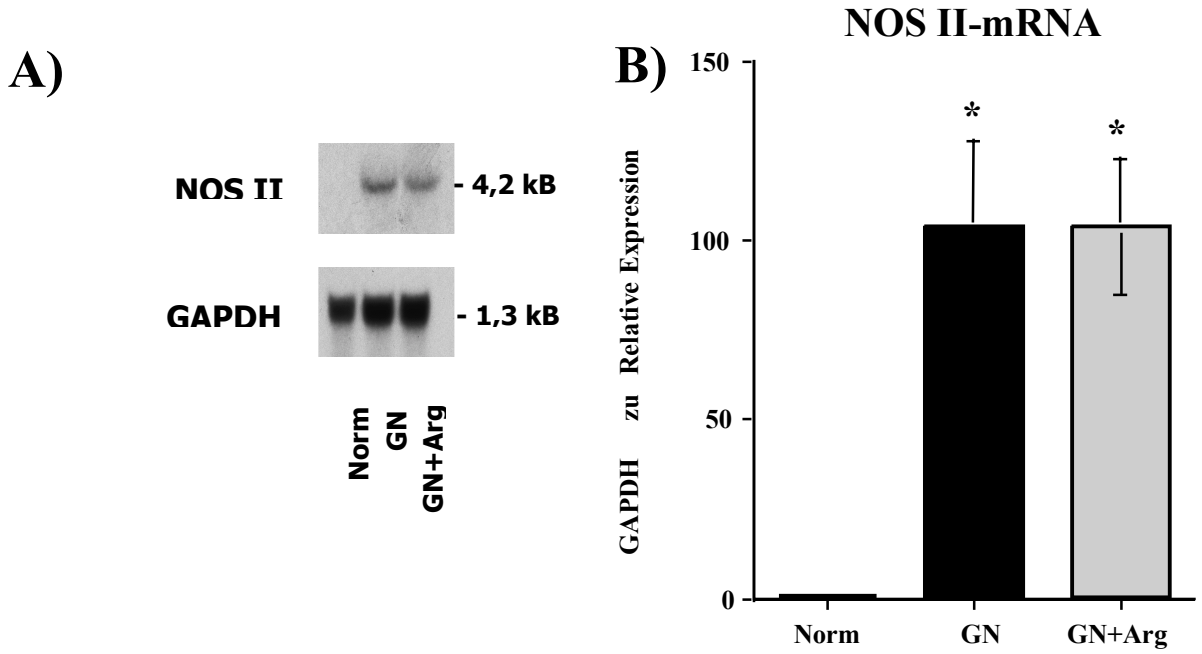

Abb. 17: Glomeruläre NOS II-mRNA-Expression sechs Stunden nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis. Dargestellt ist A) ein repräsentativer Northern-Blot für NOS II und GAPDH sowie B) die quantitative Auswertung der glomerulären NOS II-mRNA-Expression in Relation zur GAPDH-Expression (* p<0,001 vs. Norm).

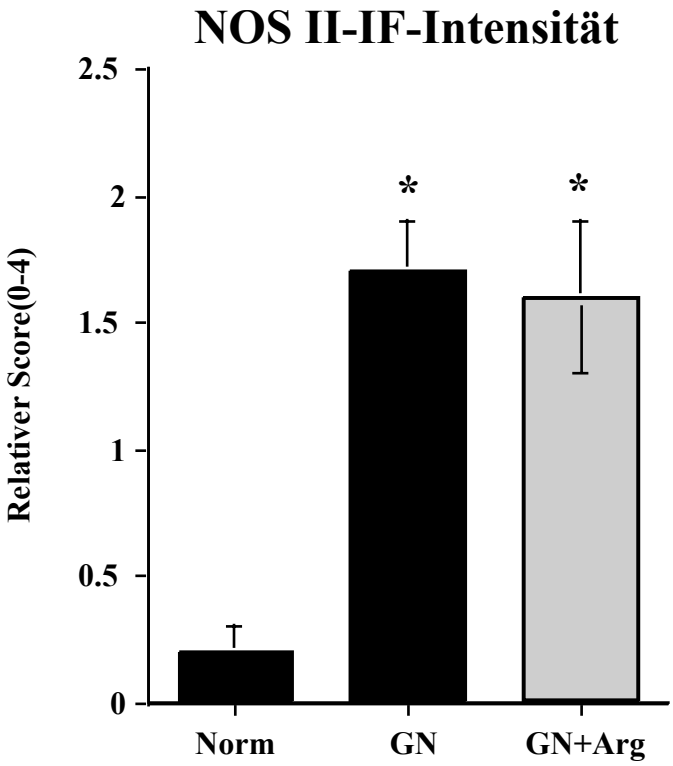

Abb. 18: Glomeruläre NOS II-Proteinexpression sechs Stunden nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis. Mit Hilfe eines semiquantitativen Scoresystems (0-4) wurde die relative Färbeintensität der NOS II-Protein-Immunfluoreszenz ermittelt (* p <0,001 vs. Norm).

Zusammengefaßt zeigen diese Daten, daß die Gabe von L-Arginin die Makrophageninfiltration und NOS II-Expression bei Anti-Thy1-Glomerulonephritis nicht bedeutsam beeinflußt. Die Ursache für die ungünstige Wirkung von L-Arginin auf die Mesangialzellyse mußte also in einem höherem Substratangebot mit verstärkter NO-Bildung vermutet werden. Um dieses zu prüfen, wurden im folgenden die Veränderungen der Plasma-L-Arginin- und NOx-Spiegel sowie der Einfluß der extrazellulären L-Argininkonzentration auf die NO-Produktion nephritischer Glomeruli untersucht.

3.2.2.4 Plasma L-Arginin- und NOx-Spiegel

In den Tieren mit normaler L-Argininzufuhr fand sich sechs Stunden nach Gabe des Anti-Thy1-Antikörpers ein starker Abfall der Plasma-L-Argininspiegel. Im Vergleich zu normalen Kontrollen wurde der L-Argininspiegel von 121±9 auf 84±13 nmol/ml ($p < 0,05$) vermindert (Abb. 19). Dieses ist als verstärkter Verbrauch von L-Arginin im Rahmen der Glomerulonephritis-Induktion zu interpretieren. Die Vorbehandlung mit L-Arginin verhinderte komplett diesen Abfall. In diesen Tieren war der L-Argininspiegel 37% höher als bei den normalen Kontrolltieren (166±12 vs. 121±9 nmol/ml, $p<0,05$) und 198% höher bei den GN-Tieren ohne L-Argininingabe (166±12 vs. 84±13 nmol/ml, $p < 0,001$).

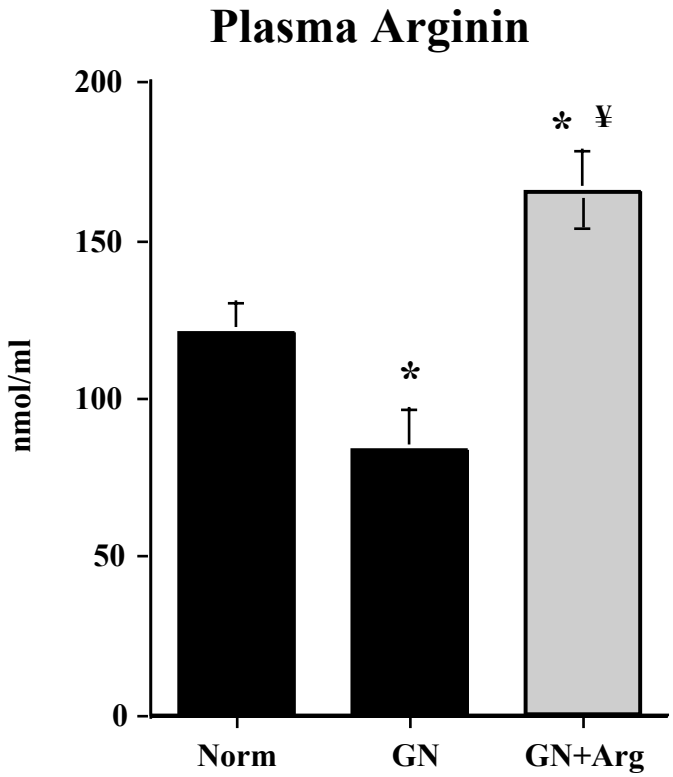

Abb. 19: L-Argininkonzentration im Plasma sechs Stunden nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis (GN). Alle Gruppen erhielten eine Diät mit normalen Proteinanteil (22% Kasein). Das Trinkwasser in Gruppe GN+ARG wurde mit 1% L-Arginin supplementiert (* $p<0,05$ vs. Norm, Ψ $p < 0,001$ vs. GN).

Bei den GN-Tieren mit normaler L-Argininzufuhr fand sich ein signifikanter Anstieg der Plasma-NOx-Konzentration (31±1.3 vs. 25,7±1,3 nmol/ml, p<0.01, GN vs. Norm) sechs Stunden nach Antikörperinjektion (Abb. 20). Dieses ist als Ausdruck einer verstärkten endogenen NO-Produktion im Rahmen der Induktion der Glomerulonephritis zu deuten. Bei den nephritischen Tieren, die mit L-Arginin vorbehandelt waren, fand sich ein weiterer signifikanter Anstieg der NOx-Konzentration (35,7±1,1 nmol/ml, p<0,05 vs. GN, p<0,01 vs. Norm), so daß hier von einer noch höheren endogenen NOx-Produktion auszugehen ist.

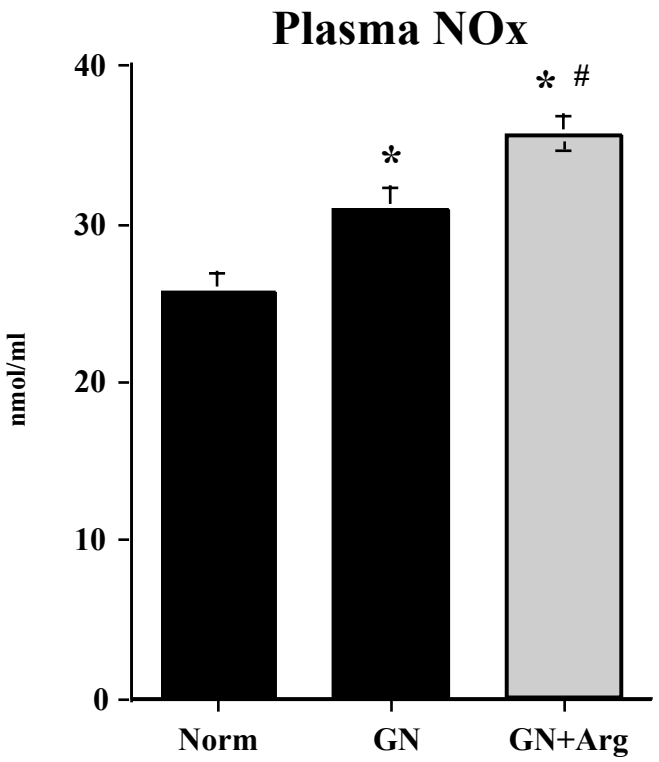

Abb. 20: NOx-Konzentration im Plasma sechs Stunden nach Induktion der Glomerulonephritis. Alle Gruppen erhielten eine Diät mit normalen Proteinanteil (22% Kasein). Das Trinkwasser in Gruppe GN+ARG wurde mit 1% L-Arginin supplementiert (* p<0,05 vs. Norm, # p< 0,05 vs. GN).

3.2.2.5 Einfluß der extrazellulären L-Argininkonzentration auf die glomeruläre NO-Produktion

In diesem Experiment wurden normale und nephritische Glomeruli mit steigenden L-Argininkonzentrationen inkubiert und nach 48 h die NOx-Konzentration im Überstand bestimmt. In Voruntersuchungen konnten wir zeigen, daß die NOx-Produktion nephritischer Glomeruli von Tieren mit und ohne L-Argininingabe nahezu gleich war. In diesem Experiment ist daher die NOx-Produktion von normalen und nephritischen Glomeruli einander gegenübergestellt.

Die NOx-Produktion in L-Arginin-freiem Kulturmedium war bei nephritischen Glomeruli leicht aber signifikant höher als bei den normalen Glomeruli (0,0 nmol/ml Arginin: 2,1±0,3 vs. 1,4 ±0,1 nmol/ml, $p<0,05$ GN vs. Norm) (Abb. 21). Die Zunahme der L-Argininkonzentration führte bei den normalen Glomeruli zu keiner signifikanten Änderung der NOx-Synthese (L-Argininkonzentration max. 1000 nmol/ml, NOx max. 1,4±0,1 nmol/ml, p=NS). Bei den nephritischen Glomeruli mit induzierter NOS II zeigte sich hingegen, daß deren NOx-Produktion sehr stark von dem extrazellulären L-Argininangebot abhängig war. Eine deutliche Zunahme der NOx-Produktion (2,8±0,1 nmol/l) wurde ab 50 nmol/ml L-Arginin im Kulturmedium beobachtet. Das Maximum der NOx-Synthese mit 4,4±0,2 nmol/ml wurde bei einer L-Argininkonzentration von 500 nmol/ml gemessen.

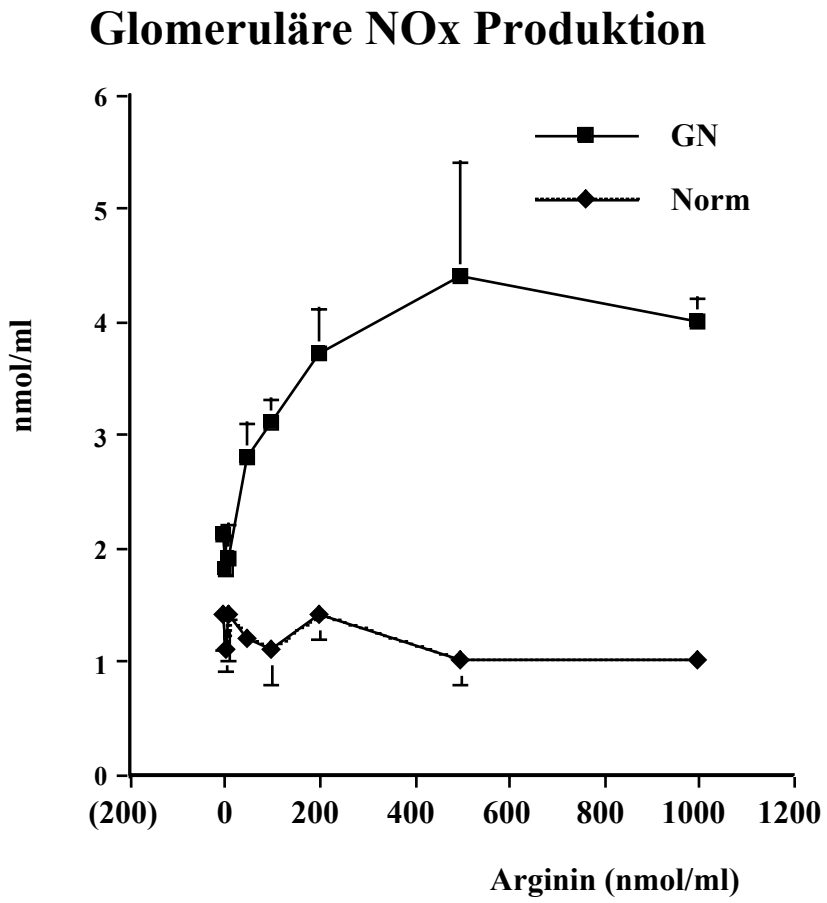

Abb. 21: NO-Produktion in Abhängigkeit von der L-Argininkonzentration im Kulturmedium. Untersucht wurden die Glomeruli von 4 normalen und 4 nephritischen Tieren. Die Glomeruli der nephritischen Tiere wurden sechs Stunden nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis isoliert. Die Bildung von Nitrit als Endprodukt von NO diente als Maß für die NO-Synthese.

Die Daten des L-Arginin-NO-Stoffwechsels zeigen somit, daß die negative Wirkung der L-Argininingabe auf die Mesangialzellyse wahrscheinlich über ein verstärktes Substratangebot für die NOS II vermittelt wird.

3.2.3 Materialgewinnung sechs Tage nach Induktion der Glomerulonephritis

3.2.3.1 Proteinurie

Im Vergleich zu den normalen Kontrollen führte die Induktion der Glomerulonephritis zu einer signifikanten Zunahme der Proteinausscheidung am Tag 2 und Tag 5 nach Antikörpergabe (Abb. 22). Bei den Tieren, die L-Arginin bis 16 Stunden nach Induktion der Glomerulonephritis erhielten, war am Tag 2 die Proteinurie jedoch signifikant höher als bei den Tieren mit normaler L-Argininzufuhr (127±8 vs. 102±16 mg/24h, $p<0,05$ GN+Arg vs. GN). Am Tag 5 war die Proteinurie zwischen beiden nephritischen Gruppen wieder nahezu gleich (49±13 vs. 50±5 mg/24h, p=NS GN+Arg vs. GN).

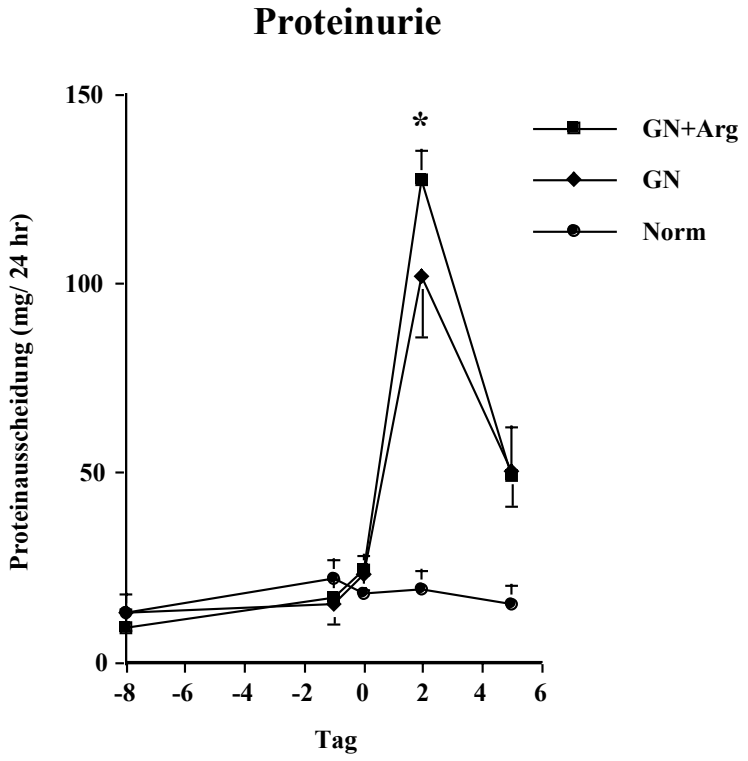

Abb. 22: Zeitverlauf der Proteinurie bei normalen und nephritischen Tieren (GN). Bei der Gruppe GN+Arg wurde 1% L-Arginin im Trinkwasser beginnend 7 Tage vor und bis 16 h nach Injektion der Anti-Thy1-Antikörper gegeben. An den Untersuchungszeitpunkten wurde jeweils ein 24-h-Urin mittels metabolischer Käfige gesammelt (* p<0,05 vs. GN).

3.2.3.2 Marker der extrazellulären Matrixexpansion

Im Vergleich zu den mit PBS-injizierten Kontrolltieren bewirkte die Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis bei den Tieren mit normaler Argininzufuhr erwartungsgemäß eine deutliche Zunahme der Matrixakkumulation (2,35±0,06 vs. 1,16±0,05, GN vs. Norm p<0,001) am Tag 6 (Abb. 23). Gleichermaßen fand sich auch eine stark erhöhte glomeruläre Synthese von TGF-ß1 (608±34 vs. 142±24 pg/ml, p<0,001, GN vs. Norm) (Abb. 24), Fibronektin (2369±245 vs. 511±76 ng/ml, p<0,001, GN vs. Norm) und PAI-1 (160±14 vs. 20±4 ng/ml, p<0,001, GN vs. Norm) (Abb. 25).

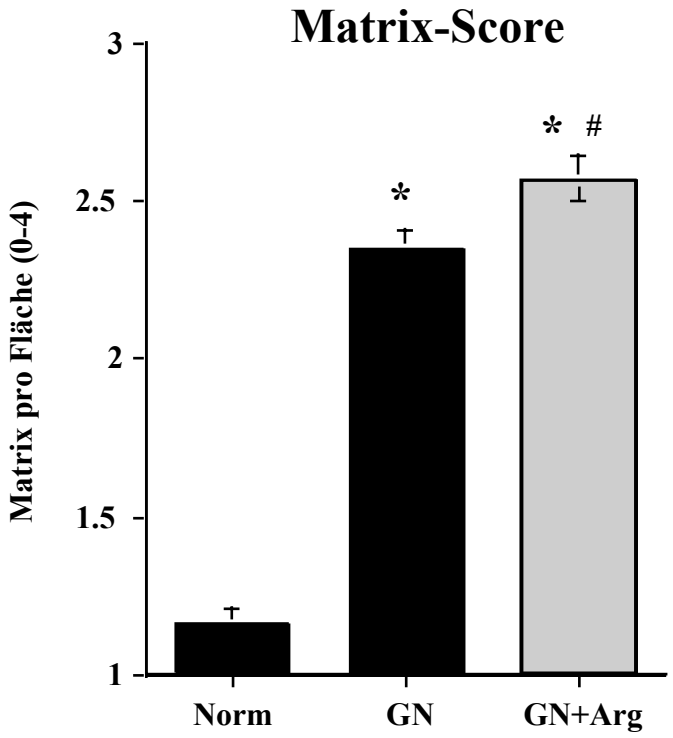

Abb. 13: Wirkung der L-Argininingabe auf die Mesangialzellyse gemessen anhand der nachfolgenden glomerulären Matrixakkumulation am Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis. In den Tieren mit L-Argininingabe wurde 1 % L-Arginin im Trinkwasser für 7 Tage vor und bis 16 h nach Antikörperinjektion gegeben. In der weiteren Zeit hatten die Tiere eine normale L-Argininzufuhr (* p<0,001 vs. Norm, # p <0,05 vs. GN).

Im Vergleich zu den nephritischen Tieren mit normaler L-Argininzufuhr bewirkte die L-Argininingabe vor und während der Mesangialzellyse eine moderate, aber signifikante Zunahme der glomerulären Matrixakkumulation (2,57±0,07 vs. 2,35±0,06, p<0,05 GN+Arg vs. GN) (Abb. 23) und der glomerulären Produktion von TGF-ß1 (748±43 vs. 608±34 pg/ml, p<0,05 GN+Arg vs. GN) (Abb. 24), Fibronektin (2985±211 vs. 2369±245 ng/ml, p<0,05 GN+Arg vs. GN) und PAI-1 (222±26 vs. 160±14 ng/ml, p<0,05 GN+Arg vs. GN) (Abb. 25).

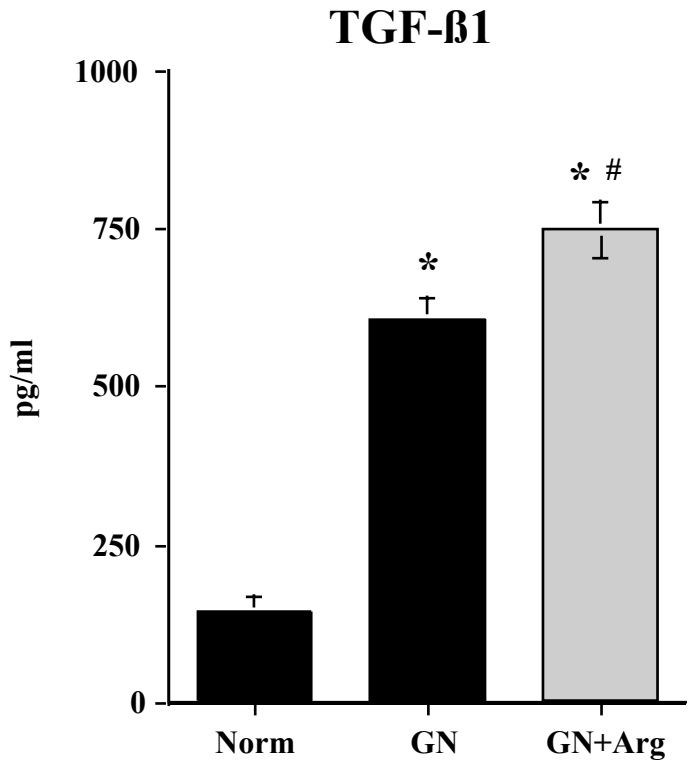

Abb. 24: Wirkung der L-Argininingabe (1% im Trinkwasser) auf die Mesangialzellyse gemessen anhand der nachfolgenden TGF-ß1-Expression am Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis. Die TGF-ß1-Proteinexpression wurde aus dem Überstand von kultivierten Glomeruli mittels ELISA gemessen(* p<0,001 vs. Norm, # p <0,05 vs. GN).

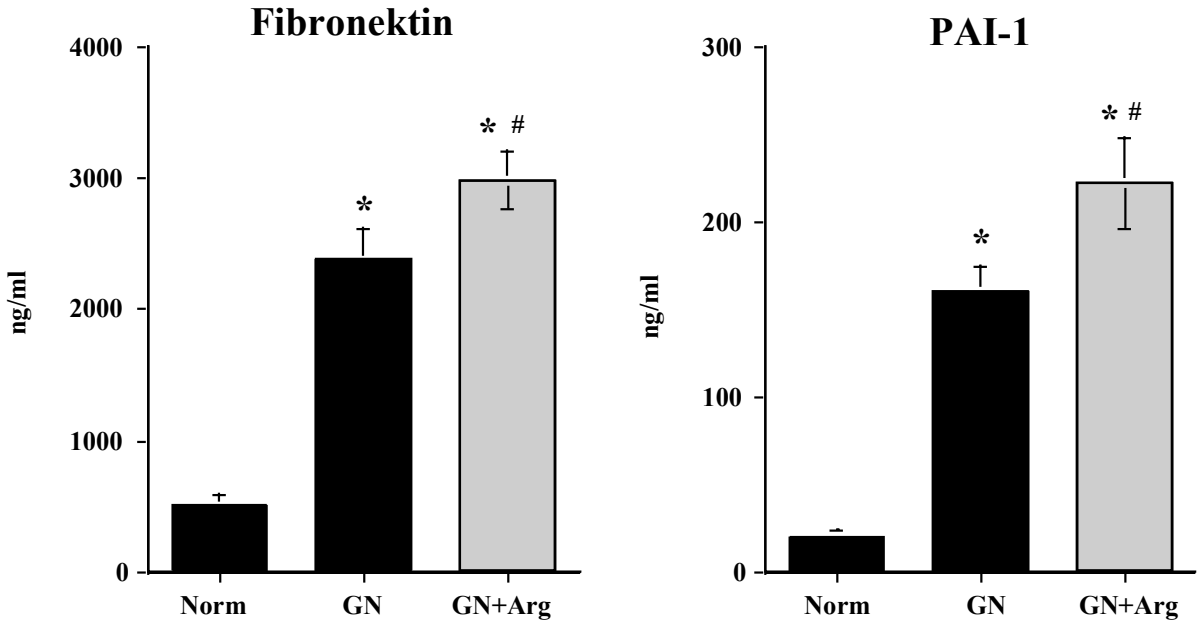

Abb. 25: Wirkung der L-Argininingabe (1% im Trinkwasser) auf die Mesangialzellyse gemessen anhand der nachfolgenden Fibronektin- und PAI-1-Expression am Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis. Die Fibronektin- und PAI-1-Expression wurde aus dem Überstand von kultivierten Glomeruli mittels ELISA gemessen(* p<0,001 vs. Norm, # p <0,05 vs. GN).

Zusammenfassend zeigen die Daten der histologischen Matrixexpansion und der Matrixproteinexpression übereinstimmend, daß die verstärkte Mesangialzellyse durch L-Argininingabe von einer ausgeprägteren Fibrosereaktion gefolgt wird.

3.3 Wirkung der L-Argininingabe auf die TGF-ß1-Expression und Matrixexpansion nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Protokoll 2)

3.3.1 Basisdaten

Die Fütterung von Normal- und Niedrigproteindiät mit und ohne L-Arginin im Trinkwasser führte erwartungsgemäß zu deutlichen Unterschieden in der L-Argininzufuhr zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 26). Die mittlere L-Argininzufuhr war 160 mg pro Tag in den normalen Kontrolltieren und 155 mg in den unbehandelten GN-Tieren mit Normalproteindiät. Die Fütterung der Niedrigproteindiät verminderte die L-Argininzufuhr ca. 3.5-fach auf 45 mg pro Tag. Die Gabe von 1% L-Arginin im Trinkwasser erhöhte die tägliche L-Argininaufnahme auf 580 mg in den Normalproteintieren und auf 350 mg in den Niedrigproteintieren. Dieses entspricht einer relativen Zunahme des 3,6- und 7,7-fachen innerhalb der gleichen Futtergruppe.

Der Futter- und Wasserkonsum zwischen den Tiergruppen war statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Das Körpergewicht zwischen den Tiergruppen zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

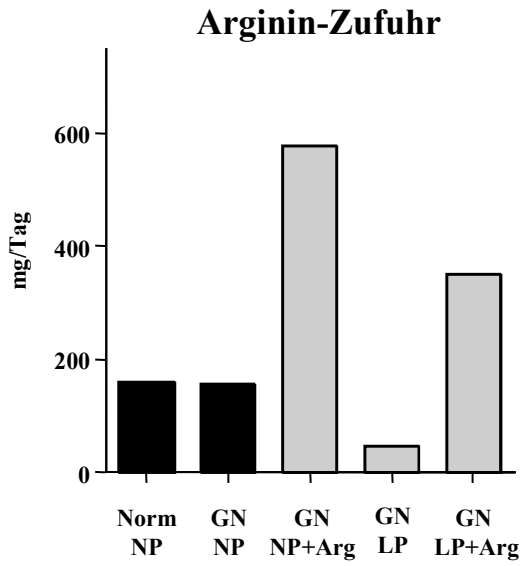

Abb. 26: Erreichte L-Argininzufuhr je Behandlungsgruppe. Die Tiere erhielten entweder eine Diät mit normalem oder erniedrigtem Proteingehalt (NP, 22% Kasein vs. LP, 6% Kasein). L-Arginin wurde im Trinkwasser als 1%igte Lösung gegeben. Angegeben ist jeweils die mittlere Argininzufuhr in mg pro Tag.

3.3.2 Plasma-L-Argininspiegel

Im Vergleich zu den normalen Kontrolltieren (115±14 mmol/ml) führte die Glomerulonephritis zu einer signifikanten Verringerung der Plasma-L-Arginin-Spiegel (Abb. 27). Dieses wurde sowohl bei den Tieren mit Normalproteindiät (GN-NP 52±9 mmol/ml) als auch bei den Tieren mit Niedrigproteindiät (GN-LP 77±5 mmol/ml) beobachtet. Dieser Abfall ist Ausdruck eines verstärkten L-Argininumsatzes. Die L-Argininingabe führte zu einer deutlichen Zunahme der Plasma-L-Arginin-Spiegel. In den nephritischen Tieren mit normaler Proteinzufuhr waren diese 232% (GN-NP+Arg 176±18 mmol/ml) und in den Tieren mit beschränkter Proteinzufuhr 338% (GN-LP+Arg 174±13 mmol/ml) höher als in den korrespondierenden Tieren ohne L-Argininingabe.

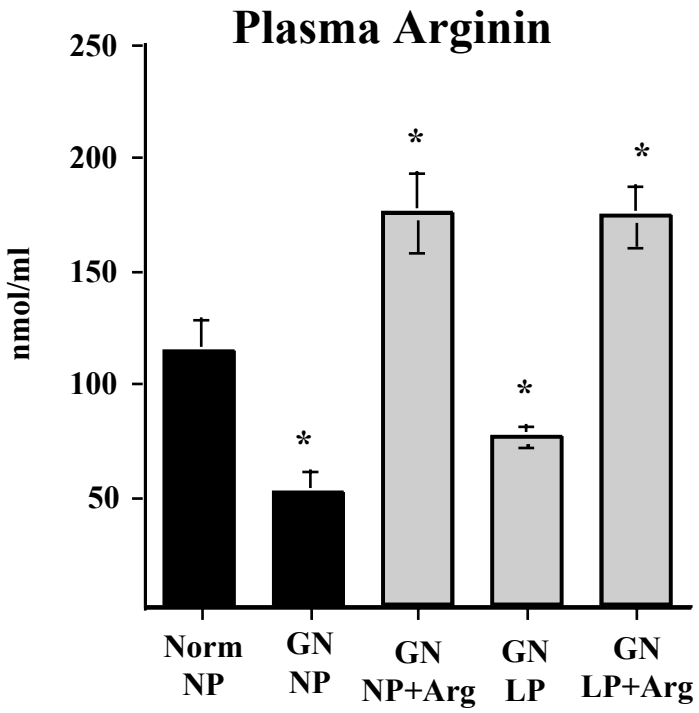

Abb. 27: Plasma-L-Argininspiegel sechs Tage nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis (GN). Die Tiere erhielten entweder eine Diät mit normalem oder erniedrigtem Proteingehalt (NP, 22% Kasein vs. LP, 6% Kasein). L-Arginin wurde im Trinkwasser als 1%ige Lösung gegeben (* p <0,05 vs. Norm).

3.3.3 Systolischer Blutdruck

Die Gabe von L-Arginin hatte keinen Einfluß auf den systolischen Blutdruck der Tiere (Abb. 32). Es wurden 111±8 mm Hg bei den normalen Kontrollen, 110±6 mm Hg bei den GN+NP-, 113±3 mm Hg bei den GN-NP+Arg-, 114±6 mm Hg bei den GN+LP- und 111±7 mm Hg bei den GN-LP+Arg-Tieren gemessen.

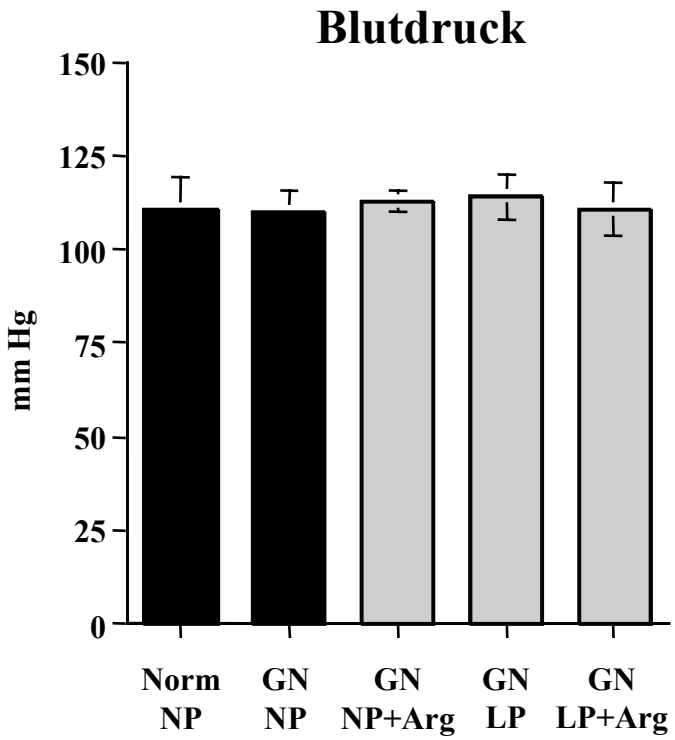

Abb. 28: Systolischer Blutdruck je Behandlungsgruppe fünf Tage nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis (GN). Der Blutdruck wurde bei wachen Tieren mittels Schwanzplethysmographie ermittelt.

3.3.3 Proteinurie

Die Induktion der Glomerulonephritis bewirkte eine signifikante Zunahme der Proteinurie im Vergleich zu den normalen Kontrollen (16±2 mg/24h) (Abb. 29). In den GN-Tieren mit normaler L-Argininzufuhr stieg sie auf 52±10 mg/24h. Im Vergleich dazu bewirkte die Fütterung der Niedrigproteindiät einen signifikanten Abfall der Proteinausscheidung (GN-LP 14±5 mg/24h, p< 0,01). In beiden Fütterungsgruppen bewirkte die Zugabe von L-Arginin keine signifikante Änderung der Proteinausscheidung (GN-NP+Arg 60±12 mg/24h, GN-LP+Arg 10±4 mg/24h). Zusammenfassend zeigte sich also, daß die Proteinurie durch die Proteinzufuhr nicht aber durch die L-Argininmenge beeinflußt wird.

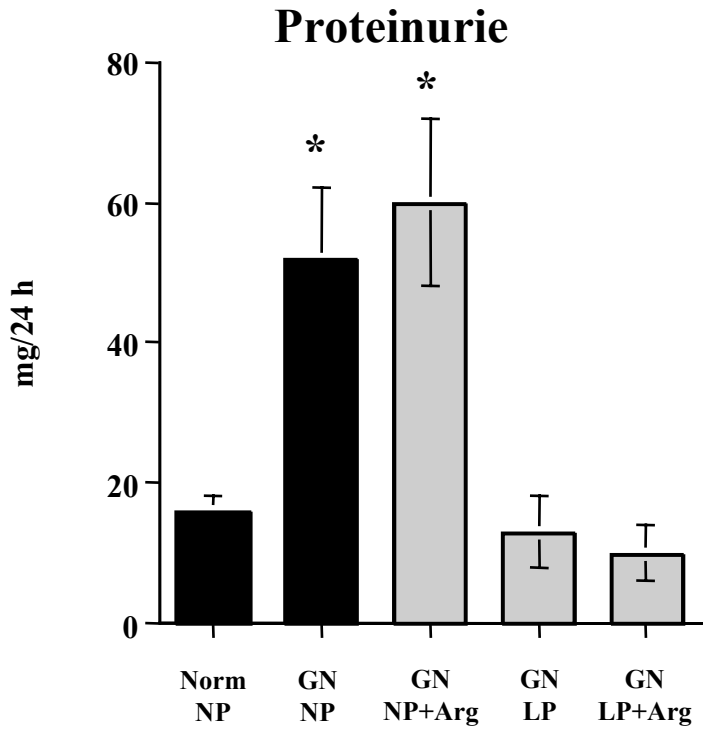

Abb. 29: Wirkung der L-Argininingabe auf die Proteinurie sechs Tage nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis (GN). Die Sammlung des 24-h-Urins erfolgte in metabolischen Käfigen vom Tag 5 zum Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis (* p<0,01 vs. Norm).

3.3.4 Marker der Matrixvermehrung sechs Tage nach Induktion der Glomerulonephritis

L-Argininingabe und Niedrigproteindiät im Vergleich

3.3.4.1 Histologie

Die Induktion der Glomerulonephritis bewirkte erwartungsgemäß eine deutliche Zunahme der Matrixmenge im Glomerulum (Norm 1,12±0,03 vs. GN-NP 2,58±0,04, P< 0,001) (Abb. 30). Sowohl die L-Argininingabe als auch die Niedrigproteindiät führten beide zu einer signifikanten Abnahme der Matrixexpansion (GN-NP+Arg 2,13±0,06, GN-LP 2,09±0,04, beide p<0.05 vs. GN). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant.

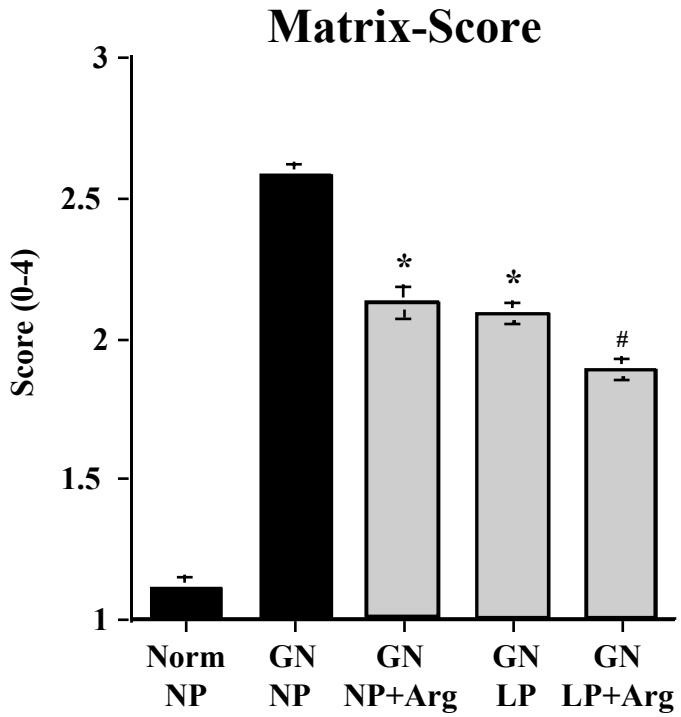

Abb. 30: Wirkung der L-Argininingabe auf die glomeruläre Matrixexpansion sechs Tage nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis (GN). Die Tiere erhielten eine Diät mit normalem Proteingehalt (NP, 22% Kasein) oder erniedrigtem Proteingehalt (LP, 6% Kasein) (* $p<0,01$ vs. GN-NP, # $p<0,05$ vs. GN-NP+Arg oder GN-LP).

3.3.4.2 Glomeruläre Proteinexpression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1

Im Vergleich zu den normalen Kontrollen führte die GN-Induktion zu einer 8,9-fachen Zunahme der TGF-ß1-Synthese, einer 15-fachen Zunahme der Fibronektin-Synthese und einer 25-fachen Zunahme der PAI-1-Synthese (Abb. 31 und 32).

Beide Ansätze, die alleinige L-Argininingabe und die alleinige Proteinrestriktion, führten zu einer signifikanten Reduktion der Fibroseparameter. Im Vergleich zu den unbehandelten GN-Tieren (GN-NP 912±39 pg/ml) bewirkte die L-Argininingabe (GN-NP+Arg) eine Verminderung der TGF-ß1-Expression auf 551±87 pg/ml (-40%) (Abb. 31). Die glomeruläre Fibronektin-Produktion verminderte sich von 3801±160 ng/ml (GN-NP) auf 2266±287 ng/ml (-41%) (Abb. 32). Die PAI-1-Produktion sank von

178±18 ng/ml auf 78±12 ng/ml (-50%) (Abb. 32). Die alleinige Proteinrestriktion verminderte diese Parameter in vergleichbarem Umfang: TGF-ß1 510±71 pg/ml (-44%), Fibronektin 1884±206 ng/ml (–50%) und PAI-1 71±7 ng/ml (–60%) (Abb. 31 und 32). Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren sehr gering und statistisch nicht signifikant.

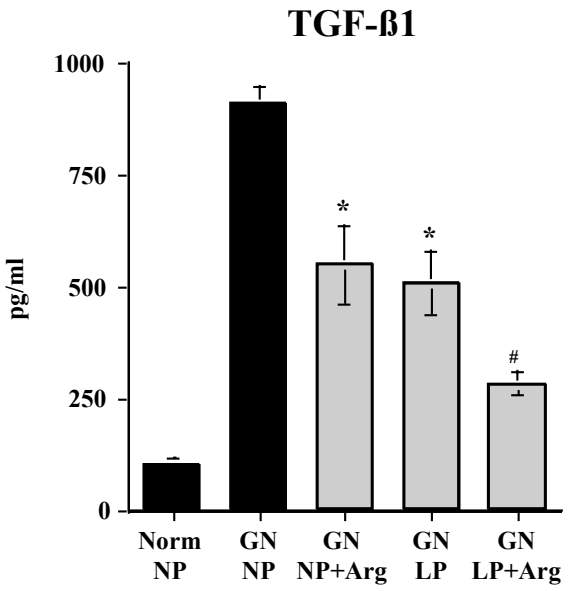

Abb. 31: Wirkung der L-Arginingabe auf die Proteinexpression von TGF-ß1 sechs Tage nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis. Die Expression von TGF-ß1 wurde im Überstand von kultivierten Glomeruli mittels ELISA gemessen (* $p<0,01$ vs. GN-NP, # $p<0,05$ vs. GN-NP+Arg oder GN-LP).

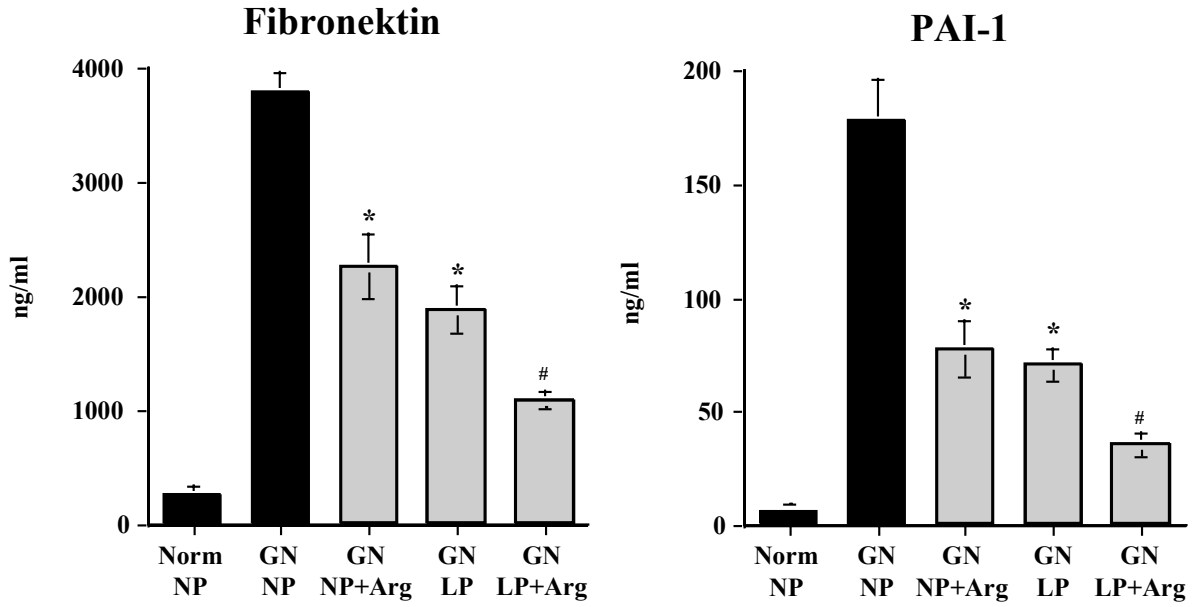

Abb. 32: Wirkung der L-Argininingabe auf die Proteinexpression von Fibronektin und PAI-1 sechs Tage nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis. Die Expression von Fibronektin und PAI-1 wurde im Überstand von kultivierten Glomeruli mittels ELISA gemessen (* $p<0,01$ vs. GN-NP, # $p<0,05$ vs. GN-NP+Arg oder GN-LP).

3.3.4.3 Glomeruläre mRNA-Expression von TGF-ß, Fibronektin und PAI-1

In Abb. 33 ist ein repräsentativer Northern-Blot dargestellt. Die Induktion der Glomerulonephritis (GN-NP) bewirkte einen 3,7-fachen Anstieg der TGF-ß1-mRNA, einen 35-fachen Anstieg der Fibronektin-mRNA und einen 63-fachen Anstieg der PAI-1-mRNA (Abb. 34 und 35).

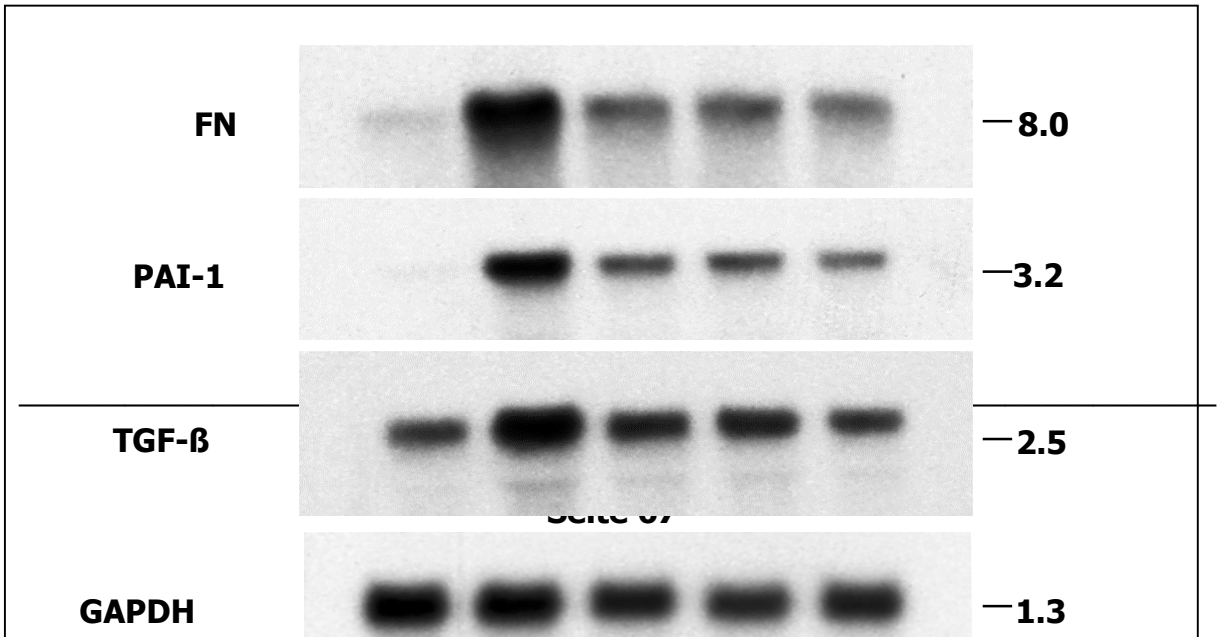

Abb. 33: Wirkung der L-Argininingabe auf die mRNA-Expression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 in Relation zur GAPDH-Expression sechs Tage nach Induktion der Glomerulonephritis. Abgebildet ist ein repräsentativer Northern-Blot.

Die L-Argininingabe und Proteinrestriktion zeigten auch auf mRNA-Ebene vergleichbar günstige Effekte (Abb. 34 und 35). Die L-Argininingabe senkte die TGF-ß1-Expression auf 2,46±0,11 (-34%), die Fibronektin-Expression auf 13,85±3,49 (-62%) und die PAI-1-Expression auf 25,78±7,18 (-60%). Mit der Niedrigproteindiät wurden vergleichbare Reduktionen erzielt: TGF-ß1 2,31±0,15 (-38%), Fibronektin 12,68±2,64 (-64%) und PAI-1 25,91±9,57 (-58%). Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren nicht signifikant.

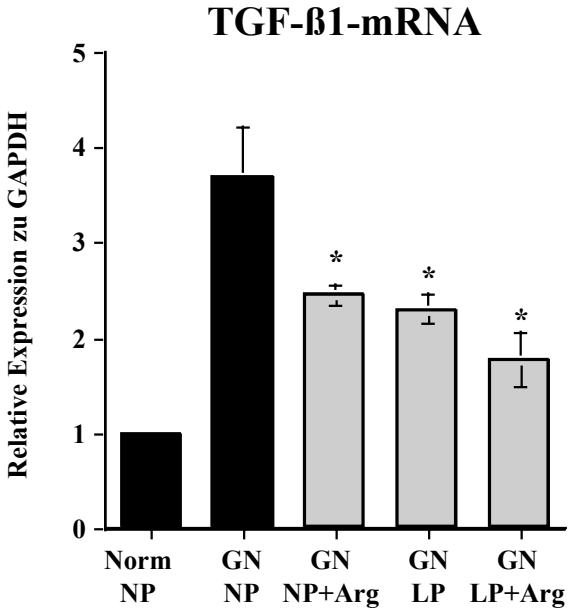

Abb. 34: Wirkung der L-Argininingabe auf die relative mRNA-Expression von TGF-ß1 im Vergleich zur Expression von GAPDH sechs Tage nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis (* p<0,01 vs. GN-NP).

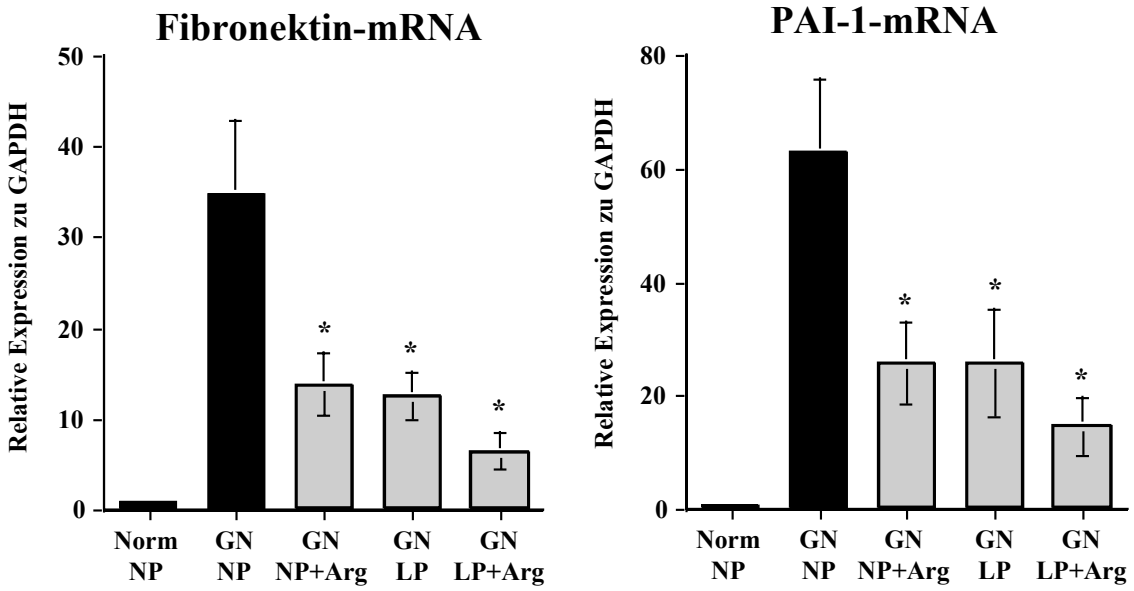

Abb. 35: Wirkung der L-Argininingabe auf die relative mRNA-Expression von Fibronektin und PAI-1 im Vergleich zur Expression von GAPDH sechs Tage nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis (* p<0,01 vs. GN-NP).

Gemeinsame Wirkung der L-Argininingabe und der Proteinrestriktion

Bei allen untersuchten Parametern, mit Ausnahme der Proteinurie, fanden sich bei der Kombination von L-Argininingabe und Proteinbeschränkung günstigere Effekte als bei alleiniger Therapie. So verminderten L-Arginin und Proteinrestriktion zusammen die Matrixakkumulation auf 1,89±0,04 ($p<0,05$ vs. GN-NP+Arg und GN-LP). Auf Proteinebene nahm die TGF-ß1-Expression auf insgesamt 284±26 pg/ml ab ($p<0,05$ vs. GN-NP+Arg und GN-LP). Im Vergleich zu den nephritischen Tieren ohne Behandlung wurde damit eine Reduktion um 69% erreicht. Die glomeruläre Fibronektin-Produktion nahm auf insgesamt 1086±76 ng/ml ab ($p<0,05$ vs. GN-NP+Arg und GN-LP, Gesamtreduktion -71%), die PAI-1-Produktion sank auf 36±5 ng/ml ab ($p<0,05$ vs. GN-NP+Arg und GN-LP, Gesamtreduktion -79%).

Auf mRNA-Ebene wurden für TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 von der Tendenz her vergleichbare Ergebnisse erzielt. Eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht. Die TGF-ß1-Expression wurde auf insgesamt 1,78±0,28 (p=NS vs. GN-NP+Arg und GN-LP) vermindert. Die glomeruläre Fibronektin-mRNA-Expression nahm auf insgesamt 6,54±1,93 (p=NS vs. GN-NP+Arg und GN-LP) und die PAI-1-mRNA-Expression auf insgesamt 14,83±5,12 ab (p=NS vs. GN-NP+Arg und GN-LP).

Zusammenfassend zeigen die Daten zur Matrixproteinexpression, daß 1) die L-Argininingabe auch in Abwesenheit von erhöhtem Blutdruck einen günstigen Einfluß auf die renale Matrixvermehrung nimmt, 2) die L-Argininingabe additiv günstig zur Eiweißrestriktion ist, und 3) die antifibrotische Wirkung der L-Argininingabe über eine Abnahme der TGF-ß-Expression vermittelt zu sein scheint.

3.3.5 Parameter der NO-Synthese

Die Wirkung der L-Argininingabe und der Proteinbeschränkung auf die NO-Synthese wurde anhand der Messung von Nitrat/Nitrat(NOx) im Plasma, Urin und im Überstand kultivierter Glomeruli ermittelt.

3.3.5.1 Plasma-NOx-Spiegel

Im Plasma ging weder die Induktion der Glomerulonephritis, noch die L-Argininingabe oder die Proteinrestriktion mit einer signifikanten Veränderungen der NOx-Konzentration einher (Abb. 36). Gemessen wurden 28±3 nmol/ml NOx in den normalen Kontrolltieren, 27±2 nmol/ml in den nephritischen Tieren ohne Behandlung, 26±5 nmol/ml in den Tieren mit normaler Proteinzufuhr und Gabe von L-Arginin, 28±2 nmol/ml in der Gruppe mit Proteinrestriktion, sowie 29±3 nmol/ml in der Gruppe mit Proteinrestriktion und Gabe von L-Arginin.

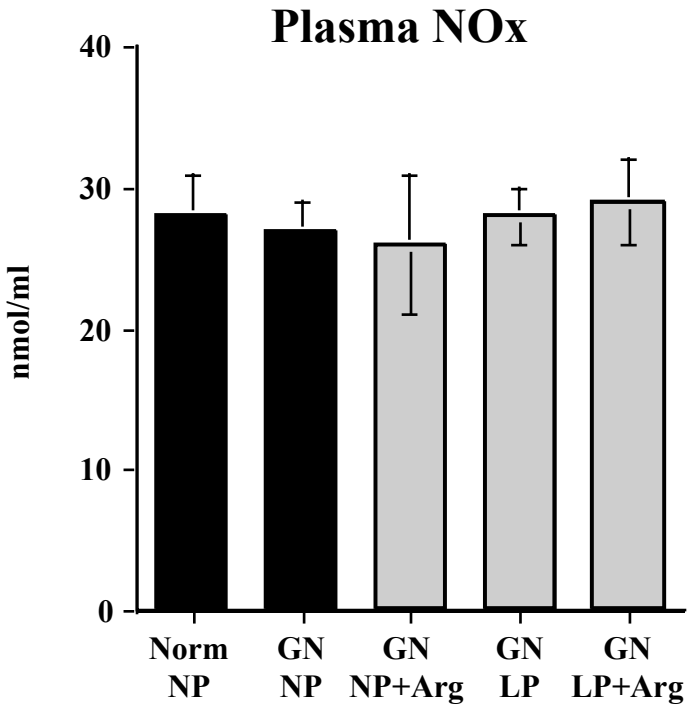

Abb. 36: Wirkung der L-Argininingabe auf die NOx-Spiegel im Plasma am Tag sechs nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis. Gemessen wurden Nitrit und Nitrat als Endprodukte des NO-Stoffwechsels.

3.3.5.2 Urin-NOx-Ausscheidung

Signifikante Unterschiede wurden in der NOx-Ausscheidung am Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis zwischen den Gruppen gefunden (Abb. 37). Im Urin der normalen Kontrolltiere wurde 3152±291 nmol/24h NOx gemessen. Weder die Glomerulonephritis (GN-NP 2563±553 nmol/24h) noch die L-Argininingabe (GN-NP+Arg, 3003±482 nmol/24h) zeigte einen signifikanten Einfluß auf die NOx-

Ausscheidung. Die Reduktion der Proteinzufuhr hingegen führte in beiden Gruppen zu einer signifikanten Abnahme der NOx-Ausscheidung, ohne das jedoch die L-Argininingabe einen eigenen Einfluß zeigte (GN-LP 1651±162 nmol/24h, GN-LP+Arg 1163±387 nmol/24h, beide p< 0,05 vs. Norm, GN-NP und GN-NP+Arg).

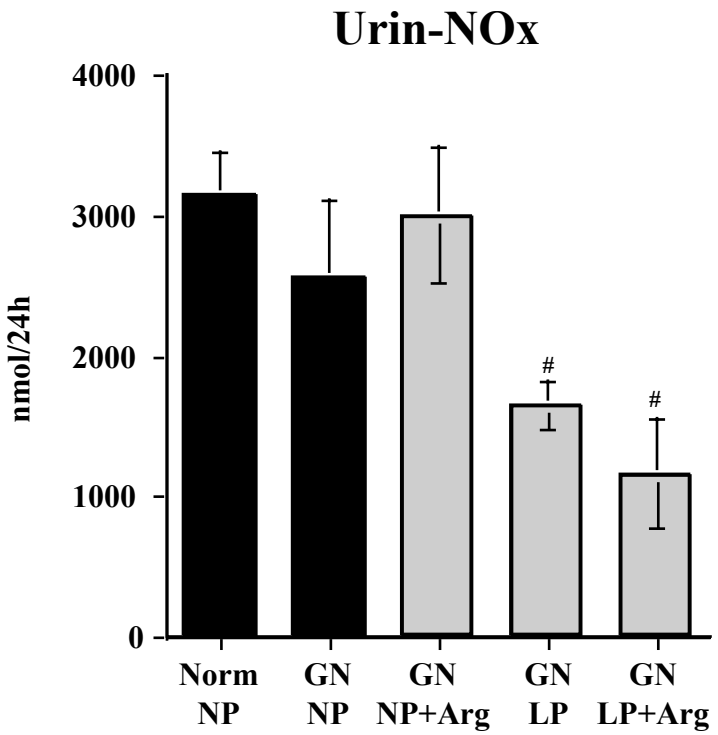

Abb. 37: Wirkung der L-Argininingabe auf die NOx-Ausscheidung am Tag sechs nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis. Gemessen wurden Nitrit und Nitrat als Endprodukte des NO-Stoffwechsels (# p<0,05 vs NP).

3.3.5.3 Glomeruläre NOx-Produktion

Auch bei der glomerulären NOx-Synthese fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 38). Im Vergleich zu den normalen Kontrolltieren (0,6±0,1 nmol/ml) bewirkte die Glomerulonephritis eine deutliche Zunahme der glomerulären NO-Synthese (GN-NP 3,4±0,5 nmol/ml). Die L-Argininingabe hatte in den nephritischen Tieren mit normaler Proteinzufuhr keinen weiteren Einfluß (3,4±0,8 nmol/ml). Die Reduktion der Proteinzufuhr bewirkte in beiden Gruppen wiederum eine deutliche Abnahme der glomerulären NOx-Produktion, ohne das jedoch wieder

normale Werte erreicht wurden. Gemessen wurden 1,3±0,3 nmol/ml in der GN-LP-Gruppe und 1,3±0,3 nmol/ml in der GN-LP+Arg-Gruppe. Auch hier zeigte die L-Argininingabe keinen eigenen Einfluß auf die glomeruläre NOx-Produktion

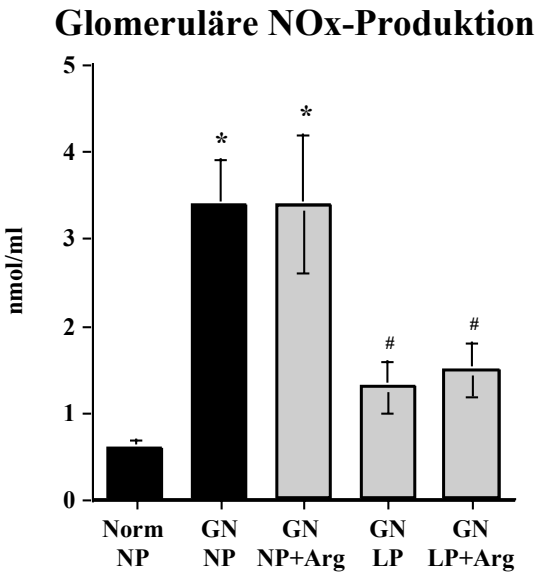

Abb. 38: Wirkung der L-Argininingabe auf die glomeruläre NOx-Produktion kultivierter Glomeruli sechs Tage nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis. Gemessen wurde Nitrit als Endprodukt des NO-Stoffwechsels (* $p<0,01$ vs. Norm, # $p<0,05$ vs. Norm, GN-NP und GN-NP+Arg).

Zusammenfassend zeigen die Daten des NO-Stoffwechsels, daß die Gabe von L-Arginin keinen signifikanten Einfluß auf die gemessenen Parameter der NO-Synthese hatte. Die Unterschiede, die beobachtet wurden, folgten vielmehr der jeweiligen Proteinzufuhr.

3.4 Wirkung der L-Argininingabe auf den Verlauf der Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus (Protokoll 3)

3.4.1 Basisdaten

Futter- und Trinkwasserverbrauch waren zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Daten nicht gezeigt). Die erreichte mittlere L-Argininzufuhr in den verschiedenen Versuchsgruppen ist in der Abb. 39 dargestellt. Gezeigt sind exemplarisch die Daten, die in der zweiten Versuchswoche erhoben wurden. In den Lupusmäusen mit normaler Proteinzufuhr wurden im Mittel 31,4±1,8 mg L-Arginin pro Tag zugeführt. In den Tieren mit zusätzlich 1% L-Arginin im Trinkwasser waren es 102,8±1,9 mg pro Tag. Die Reduktion der Proteinmenge im Futter verringerte die L-Argininzufuhr auf 9,7±0,1 mg pro Tag (LN-LP). Wurde zusätzlich 1% L-Arginin im Trinkwasser gegeben, erreichte die tägliche L-Argininzufuhr 73,6±6,4 mg (LN-LP+Arg).

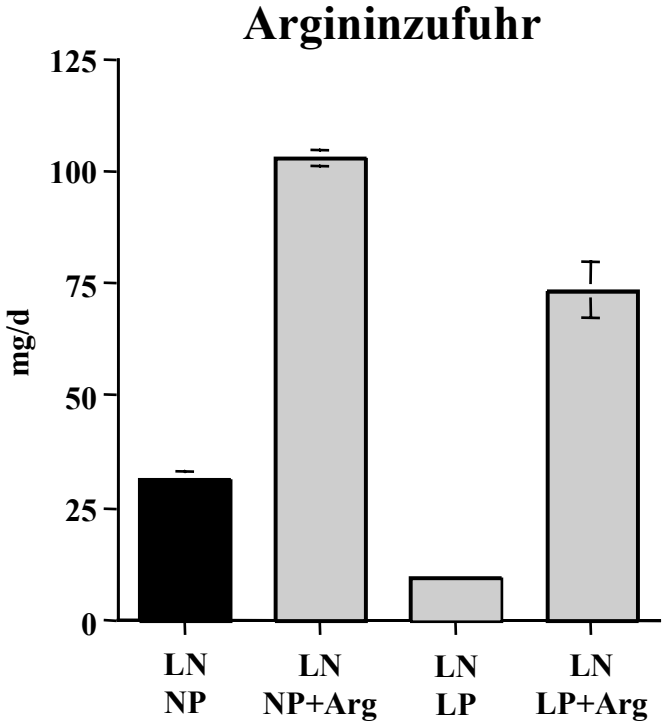

Abb. 39: L-Argininzufuhr in Lupusmäusen mit normaler Proteinzufuhr (NP, 22% Kasein) oder beschränkter Proteinzufuhr (LP, 6% Kasein). In Subgruppen wurde 1% L-Arginin(+Arg) im Trinkwasser gegeben. Exemplarisch für den Versuch sind Daten aus der zweiten Versuchswoche dargestellt.

Der Verlauf des Körpergewichts in den Versuchsgruppen ist in Abb. 40 dargestellt. Zu

Versuchsbeginn (16. Lebenswoche) wogen die Lupusmäuse ca. 40 g. Zwischen den Versuchsgruppen bestand kein signifikanter Unterschied. Das mittlere Startgewicht war 40,8±0,8 g in der LN-NP-Gruppe, 39,3±1,4 g in der LN-LP+Arg-Gruppe, 41,2±0,8 g in der LN-LP-Gruppe und 38,2±0,7 g in der LN-LP-Gruppe. Im Versuchsverlauf änderte sich das Gewicht in den verschiedenen Gruppen nicht signifikant. Am Versuchsende wogen die LN-NP-Tiere im Mittel 40,9±1,4 g, die LN-NP+Arg-Tiere 38,6±1,5 g, die LN-LP-Tiere 41,8±1,0 g und die LN-LP+Arg-Tiere 39,5±1,5 g. Diese Daten belegen, daß die erreichte Gesamtkalorienzufuhr in den verschiedenen Versuchsgruppen vergleichbar war und die im folgenden beschriebenen Veränderungen der Krankheitsaktivität nicht als Folge unterschiedlichen Freßverhaltens der Mäuse zu interpretieren sind.

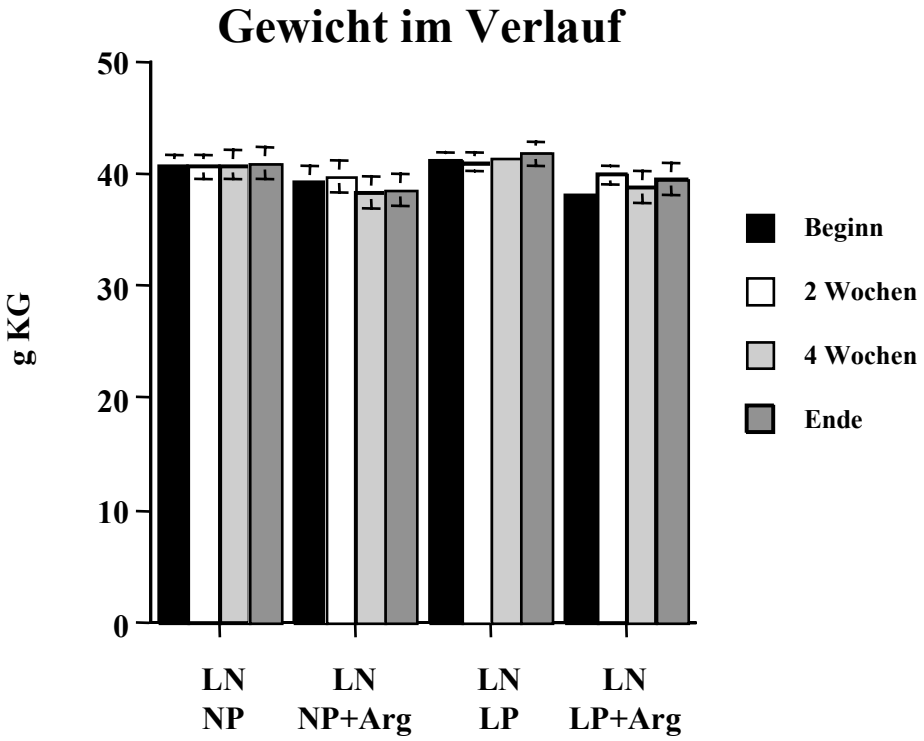

Abb. 40: Verlauf des mittleren Körpergewichts in Lupusmäusen mit normaler Proteinzufuhr (22% Kasein) oder beschränkter Proteinzufuhr (6% Kasein). In Subgruppen wurde 1% L-Arginin(+Arg) im Trinkwasser gegeben. Beginn des Versuchs war die 16. Lebenswoche (Beginn). Ende war die 21. Lebenswoche (Ende).

3.4.2 Albuminurie

In **Abb. 41** ist die Albuminausscheidung im 24-Stundenurin am Versuchsende (21. Lebenswoche) dargestellt. In der LN-NP-Gruppe wurden im Mittel 4,5±1,0 mg/24h Albumin im 24-Urin gemessen. Die Gabe von 1% L-Arginin im Trinkwasser verdoppelte die Albuminurie (LN-NP+ARG 8,9±2,7 mg/24h). Aufgrund der hohen Streuung verfehlte dieser Unterschied die statistische Signifikanz (p=0,14). Die Fütterung der Niedrigproteindiät verringerte signifikant die Albuminurie (LN-LP 0,3±0,1 mg/24h, p<0,001 vs. LN-NP). Die zusätzliche L-Argininingabe führte wieder zu einer signifikanten Zunahme der Albuminausscheidung (LN-LP+Arg 3,6±0,8 mg/24h, p< 0,05 vs. LN-LP).

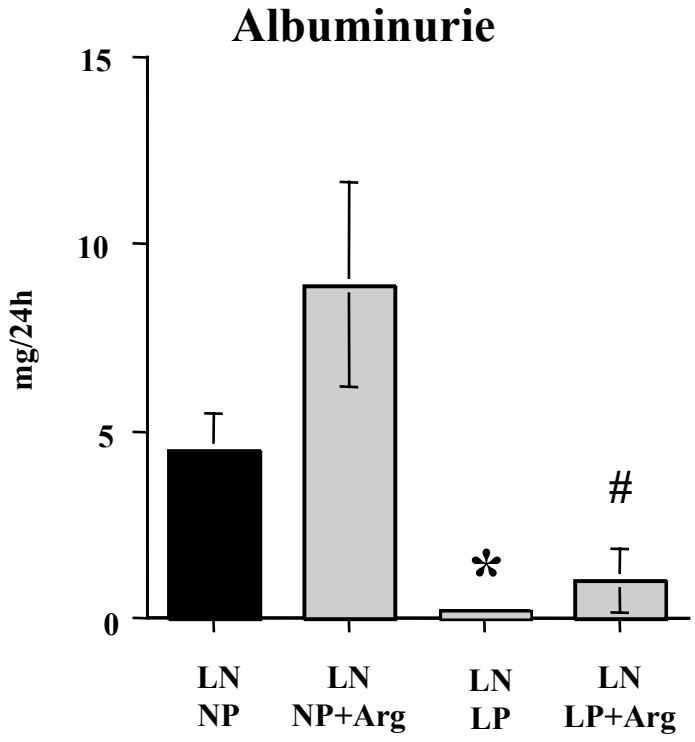

Abb. 41: Albuminausscheidung im 24-Stundenurin am Versuchsende (21. Lebenswoche). Gruppen von Lupusmäusen wurde eine Diät mit normalem (22% Kasein) oder verringertem Proteinanteil (6% Kasein) gefüttert. In Subgruppen wurde 1% L-Arginin(+Arg) im Trinkwasser gegeben. Der Urin wurde in Stoffwechselkäfigen gesammelt.:

3.4.3 Überlebensanalyse

Die Gabe von L-Arginin hatte einen deutlichen Einfluß auf die Überlebensrate der Lupusmäuse. In der Gruppe mit normaler Proteinzufuhr waren nach 39 Versuchstagen (21. Lebenswoche) 50% der Mäuse verstorben, so daß, wie geplant, die verbliebenen Tiere aller Versuchsgruppen zur Materialgewinnung getötet wurden.

In Abb. 40 sind die Überlebensdaten der MRL/lpr-Mäuse dargestellt. Dabei wurden die beiden Basisdiäten (22% und 6% Kasein) zusammengefaßt und die Tiere nur danach unterschieden, ob L-Arginin gegeben wurde oder nicht. Hiernach waren am Versuchsende 14 von 36 Tieren mit L-Argininingabe verstorben. Bei den Tieren ohne L-Argininingabe waren es nur 4 von 36 Tieren. Dieser Unterschied war hochsignifikant (p=0,008). In den Untergruppen zeigte sich, daß in der Gruppe mit normaler Protein-

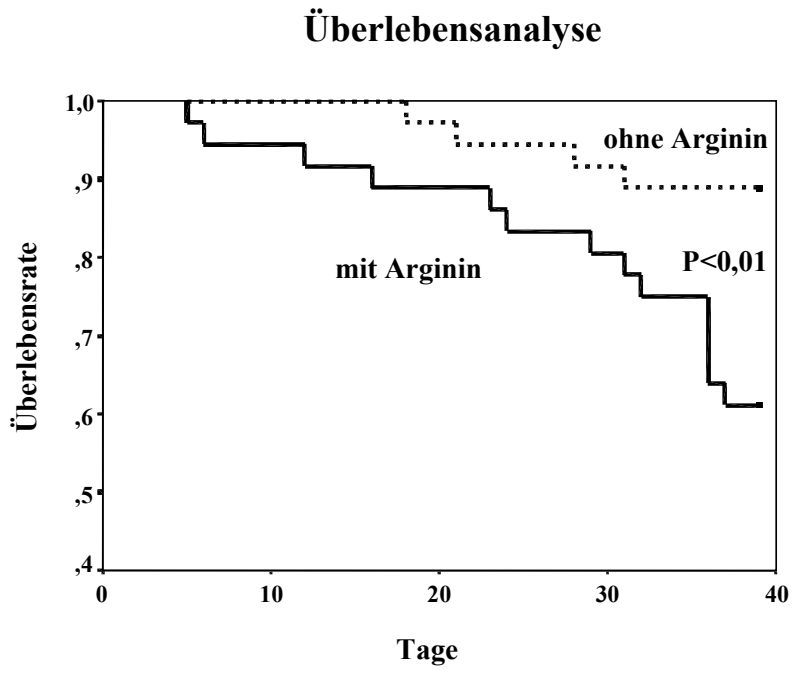

Abb. 42: Überlebensanalyse der Lupusmäuse. Ab der 16. Lebenswoche wurde 36 MRL/lpr-Mäusen 1% L-Arginin im Trinkwasser gegeben, 36 Lupusmäuse ohne L-Argininingabe dienten als Kontrollen. Die Basisdiät bestand zu gleichen Teilen aus 22% oder 6% Proteinzufuhr 9 von 18 Tieren mit L-Argininingabe und 4 von 18 Tieren ohne L-Argininingabe gestorben waren (p=0,09). In der Gruppe mit Proteinrestriktion waren es 5 von 18 Tieren mit L-Arginin und keines der Tiere ohne L-Arginin (p=0,01). Der Unterschied zwischen der LN-NP-Gruppe (4 von 18 Tiere) und der LN-LP-Gruppe (0 von 18 Tieren) war ebenfalls signifikant (p<0,05).

3.4.4 Marker der Matrixakkumulation

In den am Versuchsende getöteten Tieren wurde die Wirkung der L-Argininingabe auf die renale Matrixexpansion untersucht. In der Abb. 43 sind die Daten der histologischen Auswertung dargestellt. Dabei wurde die glomeruläre und tubulointerstitielle Matrixakkumulation zu einem gemeinsamen Score zusammengefaßt. In beiden Diätgruppen konnte ein ungünstiger Effekt von L-Arginin nachgewiesen werden. In Lupusmäusen mit normaler Proteinzufuhr fand sich ein renaler Matrixscore von 3,7±0,3. Die L-Argininingabe führte zu einer signifikanten Zunahme der Matrixakkumulation auf 4,5±0,4 (p<0,05). In den Tieren mit der Niedrigproteindiät wurde ein geringerer Matrixscore als in der Normalproteingruppe gemessen (2,3±0,3). Auch in dieser Diätgruppe führte die L-Argininingabe zu einer signifikanten Zunahme des Matrixscores (3,0±0,4, p<0,05).

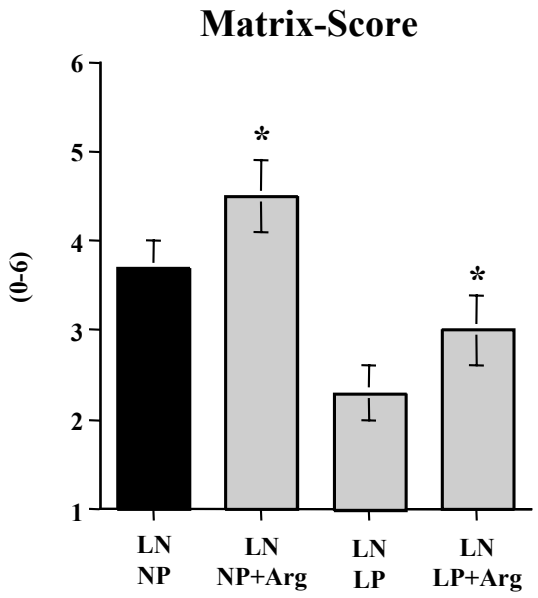

Abb. 43: Renale Matrixexpansion am Versuchsende. Die glomeruläre und tubulointerstitielle Matrixvermehrung wurde semiquantitativ bestimmt und zu einem gemeinsamen Matrixscore zusammengefaßt (* P< 0,05 ohne Arg vs. mit Arg).

Die Proteinexpression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 wurde in homogenisiertem Kortexgewebe untersucht. Die Meßergebnisse wurden jeweils auf 100 mg Naßgewicht Nierenkortex bezogen. Wie in Abb. 44 zu sehen ist, führte die L-Arginingabe in beiden Diätgruppen zu einer signifikant höheren TGF-ß1-Expression. In den Tieren mit normaler Proteinzufuhr stieg die TGF-ß1-Expression von 182±8 pg (LN-NP) auf 236±11 pg (LN-NP+Arg, p<0,01). In den Tieren mit verminderter Proteinzufuhr stieg sie von 141±8 pg (LN-LP) auf 187±11 pg (LN-LP+Arg, p<0,01). Im Vergleich zu den Tieren mit normaler Proteindiät führte die Proteinrestriktion zu einer signifikanten Verminderung der TGF-ß1-Expression (182±8 pg versus 141±8 pg, p<0,01).

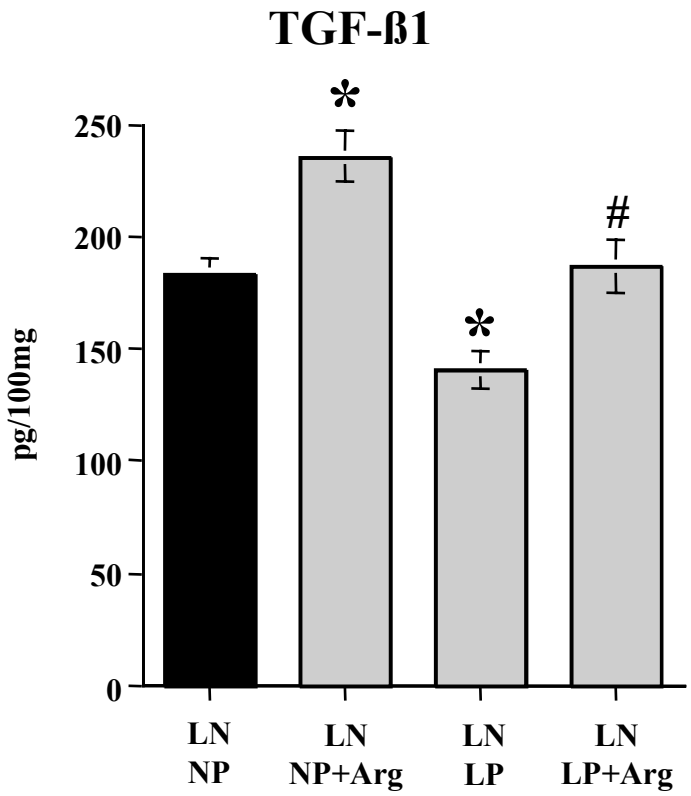

Abb. 44: Proteinexpression von TGF-ß1 im homogenisierten Nierenkortex von Lupusmäusen (LP) am Versuchsende. Die Tiere erhielten entweder eine Diät mit normalem (NP, 22 % Kasein) oder vermindertem Proteinanteil (LP, 6 % Kasein). In Subgruppen wurde 1% L-Arginin im Trinkwasser (+Arg) gegeben. Die TGF-ß1-Expression wurde mittels ELISA gemessen und ist bezogen auf 100 mg Naßgewicht Nierengewebe (* $p < 0,05$ vs. LN-NP, # $p<0,05$ vs. LN-NP).

Für die Expression von Fibronektin und PAI-1 wurden vergleichbare Daten erhoben, obgleich nicht alle Unterschiede immer statistische Signifikanz erreichten. Die Gabe von L-Arginin erhöhte in der Normalprotein-Gruppe die Fibronektin-Expression von 895±74 ng (LN-NP) auf 1092±66 ng (LN-NP+Arg, $p=0,06$) (Abb. 45). In der Niedrigprotein-Gruppe stieg sie von 768±34 ng (LN-LP) auf 949±66 ng (LN-LP+Arg, $p<0,05$). Die Expression von PAI-1 wurde in der Normalprotein-Gruppe durch L-Arginin von 27,7±2,5 ng (LN-NP) auf 29,6±3,6 ng (LN-NP+Arg, $p=0,66$) erhöht (Abb. 45). In der Niedrigprotein-Gruppe stieg sie von 19,8±1,5 ng (LN-LP) auf 24,2±1,7 ng (LN-LP+Arg, $p<0,05$). Der Unterschied zwischen der LN-NP- und der LN-LP-Gruppe war ebenfalls signifikant (27,7±2,5 ng vs. 19,8±1,5 ng, $p<0,01$).

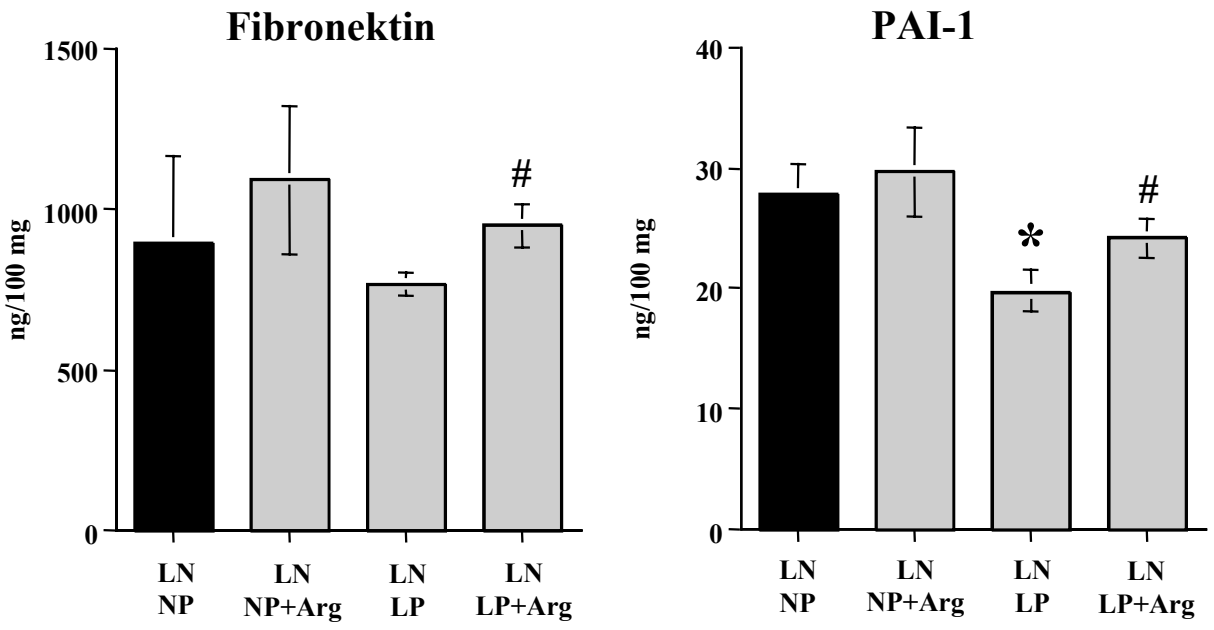

Abb. 45: Proteinexpression von Fibronektin und PAI-1 im homogenisierten Nierenkortex von Lupusmäusen (LP) am Versuchsende. Die Tiere erhielten entweder eine Diät mit normalem (NP, 22 % Kasein) oder vermindertem Proteinanteil (LP, 6 % Kasein). In Subgruppen wurde 1% L-Arginin im Trinkwasser (+Arg) gegeben. Die Fibronektin- und PAI-1-Expression wurde mittels ELISA gemessen und ist bezogen auf 100 mg Naßgewicht Nierengewebe (# $p<0,05$ vs LN-LP, * $p<0,05$ vs. LN-NP).

3.4.5 Anti-dsDNS-Antikörper

Die Bildung von dsDNS-Autoantikörpern ist ein wichtiges Kennzeichen für die Überaktivität des Immunsystems bei der Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus. Da die bisher beschriebenen Effekte über eine vermehrte bzw. verminderte Bildung von Auto-Antikörpern vermittelt sein könnte, untersuchten wir die Plasma-Titer der dsDNS-Antikörper in den einzelnen Versuchsgruppen am Versuchsende.

Wie in Abb. 46 dargestellt, hatten L-Arginingabe und Proteinrestriktion nur geringe, nicht signifikante Wirkungen auf die dsDNS-Antikörpertiter (ANOVA $p=0,92$). Die relative Menge der Antikörper ist dargestellt als die optische Dichte (OD), die im ELISA zur Messung der dsDNS-Antikörper gemessen wurde. In den Tieren mit

normaler Proteinzufuhr war der Antikörpertiter zwischen den Tieren mit und ohne L-Arginin fast gleich (LN-NP 0,382±0,06 OD vs. LN-NP+Arg 0,399±0,05 OD, p=0,84). Die Fütterung der Niedrigproteindiät verminderte tendenziell die Antikörpermenge (LN-LP 0,335±0,05 OD, p=0,57). Wurde zusätzlich L-Arginin gegeben, stieg der Antikörper-Titer leicht an (LN-LP+Arg 0,382±0,89, p=0,64)

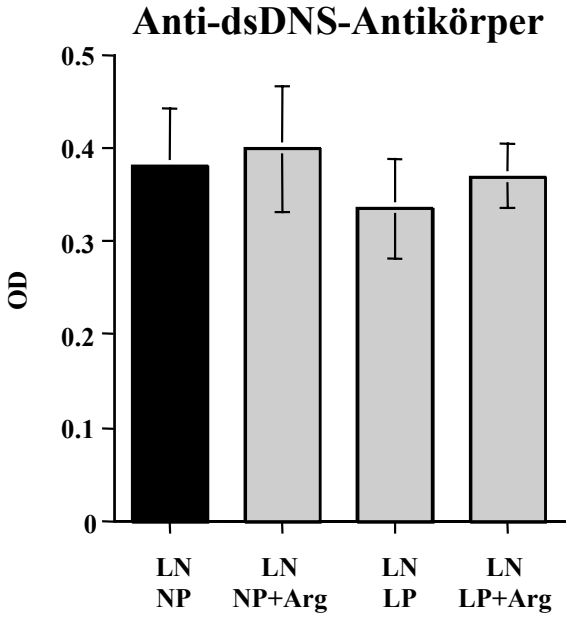

Abb. 46: Relative Titer von dsDNS-Antikörpern im Plasma von Lupusmäusen (LN) am Versuchsende. Die Tiere erhielten eine Normalprotein (NP)- oder Niedrigproteindiät (LP) ohne oder mit 1% L-Arginin im Trinkwasser (+ARG). Die Titerhöhe ist dargestellt als die relative OD, die im ELISA gemessen wurde.

Diese Daten zeigen somit, daß die Wirkungen der L-Argininingabe und der Proteinrestriktion nicht oder nur unwesentlich über eine Beeinflussung der Antikörperproduktion vermittelt werden.

3.4.6 Parameter der NO-Synthese

Als Indikator für die endogene NO-Synthese wurde bei den Lupusmäusen der NOx-Gehalt des Blutes gemessen. Hier zeigte sich, daß die L-Argininingabe in beiden Diätgruppen mit einer signifikant höheren NO-Synthese einher ging. In den Lupustieren mit normaler Proteinzufuhr stieg der Plasma-NOx-Spiegel von 69±4

nmol/ml auf 103±12 nmol/ml (p<0,05). In den Tieren mit Proteinrestriktion wurde im Plasma ein Anstieg von 79±6 nmol NOx/ml auf und 98±4 nmol NOx/ml gemessen (p<0,05).

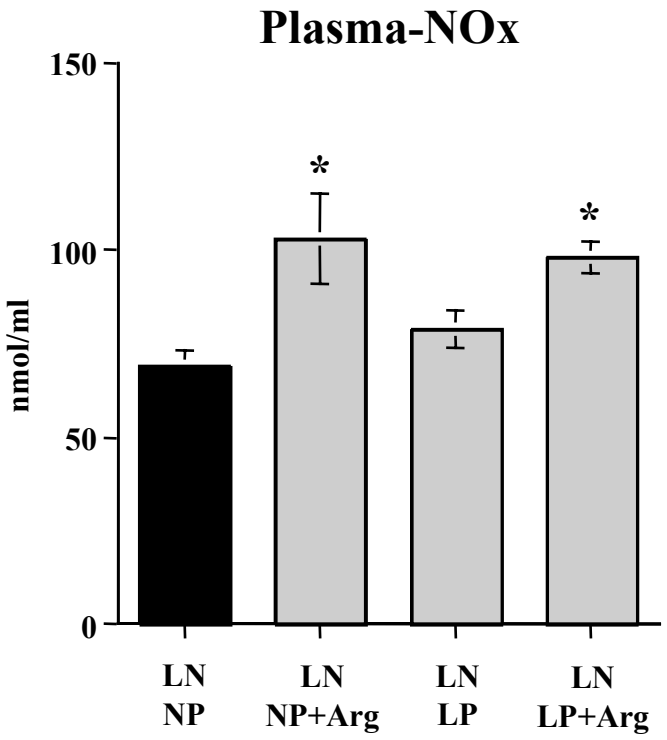

Abb. 47: Konzentration von Nitrit/Nitrat (NOx, beides Endprodukte von NO) im Plasma von Lupusmäusen (LN) am Versuchsende. Die Tiere erhielten eine Normalprotein (NP)- oder Niedrigproteindiät (LP) ohne oder mit 1% L-Arginin im Trinkwasser (+ARG). NOx wurde nach Nitratreduktasebehandlung mittels der Griess-Reaktion gemessen (* p< 0,05 vs. LN-NP und LN-LP).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß die L-Argininingabe bei der Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus mit einer deutlich höheren NO-Synthese einher geht. Mit Blick auf die Schlüsselrolle, die die NOS II für die Nierenschädigung in diesem Modell spielt, lassen diese Daten vermuten, daß die negative Wirkung der L-Argininingabe über eine vermehrte, destruktive NO-Synthese vermittelt wurde.

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die Gabe von L-Arginin deutliche und pathophysiologisch wichtige Wirkungen auf die Matrixvermehrung bei akuter und chronischer Glomerulonephritis/Glomerulosklerose ausübt. In den drei Versuchsprotokollen konnten dabei sowohl günstige als auch ungünstige Effekte von L-Arginin auf die renale Matrixexpansion charakterisiert und voneinander abgegrenzt werden. Bevor die Daten im einzelnen besprochen und interpretiert werden, sollen zunächst die Vor- und Nachteile der verwandten Methodik diskutiert werden.

4.1 Methodenkritik

4.1.1 Tiermodelle

In dieser Arbeit wurde die Anti-Thy1-Glomerulonephritis der Ratte und die Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus verwandt, um die potentielle Bedeutung der L-Argininingabe für die Behandlung der Glomerulonephritis/Glomerulosklerose beim Menschen zu explorieren. Beide experimentellen Formen der Glomerulonephritis sind gut etablierte und charakterisierte Modelle humaner Erkrankungen. Die Anti-Thy1-Glomerulonephritis zeigt viele Parallelen zur IgA-Nephropathie[35]. Die Nephritis der MRL/lpr-Maus ist der humanen Lupusnephritis nahe verwandt[37].

Die Anti-Thy1-Glomerulonephritis ist ein Modell der akuten renalen Matrixvermehrung[26]. Ein wesentlicher Vorteil dieses Modells ist die relativ klare zeitliche Staffelung der Wundheilungssequenz und damit die Möglichkeit, spezifisch Untersuchungen zur Schädigungs- und Matrixexpansionsphase vornehmen zu können[35;80]. Die Schädigungsphase der Anti-Thy1-Glomerulonephritis ist charakterisiert durch eine kurze, NO-vermittelte Lyse von Mesangialzellen[81]. In vergleichbarer Weise wird die Nierenschädigung bei der Lupusnephritis und der akuten Tubulusnekrose durch zytotoxische Mengen NO vermittelt[37;54]. Die folgende Phase der Matrixexpansion ist gekennzeichnet durch die Proliferation von Mesangialzellen und zunehmender Matrixexpansion im Glomerulum[80;81]. Histologisch

entspricht die Anti-Thy1-Glomerulonephritis in dieser Phase dem Bild der humanen mesangioproliferativen Glomerulonephritis und der IgA-Nephropathie. Die molekularen Mechanismen der Matrixvermehrung in dieser Phase der Anti-Thy1-Glomerulonephritis unterscheiden sich im Prinzip nicht von denen, wie sie auch bei der diabetischen und der hypertensiven Nierenfibrose zu beobachten sind[26].

Die Anti-Thy1-Glomerulonephritis ist spontan reversibel, d. h. sie heilt auch ohne Therapie von selbst wieder aus[26]. Es ist daher wiederholt die Frage gestellt worden, ob eine akut reversible Form der Matrixvermehrung überhaupt von Bedeutung für chronisch-fortschreitende Nierenfibrose sein kann. Obgleich diese Frage nicht eindeutig zu beantworten ist, gibt es eine Reihe von Argumenten, die für eine Relevanz der Anti-Thy1-Glomerulonephritis sprechen. Wie bereits in der Einleitung dargelegt, sind die molekularen Mechanismen bei akuter und chronischer Matrixvermehrung im Prinzip gleich[2;26]. Zentrale Kennzeichen beider Formen der Matrixakkumulation sind TGF-ß-Überexpression, vermehrte Matrixsynthese und gehemmter Matrixabbau. Der Grund dafür, daß einige Nierenerkrankungen akut und andere chronisch verlaufen, scheint vielmehr darin zu liegen, daß die schädigende Ursache bei akuten Krankheiten nur kurz und bei chronischen über einen längeren Zeitraum auf die Niere einwirkt[26]. Im Einklang mit diesem Konzept ist die Beobachtung, daß die akute Anti-Thy1-Glomerulonephritis durch wiederholte Antikörperinjektion in eine chronische Form überführt werden kann[82]. Ein weiteres, wichtiges Argument für die Relevanz der Anti-Thy1-Glomerulonephritis ergibt sich aus der Beobachtung, daß wirksame Therapien bei chronischer Nierenfibrose sich gleichermaßen günstig auf die Matrixexpansion bei akut-reversiblen Erkrankungen auswirken[40;77;83]. Um der potentiellen Limitierung des Anti-Thy1-Modells jedoch zu begegnen, wurde in dieser Arbeit die Wirkung von L-Arginin auch in einem renalen Modell der chronisch-fortschreitenden Matrixvermehrung geprüft.

Die Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus ist ein Modell für eine chronisch-fortschreitende Form der renalen Matrixexpansion. Wie die humane Lupusnephritis ist die Nephritis der MRL/lpr-Maus eine Immunkomplexnephritis[36]. Der immunologische Nierenschaden wird im wesentlichen über die Produktion von zytotoxischen Mengen NO vermittelt[37]. Die fortschreitende Matrixexpansion bei der Lupusnephritis führt zu einer progressiven Einschränkung der Nierenfunktion und die Mäuse versterben schließlich an den Folgen der Urämie.

Obgleich Tiermodelle, wie die Anti-Thy1-Glomerulonephritis und die MRL/lpr-Lupusnephritis, Einblicke in die Pathogenese und Therapie von humaner Glomerulonephritis geben können, muß in jedem Einzelfall geprüft werden, in welchem Maß die experimentellen Daten tatsächlich auf die humane Situation

übertragen werden dürfen. Für die Fragestellung dieser Arbeit soll dieses im letzten Teil der Diskussion erfolgen. Grundsätzlich muß hervorgehoben werden, daß der Einsatz von Tiermodellen ganz wesentlich zu unserem aktuellen Verständnis der Pathogenese von humaner Nierenfibrose beigetragen haben. Dieses gilt auch für die unterschiedlichen Formen der Glomerulonephritis/Glomerulosklerose. Humanes Untersuchungsmaterial, wie Blut, Urin und Nierengewebe, steht nur in begrenzter Menge zur Verfügung und erlaubt nur sehr gezielte Untersuchungen.

Die Entstehung von Nierenerkrankungen und ihr Fortschreiten zur Nierenfibrose ist ein sehr komplexer Vorgang. Er beruht auf dem wechselseitigen Zusammenwirken von verschiedenen Nierenzellen (Endothelzellen, Podozyten, Mesangialzellen, Fibroblasten, Tubulusepithelien) und unterschiedlichen Blutzellen (Makrophagen, Lymphozyten, Thrombozyten) und systemischen Faktoren (Antikörper, Blutdruck, Substratangebot). Die Interaktionen zwischen diesen Faktoren sind sehr vielschichtig. In Zellkultur kann die Komplexität der in-vivo-Situation nur ungenügend nachgeahmt werden. Zellkulturarbeiten haben daher nur sehr begrenzte Einblicke in die Pathogenese von Nierenerkrankungen erlaubt. Tierexperimentelles Arbeiten hat hingegen den Vorteil, daß zumindest im Prinzip alle für die Entstehung und den Verlauf von Nierenkrankheiten wichtigen Faktoren vorhanden und wirksam sind. Tiermodelle bieten zudem die Möglichkeit, daß Krankheiten in verschiedenen Phasen, insbesondere auch der Frühphase, umfassend untersucht werden können. Weiterhin können neue Behandlungsansätze in Tiermodellen identifiziert und geprüft werden. Eine wesentliche Aufgabe von Tierversuchen besteht darin, neue Fragestellungen zu entwickeln und so einzugrenzen, daß sie an dem nur begrenzt zur Verfügung stehendem menschlichen Material zielgerichtet beantwortet werden können.

4.1.2 Messung der Fibroseaktivität bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis

Die Anti-Thy1-Glomerulonephritis ist eine rein glomeruläre Erkrankung. Da Glomeruli nur ca. 3% der Gesamtmasse des Nierenkortex ausmachen, müssen sie mittels eines besonderen, abgestuften Siebverfahrens isoliert und angereichert werden. Die Vorarbeiten dieser Arbeit dienten u. a. dazu, eine neue sensitive und objektivierbare Methodik zur Messung der „Fibroseaktivität" bei der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis zu entwickeln und zu validieren. Vor dem Beginn unser Untersuchungen war eine Analyse der „Fibroseaktivität" einzelner Tiere nur mittels subjektiver histologischer Methoden möglich. Eine objektive Messung der Fibroseaktivität war andererseits nur mittels Western- oder Northern-Blot-Messung erreichbar. Aufgrund des hohen Materialbedarfs müssen für diese Methoden aber die Glomeruli von 3-4 Tieren gepoolt werden.

Wünschenswert bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis war eine Methodik zur objektivierbaren Bestimmung von Fibroseparametern bei Einzeltieren. Zur Umsetzung wurde daher zum einen ein Siebverfahren von Glomeruli einzelner Tiere und zum anderen ELISA-Methoden zur Messung von Matrixproteinen im glomerulären Kulturüberstand entwickelt. Wie im Ergebnisteil unter 3.1 gezeigt, war die glomeruläre Ausbeute bei normalen und nephritischen Tieren für die weiteren Einzeltieranalysen ausreichend. Bei den normalen Tieren war die glomeruläre Ausbeute niedriger als bei den nephritischen Tieren. Diese konnte auch durch die Verwendung von Auffangsieben mit kleinerer Porengröße nicht verbessert werden. Ursache für dieses Phänomen ist wahrscheinlich der höhere Matrixproteingehalt der nephritischen Glomeruli. Dieser bewirkt zum einen ein höheres Volumen der Glomeruli, die dann eher auf dem Auffangsieb zurückgehalten werden. Zum anderen scheint der höhere Matrixgehalt die Glomeruli vor der mechanischen Belastung des Isoliervorganges zu schützen. Mehr Glomeruli bleiben intakt und gehen nicht im Rahmen des Siebvorganges verloren. Die geringere Ausbeute normaler Glomeruli dürfte sich aber nicht auf die Meßwerte für die normalen Kontrolltiere auswirken, da die Glomeruli normaler Tiere in ihrem Matrixproteingehalt und in ihrer Matrixproteinsynthese relativ homogen sind.

Bei normalen und nephritischen Tieren konnten genügend Glomeruli isoliert werden, um im glomerulären Lysat und im glomerulären Kulturüberstand die Matrixproteine TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 sensitiv und reproduzierbar zu messen. Die weiteren Ergebnisse zur Etablierung und Validierung der ELISA-Meßmethodik sind in den folgenden Abschnitten diskutiert.

4.1.3 Maximierung der Differenz zwischen normaler und nephritischer Matrixproteinexpression

Ein wesentliches Ziel der Vorversuche war es, bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis die Versuchsbedingungen so zu optimieren, daß eine möglichst große Differenz zwischen normaler und pathologischer Matrixproteinexpression erreicht wird. Dieses Ziel wurde verfolgt, um 1) möglichst sensitiv antifibrotische Effekte zu erfassen und 2) die therapeutische Wirksamkeit von unterschiedlichen Therapien möglichst genau untereinander vergleichen zu können. In den Vorversuchen konnten zusammenfassend dann die folgenden Ergebnisse festgehalten werden:

1. Die Glomeruli normaler und nephritischer Tiere sind über mindestens 3 Tage vital und produzieren mit relativ konstanter Rate die Matrixproteine TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 in den Kulturüberstand.
2. Die Matrixproteinsynthese in Kultur korreliert eng mit der Konzentration dieser Matrixproteine in-vivo.
3. Die Messung der Matrixproteine im glomerulären Kulturüberstand hat den Vorteil, daß hier viel größere Unterschiede zwischen normaler und nephritischer Expression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 zu finden sind als im glomerulären Lysat.
4. Die höchste Produktion von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 fand sich am Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis. Der Anstieg der Matrixproteine in den ersten 24 Stunden ist wahrscheinlich Folge der abgelaufenen Mesangialzellyse und nicht Ausdruck einer gesteigerten glomerulären Synthese.
5. Die Injektion von 1,5 mg OX-7 pro kg Körpergewicht führt zu einer hohen und relativ homogenen Induktion der Matrixproteinproduktion am Tag 6 nach Induktion der Glomerulonephritis.

Mit diesem optimiertem und objektivierbarem Meßsystem wurde dann die Wirkung der L-Argininingabe bei Anti-Thy1-Glomerulonephritis untersucht. Dabei wurden die Vorteile unserer neuen Vorgehensweise insbesondere in Protokoll 2 sichtbar. Während mit der neuen Meßmethodik ein additiv-günstiger Effekt von L-Arginin und Proteinrestriktion zu dokumentieren war, war diese Wirkung mit der herkömmlichen Meßmethodik (Northern-Blotting) nicht möglich. Für diesem Unterschied spielt neben der ausgesprochenen Sensitivität und der hohen Reproduzierbarkeit bei der ELISA-Messung sicherlich auch die größere Probenzahl (8 Einzeltiere vs. 3 Messungen aus 2 gepoolten RNA-Proben) eine große Rolle.

4.1.4 Expression von TGF-ß1 als zentraler Meßparameter

In dieser Arbeit wurde der Expression von TGF-ß1 eine zentrale Rolle bei der Messung von pro- und antifibrotischen Wirkungen eingeräumt. Dieses ergibt sich im wesentlichen aus der Schlüsselrolle, die der Überexpression von TGF-ß für die renale Matrixvermehrung zugeschrieben wird[2]. In unseren Versuchen wurden zusätzlich Fibronektin als Marker für die Matrixproteinsynthese und PAI-1 als Marker für den Matrixproteinabbau gemessen. Diese Messungen dienten u. a. dazu, TGF-ß-unabhängige Effekte von L-Arginin auf die Matrixexpansion zu erfassen. Die drei molekularen Parameter der Fibroseaktivität wurden zudem in Beziehung zur

histologisch meßbaren Matrixexpansion gesetzt.

In allen drei Versuchsprotokollen wurde die zentrale Bedeutung von TGF-ß für die renale Matrixvermehrung bestätigt. Sowohl bei der akuten Anti-Thy1-Glomerulnephritis als auch bei der chronischen Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus folgte die Expression von TGF-ß unmittelbar der histologisch bestimmbaren Matrixexpansion. Die Expression von Fibronektin und PAI-1 wiederum folgte im wesentlichen der Expression von TGF-ß1, so daß diese Untersuchungen keinen Hinweis auf TGF-ß-unabhängige Wege der renalen Matrixexpansion erbrachte. Die Ergebnisse des 2. Versuchsprotokolls zeigen zudem, daß die Expression von TGF-ß ein valider und sensitiver Parameter ist, um die antifibrotische Wirksamkeit von alten und neuen Therapien zu messen und einander gegenüber zu stellen.

4.2 Wirkung der L-Argininingabe bei immun-vermittelter akuter und chronischer Glomerulofibrose

Ziel dieser Habilitationsarbeit war es, das therapeutische Potential und die proinflammatorischen Risiken der L-Argininingabe bei immun-vermittelter Glomerulonephritis/Glomerulosklerose zu charakterisieren. Im folgenden werden die Ergebnisse der drei durchgeführten Versuchsprotokolle diskutiert.

4.2.1 Wirkung der L-Argininingabe auf die Mesangialzellschädigung bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Protokoll 1)

In diesem Versuchsprotokoll wurde gefragt, ob die Gabe von L-Arginin die kurzzeitige, NO-vermittelte Mesangialzellschädigung der Anti-Thy1-Glomerulonephritis verstärkt oder abschwächt und über welchen Mechanismus dieser Effekt vermittelt wird[33]?. Darüber hinaus wurde gefragt, ob sich im weiteren Verlauf der Erkrankung die Veränderungen in der Mesangialzellyse in einer verstärkten oder verminderten Matrixexpansion widerspiegeln?

Wie im Ergebnisteil unter 3.2.2 dargestellt, führte die Gabe von L-Arginin vor und während der Induktion der Glomerulonephritis zu einer moderaten, aber signifikant

stärkeren Mesangialzellyse. Dieses Ergebnis ist von zentraler Bedeutung für die Fragestellung von Protokoll 1. Sein Stellenwert wird jedoch dadurch geschmälert, daß es nur auf einem subjektiv bestimmbaren Parameter beruht. Einen objektiv meßbaren Parameter für die Mesangialzellyse gibt es jedoch nicht. Um die Daten weiter zu untermauern, haben wir uns zu nutzte gemacht, daß sich das Ausmaß der Mesangialzellyse im Grad der nachfolgenden Matrixexpansion reflektiert. In einem weiteren Versuchsset wurde daher die Gabe von L-Arginin 16 Stunden nach Antikörperinjektion gestoppt, um die folgende Phase der Matrixexpansion bei normaler L-Argininzufuhr weiter ablaufen zu lassen. Wie in den Abb. 23-25 dargestellt, zeigte sich in diesem Versuchsteil, daß die L-Argininvorbehandlung tatsächlich von einer verstärkten Fibrosereaktion im weiteren Verlauf der Glomerulonephritis gefolgt wurde. Dieses konnte zu einem mittels der tatsächlich im Glomerulum angesammelten Matrixmenge im Matrixscore (subjektive Methode) zum anderen anhand der Expression der molekularen Fibroseparameter TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 (objektive Methoden) dokumentiert werden. Wie bei der Mesangialzellyse waren die Effekte der L-Argininvorbehandlung moderat aber signifikant nachweisbar. Diese Daten zeigen somit, daß die Gabe von L-Arginin proinflammatorisch und profibrotisch wirkt, wenn die NOS II exprimiert ist und eine Schlüsselrolle bei der renalen Gewebsschädigung spielt.

Als nächstes wurde gefragt, ob die ungünstige Wirkung von L-Arginin auf die Mesangialzellschädigung von einer stärkeren NO-Synthese begleitet bzw. durch diese bedingt ist? Zur Messung der in-vivo-NO-Synthese wurde die NOx-Konzentration im Plasma der Tiere sechs Stunden nach Induktion der Glomerulonephritis gemessen. Wie in Abb. 20 dargestellt, fand sich bei den nephritischen Tieren mit normaler L-Argininzufuhr ein signifikanter Anstieg der Plasma-NOx-Spiegel als Ausdruck einer höheren körpereigenen NO-Synthese. In den mit L-Arginin vorbehandelten Tieren wurde ein weiterer signifikanter Anstieg der Plasma-NOx-Konzentrationen gemessen, was auf eine noch höhere endogene NO-Synthese infolge der L-Argininingabe hinweist.

Der Anstieg der NO-Synthese bei den nephritischen Tieren mit L-Arginin konnte im Prinzip durch zwei Mechanismen erklärt sein. Zum einen konnte er Folge einer verstärkten Inflammationsantwort mit größerer Expression der NOS II sein. Zum anderen war vorstellbar, daß für die im Glomerulum exprimierten NOS II-Enzyme mehr Substrat zur Produktion von NO zur Verfügung stand. Beide Möglichkeiten wurden untersucht.

Wie in den Abb. 16-18 gezeigt, hatte die Gabe von L-Arginin keinen Einfluß auf den Grad der NOS II-Expression nach Injektion von Anti-Thy1-Antikörpern. Die Zahl der Makrophagen als Hauptträger der NOS II unterschied sich nicht signifikant zwischen

nephritischen Tieren mit und ohne L-Argininingabe. Gleichermaßen fanden sich auch keine signifikanten Unterschiede bei der direkten Messung der NOS II-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene. Die Daten zur Makrophagen-Infiltration stehen im Gegensatz zu Ergebnissen bei experimenteller obstruktiver Nephropathie und Puromycin-induzierter Nephrose[10]. Hier war die L-Argininingabe mit einer deutlichen Verminderung der Zahl infiltrierender Makrophagen einher gegangen.

Die Untersuchung der Plasma-L-Argininspiegel und der NO-Produktion nephritischer Glomeruli erbrachte deutliche Hinweise, daß die ungünstige Wirkung von L-Arginin über ein verstärktes Substratangebot vermittelt wurde. So führte die Induktion der Glomerulonephritis in den Tieren mit normaler L-Argininzufuhr zu einer signifikanten Abnahme der L-Argininkonzentration im Plasma. Im Vergleich dazu waren die L-Argininspiegel in den Tieren mit L-Argininingabe fast doppelt so hoch. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, daß die NO-Produktion nephritischer Glomeruli stark von dem extrazellulären L-Argininangebot abhängig ist. Ein deutlicher Anstieg der NO-Synthese wurde zwischen den L-Argininkonzentrationen beobachtet, die im Plasma von nephritischen Tieren mit und ohne L-Argininingabe gemessen wurden.

Aus den Daten zur Wirkung der L-Argininingabe auf die Mesangialzellyse der Anti-Thy1-Glomerulonephritis können zwei weitere wichtige Schlußfolgerungen abgeleitet werden:

1. Die Daten untermauern das in der Einleitung entwickelte Konzept, daß das Ausmaß der renalen Matrixexpansion den Grad des voran gegangenen Gewebsschadens widerspiegelt.
2. Die nur moderate Verstärkung der Zellyse und der nachfolgenden Matrixvermehrung durch L-Arginin ist wahrscheinlich Folge der nur kurzzeitigen Expression der NOS II bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis. Hieraus ergibt sich die Hypothese, daß die L-Argininingabe bei fortwährender NOS II-abhängiger Schädigung (z. B. wie bei der Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus) zu einem stetigen Fortschreiten der renalen Matrixexpansion führen sollte. Diese Hypothese wurde in Protokoll 3 geprüft.

Zusammenfassend zeigen die Daten des 1. Versuchsprotokolls, daß die Gabe von L-Arginin die Anti-Thy1-induzierte Mesangialzellschädigung über ein erhöhtes Substratangebot moderat verstärkt. Als Folge kommt es zu einer mäßig verstärkten TGF-ß-Überexpression und Matrixexpansion. Diese Daten zeigen ein bedeutsames proinflammatorisches und profibrotisches Risiko der L-Argininingabe auf.

4.2.2 Wirkung der L-Argininingabe auf die TGF-ß1-Expression und Matrixexpansion nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Protokoll 2)

In diesem Versuchsprotokoll wurde gefragt, ob die Gabe von L-Arginin die blutdruckunabhängige, immunologisch-induzierte Matrixexpansion bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis verstärkt oder vermindert und über welchen L-Argininmetaboliten dieser Effekt vermittelt wird[73;74]? Darüber hinaus wurde gefragt, welche Rolle spielt die Expression von TGF-ß als Mediator für pro- bzw. antifibrotische Effekte und wie ist die Wirkung von L-Arginin im Vergleich zum Therapiestandard Proteinrestriktion?

In diesem Protokoll wurde L-Arginin beginnend 24 Stunden nach Induktion der Glomerulonephritis gegeben. Zu diesem Zeitpunkt ist die Mesangialzellyse bereits nahezu komplett abgelaufen[81]. Nach fünf Tagen L-Argininingabe wurden histologische und molekulare Fibrosemarker gemessen. Wie in der Abb. 30 dargestellt, war in den nephritischen Tieren mit L-Arginin histologisch deutlich weniger Matrix nachweisbar als in den Tieren mit normaler L-Argininzufuhr. Im Einklang mit diesem Ergebnis ging die Gabe von L-Arginin auch mit einer geringeren Expression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 einher. Dieses konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene belegt werden.

Als nächstes wurde gefragt, wie groß ist das antifibrotische Potential von L-Arginin im Vergleich zur bekannten Wirksamkeit der diätetischen Proteinrestriktion und können beide Ansätze zusammen sich ergänzen? Hierzu wurden beide Therapien allein und in Kombination direkt miteinander verglichen. Wie in der Abb. 33 gezeigt, war der Grad der antifibrotischen Wirkung von L-Arginin im Kern dem einer diätetischen Proteinrestriktion vergleichbar. Dieses zeigte sich sowohl in der histologischen Matrixakkumulation als auch für die Expression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 auf mRNA- und Proteinebene. Die kombinierte Behandlung mit L-Arginin und Proteinrestriktion zeigte signifikante, additive Wirkungen. Additive Effekte fanden sich in der Histologie und auf Proteinebene für die TGF-ß1-, Fibronektin- und PAI-1-Expression.

Im Protokoll 2, wie schon zuvor im Protokoll 1, ging die Abnahme der histologisch meßbaren Matrixmenge immer mit gleichsinnigen Veränderungen der TGF-ß1-Expression einher. Die Veränderungen der TGF-ß1-Expression gingen wiederum mit

relativ gleich starken Veränderungen der Matrixsynthese (als Marker hier Fibronektin) und eines weniger gebremsten Matrixabbaus (als Marker hier PAI-1) einher. Angesichts der zentralen Rolle, die TGF-ß für die Matrixakkumulation spielt, ist daher zu vermuten, daß die antifibrotische Wirkung von L-Arginin primär durch eine Abnahme von TGF-ß1-Expression vermittelt wird.

Die akute Anti-Thy1-Glomerulonephritis ist ein Modell mit normalem systemischen Blutdruck (siehe Abb. 28). Wie unter 3.2.2 gezeigt, verminderte L-Arginin die renale Matrixexpansion ohne meßbaren Einfluß auf den systolischen Blutdruck. Dieses ist ein wichtiger Befund. Er erweitert die Untersuchungen, die bisher einen günstigen Effekt von L-Arginin nur bei hypertensiver Nierenkrankheit nachweisen konnten. Die renoprotektive Wirkung von L-Arginin scheint damit, ähnlich wie die der Angiotensin II-Blockade, auch durch eine unmittelbare Interaktion mit der Gewebsreparatur vermittelt zu sein.

Im Gegensatz zu den Parametern der Matrixexpansion zeigte die L-Argininingabe keinen Einfluß auf die Proteinurie der nephritischen Tiere. Dieses ist im Prinzip ein überraschender Befund, da in der Regel die renale Matrixakkumulation und Proteinausscheidung miteinander assoziiert sind. Die Gründe für diesen Befund sind unklar. Es könnte jedoch von Bedeutung sein, daß die Proteinurie im Anti-Thy1-Modell nicht immer das Ausmaß der Fibroseaktivität reflektiert (Wayne Border, persönliche Mitteilung). Einige Rattenstämme zeigen z. B. sich trotz starker histologischer Veränderungen keine oder nur eine geringe Proteinausscheidung im Urin.

Von besonderer Bedeutung sind auch die Veränderungen der Plasma-L-Argininspiegel nach Induktion der Glomerulonephritis. In Protokoll 1 und 2 wurde jeweils ein deutlicher Abfall der L-Argininkonzentration im Blut von nephritischen Tieren mit normaler L-Argininzufuhr beobachtet. Dieser Abfall zeigt zum einen, daß im Rahmen der renalen Wundheilung L-Arginin verstärkt verbraucht wird. Zum anderen unterstreichen diese Daten die essentielle Bedeutung der L-Argininzufuhr bei aktiver Glomerulonephritis. Dabei ist die Abnahme der L-Argininspiegel lokal in der Niere wahrscheinlich noch deutlicher stärker ausgeprägt als die Blutspiegel dieses vermuten lassen. Dermale Wundheilungsstudien haben gezeigt, daß L-Arginin nur in sehr geringer Konzentration lokal in der Wundflüssigkeit nachweisbar ist[84;85]. Wie bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis ist bei dermaler Wundheilung die anfängliche inflammatorischen Phase durch eine Aktivierung des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges charakterisiert. Mit Beginn der Matrixexpansionsphase kommt es zu einem Überwiegen des L-Arginin-L-Ornithin-Stoffwechselweges. Untersuchungen von Ketteler und Mitarbeitern haben belegt, daß bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis die

L-Argininstoffwechselwege in ähnlicher Weise sequentiell aktiviert sind[81].

Die Ergebnisse von Protokoll 2 lassen die Frage offen, über welchen Metaboliten die günstige Wirkung von L-Arginin vermittelt wird. Der blutdruckunabhängige, mehr parakrine Charakter der L-Argininefekte läßt vermuteten, daß hier die niedrige NO-Produktion der endothelialen NOS III von Bedeutung war. Das von der NOS III gebildete NO ist ein wichtiger parakriner Faktor, der lokal die Proliferation und Matrixproduktion von Nierenzellen unterdrückt[58-60]. Studer und Craven haben zudem gezeigt, daß die endotheliale NO-Synthese direkt und blutdruckunabhängig die TGF-ß-Expression von glomerulären Zellen vermindert[57]. Dieses ist im Einklang mit den Ergebnissen aus Protokoll 2.

In hypertensiven Modellen renaler Erkrankungen konnte darüber hinaus belegt werden, daß die protektive Wirkung der L-Argininingabe über eine gesteigerte endotheliale NO-Synthese vermittelt wird[9;11;71]. Bei Ratten mit salz-sensitivem Hypertonus und obstruktiver Nephropathie ging darüber hinaus die verstärkte NOS III-Aktivität mit einer Abnahme des systemischen Blutdrucks einher[11;71]. Bei Tieren mit 5/6-Nephrektomie führte sie zur Normalisierung des intraglomerulären Drucks[9].

In unserem System hatte die L-Argininingabe keinen meßbaren Effekt auf die NOx-Konzentrationen im Plasma, Urin oder Überstand kultivierter Glomeruli. Als Erklärung hierfür muß angenommen werden, daß wahrscheinlich die eingesetzte Methodik nicht sensitiv genug ist, um unter normotensiven Bedingungen Änderungen der NOS III-Aktivität sicher zu erfassen. Zur Beantwortung der Frage, ob die günstige Wirkung von L-Arginin tatsächlich durch NO vermittelt wird, sind wahrscheinlich empfindlichere Untersuchungsstrategien (begleitende Hemmung der NO-Synthese, alleinige NO-Donation) notwendig.

Wie die L-Argininingabe die Aktivität der endothelialen NOS III stimuliert, ist nach wie vor ein unverstandenes Paradox. Auf der einen Seite senkt L-Arginin den systemischen und renalen Blutdruck bei humaner und experimenteller Hypertonie [22;26]. Dieses geht auch nachweislich mit verstärkter NO- und L-Citrullin-Synthese einher[22]. Auf der anderen Seite sollte die Aktivität der endothelialen NOS III angesichts der relativ niedrigen KM für L-Arginin (ca. 1-10 μM) und deutlich darüber liegenden Plasma- und Gewebsspiegeln nicht von einem verstärkten Substratangebot abhängig sein. Dieses Paradox gilt auch für die antifibrotische Wirkung von L-Arginin bei hypertensiver und, wie hier gezeigt, bei immunologisch-induzierter Nierenfibrose.

Von potentieller Bedeutung für die renale Matrixexpansion könnten auch die L-Argininmetabolite Polyamine, L-Prolin und Agmatin sein. Polyamine und L-Prolin werden über L-Ornithin als Zwischenstufe aus L-Arginin gebildet. Beide werden mit profibrotischen Effekten in Verbindung gebracht. Polyamine sind von essentieller Bedeutung für die Proliferation[62] und L-Prolin ist der wichtigste Kollagenbaustein[53;61]. Im Modell der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis zeigte die isolierte Restriktion der L-Argininzufuhr während der Matrixphase eine vergleichbar antifibrotische Wirkung wie die Fütterung einer Niedrigproteindiät[80]. Auf der anderen Seite konnte der günstige Effekt der Eiweißrestriktion durch alleinige Normalisierung der L-Argininzufuhr aufgehoben werden. Diese Experimente führten zu der Hypothese, daß die renoprotektive Wirkung der L-Argininrestriktion über eine verminderte Bildung von Polyaminen und L-Prolin vermittelt sein könnte. Neuere Daten haben dieses Konzept wieder entkräftet. So war bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis die spezifische Hemmung der Polyaminsynthese mittels Difluoromethylornithin (DFMO) ohne Wirkung auf Proteinurie, Proliferation und Matrixexpansion[86]. Bei der persistierenden Anti-Thy1-Glomerulonephritis der Maastrichter Lewis-Ratte erwiesen sich die Polyamin- und L-Prolin-generierenden Stoffwechselwege als supprimiert (M. Ketteler, persönliche Mitteilung). Wie auch immer, Polyamine und L-Prolin stehen eher mit profibrotischen als mit antifibrotischen Wirkungen in Verbindung und es ist daher nicht wahrscheinlich, daß die Wirkung der L-Argininingabe über diesen Stoffwechselweg vermittelt wird.

Über die Bedeutung von Agmatin für die renale Physiologie und Pathophysiologie ist bislang nur wenig bekannt. In-vitro-Daten belegen, daß Agmatin die NOS II und die Polyaminsynthese hemmt[69;70]. Beides könnte sich potentiell günstig auf die Matrixexpansion auswirken. In einer kürzlich durchgeführten Untersuchung wurde die Wirkung von L-Arginin direkt mit der Wirkung von Agmatin auf die Phase der Matrixexpansion bei Anti-Thy1-Glomerulonephritis verglichen. Hierbei zeigte die Gabe von L-Arginin deutliche antifibrotische Wirkungen, während die Gabe von Agmatin keinen Einfluß auf die Matrixakkumulation hatte[87]. Aus diesem Versuch ergibt sich, daß Agmatin als Mediator für die günstigen Effekte der L-Argininingabe ebenfalls nicht in Frage kommen dürfte.

Während die NOS II mit Gewebsdestruktion und die NOS III mit Gewebsprotektion verbunden ist, gibt es nur wenig Daten zur Rolle der in der Makula Densa lokalisierten neuronalen NOS I. Bei Maastrichter Lewis-Ratten geht der persistierende Verlauf der Anti-Thy1-Glomerulonephritis mit konstitutiv erhöhter NOS I-Expression und Renin-Produktion einher[88]. Dieses könnte mit profibrotischen Wirkungen in Verbindung stehen. Eine Veränderung der NOS I-Aktivität durch vermehrte oder verminderter L-Argininzufuhr ist jedoch nicht belegt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse des 2. Versuchsprotokolls, daß die L-Argininingabe blutdruckunabhängig und wahrscheinlich vermittelt durch Abnahme von TGF-ß-Expression die Matrixexpansion nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis vermindert. Das antifibrotische Potential der L-Argininingabe war im Kern der Proteinrestriktion vergleichbar. L-Argininingabe und Proteinrestriktion zusammen verminderten additiv die TGF-ß-Expression und Matrixakkumulation.

4.2.3 Wirkung der L-Argininingabe auf den Verlauf der Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus (Protokoll 3)

In diesem Versuchsprotokoll wurde gefragt, wie sich die Gabe von L-Arginin bei fortwährender NOS II-Expression auf die renale Matrixexpansion auswirkt. Untersucht wurde diese Frage bei MRL/lpr-Mäusen mit manifester Lupusnephritis. Ähnlich wie bei humaner Glomerulonephritis laufen bei der MRL/lpr-Maus die Sequenzen der renalen Wundheilung kontinuierlich und parallel zu einander ab[26]. In der zeitlich gestaffelten Wundheilungssequenz der Anti-Thy1-Glomerulonephritis konnten wir profibrotische Wirkungen von L-Arginin auf die Phase der Schädigung und antifibrotische Wirkungen von L-Arginin auf die Phase der Matrixexpansion identifizieren. Das Modell der Lupusnephritis erlaubt nun eine Antwort auf die Frage, welcher von beiden Effekten der L-Argininingabe bei fortwährender immun-vermittelter Glomerulonephritis/ Glomerulosklerose überwiegt.

L-Arginin wurde den MRL/lpr-Mäusen ab der 16. Lebenswoche gegeben. Wie im Protokoll 2 wurde der Effekt der L-Argininingabe direkt mit der Wirkung einer Proteinrestriktion als etabliertem Therapiestandard verglichen. Wie im Ergebnisteil unter 3.4.2 gezeigt, hatte die Gabe von L-Arginin deutliche Effekte auf die Albuminurie. In den Mäusen mit Normalproteindiät bewirkte die Gabe von L-Arginin einen deutlichen Anstieg der Albuminausscheidung. Die Proteinrestriktion hingegen verminderte erwartungsgemäß die Albuminurie. Wurde 1% L-Arginin im Trinkwasser zur Niedrigproteindiät gegeben, kam es wieder zu einer deutlichen Zunahme der Eiweißausscheidung. Anders als im Anti-Thy1-Modell ist die Proteinausscheidung bei der Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus ein valider Indikator für den Grad der glomerulären Schädigung. Diese Daten zeigen somit, daß die L-Argininingabe den glomerulären Schaden verstärkt, während die Proteinrestriktion protektiv ist.

Gleichsinnige Daten wurden für das Überleben der Lupusmäuse beobachtet. MRL/lpr-Mäuse entwickeln eine fortschreitende Niereninsuffizienz und versterben schließlich an den Folgen des terminalen Nierenversagens[37]. In der Regel sind bei MRL/lpr-Mäusen mit normaler Proteinzufuhr in der 23./24. Lebenswoche 50% der Tiere verstorben[37]. In unserem Versuch führte die L-Argininingabe bei normaler Proteinzufuhr dazu, daß bereits in der 21. Lebenswoche 50% der Tiere (9 von 18) verstorben waren, in der Gruppe ohne L-Arginin im Trinkwasser waren es bis dahin nur 5 von 18 Tieren. Die Proteinrestriktion wirkte sich wieder erwartungsgemäß protektiv aus. In der 21. Lebenswoche waren noch alle Tiere am Leben. Wurde jedoch 1% L-Arginin im Trinkwasser hinzugegeben, nahm die renal bedingte Sterblichkeit wieder zu (6 von 18 Tieren).

Die negative Wirkung von L-Arginin auf das Überleben der MRL/lpr-Mäuse ging mit verstärkter renaler Matrixexpansion in der Histologie und höherer Expression von TGF-ß1-, Fibronektin- und PAI-1-Protein einher. Die Proteinrestriktion hingegen wirkte sich günstig auf diese Fibrosezeichen aus. Wurde 1% L-Arginin im Trinkwasser zur Niedrigproteindiät zugegeben, fand sich wieder eine Zunahme der Matrixvermehrung in der Histologie und der Proteinexpression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1. Die Übereinstimmung zwischen den Daten zur renalen Matrixakkumulation und zum Überleben der Mäuse ist von großer Bedeutung. Sie bestätigt das in dieser Arbeit vertretene Konzept, daß dem renalen Funktionsverlust eine fortschreitende Matrixexpansion zugrunde liegt.

Die Daten des 3. Versuchsprotokolls zeigen somit übereinstimmend eine ungünstige Wirkung der L-Argininingabe bei fortwährender NOS II-Expression. Zur Beantwortung der Frage nach dem Mediator bzw. dem Mechanismus dieser Wirkung wurde im Blut die NOx-Konzentration bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die L-Argininingabe mit einer signifikant höheren endogenen NO-Produktion einher ging. Diese Daten lassen vermuten, daß die negative Wirkung von L-Arginin bei Lupusnephritis über eine stärkere destruktive NO-Synthese vermittelt wird.

Im 1. und 3. Versuchsprotokoll wurden somit einheitlich proinflammatorische und profibrotische Wirkungen der L-Argininingabe bei Glomerulonephritis nachgewiesen. Vergleichbare Ergebnisse wurden in den letzten Jahren auch in verschiedenen anderen inflammatorischen Krankheitsmodellen aufgezeigt. Hierzu gehören u. a. Modelle der immun-vermittelten Hautvaskulitis, des hypoxischen Lungenschadens, der toxischen Kolitis sowie der zerebralen Ischämie-Reperfusion[33;89-91]. Wie bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis und der Lupusnephritis zeigen alle diese Modelle eine starke Expression der NOS II. Es ist daher zu vermuten, daß die L-Argininingabe in

diesem Modellen auch über ein höheres Substratangebot den Gewebsschaden verstärkt hat. Eine Ausnahme von der Regel, daß die NOS II destruktive Wirkungen vermittelt, scheinen Ratten mit in-situ-Immunkomplexnephritis zu sein. Obgleich auch hier die NOS II exprimiert und NO verstärkt gebildet wird, konnte in diesem Modell bisher keine schädigende Wirkung von NO belegt werden[26;92-94].

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse des 3. Versuchsprotokolls, daß die L-Argininingabe den ungünstigen Verlauf der Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus beschleunigt, zu mehr Nierenfibrose führt und schließlich die Lebensspanne der Tiere verkürzt. Die negative Wirkung von L-Arginin scheint durch eine verstärkte destruktive NO-Synthese vermittelt zu sein.

4.3 Bedeutung der experimentellen Ergebnisse für humane Nierenerkrankungen

Die Bedeutung der induzierbaren NOS II für die Immunabwehr, Tumorelimination und Autoimmunität des Menschen ist nicht unumstritten. Während bei Nagetieren die Expression der NOS II und eine hohe NO-Synthese vielfach belegt werden konnte, gestaltete sich der Nachweis beim Menschen schwieriger[33;95]. Unterhalten wurde diese Diskussion insbesondere durch in-vitro-Beobachtungen. Bei Nagetiergeweben ist die NOS II relativ leicht und stark durch LPS oder γ-Interferon zu induzieren, während z. B. menschliche Makrophagen in Kultur keine oder nur eine minimale NO-Produktion auf diese Stimulation hin zeigen[96]. Diese Ergebnisse führten zu dem verfrühten Schluß, daß die NOS II beim Menschen nicht aktiv ist. Diese Auffassung ist in den letzten Jahren jedoch durch eine Reihe von Untersuchungen widerlegt worden. Es konnte gezeigt werden, daß bei einer Reihe von humanen Erkrankungen die NOS II sehr wohl in-vivo exprimiert und funktionell aktiv ist[33;96]. Dabei ist klar geworden, daß die humane NOS II sehr spezifische Stimuli benötigt, die in-vitro nicht hinreichend simuliert werden können.

Die Expression und Aktivität der NOS II konnte bei renalen und nicht-renalen humanen Erkrankungen dokumentiert werden. Kashem und Mitarbeiter haben gezeigt, daß NOS II-mRNA und Protein bei einem Großteil von Patienten mit mesangioproliferativer Glomerulonephritis, in der Regel IgA-Nephropathie, exprimiert wird[97]. Dabei war die NOS II-Expression nicht nur mit Makrophagen co-lokalisiert, sondern auch in ortsständigen Nierenzellen nachweisbar. Interessanterweise korrelierte die Expression der NOS II eng mit dem Grad der renalen

Nierenschädigung und der Verschlechterung der Nierenfunktion. In weiteren histologischen Studien wurde die Expression der NOS II auch bei Patienten mit Lupusnephritis, Wegenerscher Granulomatose und Transplantatrejektion belegt[98-100]. Auch hier korrelierte der Grad der NOS II-Expression positiv mit dem Ausmaß der renalen Schädigung und negativ mit Markern der renalen Funktion.

Bei den nicht-renalen humanen Erkrankungen wurde aktives NOS II-Enzym u. a. in Makrophagen von Patienten mit Tuberkulose, in neutrophilen Granulozyten im Urin von Patienten mit Harnwegsinfekt und im Gelenksmaterial von Patienten mit Arthritis dokumentiert[101-103]. Bei der HIV-1 Enzephalitis wurde die Induktion der NOS II in Astrozyten belegt[104]. Dabei scheint die NOS II unmittelbar durch das HIV-Protein gP41 induziert werden zu können[105]. Die Zytotoxizität von sogenannten natürlichen Killerzellen scheint zum Teil durch zytotoxische NO-Produktion vermittelt zu sein[106]. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß die Abtötung von Leishmanie major beim Menschen über NO vermittelt wird[96].

Weitere Hinweise für die Aktivität der NOS II bei humanen Erkrankungen ergeben sich aus dem histologischen Nachweis von Nitrotyrosinen. Nitrotyrosine entstehen durch die Reaktion von dem Radikal Peroxynitrit mit der proteingebundenen Aminosäure Tyrosin[47]. Wie unter 1.2.1.1 dargelegt, ist Peroxynitrit ein wichtiger Mediator der zytotoxischen NO-Wirkung. Nitrotyrosine als Zeichen der in-vivo-NOS II-Aktivität wurden bei Patienten mit Nierentransplantatversagen, Herzmuskelischämie, aktiver Artherosklerose, Colitis ulcerosa und septischem Lungenversagen nachgewiesen[47;100].

Aus diesen Daten ergibt sich, daß die hier vorgelegten Ergebnisse zur Wirkung der L-Argininingabe bei experimenteller Glomerulonephritis/Glomerulosklerose wahrscheinlich von großer Relevanz für die Behandlung von Patienten mit aktiver Glomerulonephritis und möglicherweise auch des Nierentransplantatversagens sind. Diese Sichtweise wird durch die Ergebnisse von zwei jüngst veröffentlichten klinischen Studien unterstrichen. De Nicola und Mitarbeiter untersuchten in einer Studie die Wirkung der L-Argininingabe bei Patienten mit chronischer Glomerulonephritis[107]. Eisenberger und Mitarbeiter prüften die L-Argininingabe bei Patienten mit Transplantatnephropathie[108]. In beiden Studien hatte ein Großteil der Patienten auch einen arteriellen Hypertonus, so das sich L-Arginin über eine Verminderung des hypertensiven Nierenschadens potentiell hätte positiv auswirken müssen. De Nicola und Eisenberger konnten jedoch keinen günstigen Effekt der L-Argininingabe nachweisen. Diese Ergebnisse sind in Anbetracht der Daten dieser Arbeit nicht unerwartet. So besteht bei Patienten mit chronischer Glomerulonephritis und transplantierter Niere ein nicht unerhebliches Risiko, daß im Rahmen von Inflammationsvorgängen die NOS II exprimiert ist. Es ist

daher zu erwarten, daß sich die Gabe von L-Arginin bei diesen Patientengruppen negativ auswirken wird bzw. potentiell günstige Effekte neutralisiert werden. Letzteres könnte bei den Studien von De Nicola und Eisenberger der Fall gewesen sein. Es ist gut vorstellbar, daß der zu erwartende günstige Einfluß von L-Arginin bei hypertensiver Nierenschädigung durch proinflammatorische Wirkungen von L-Arginin wieder aufgehoben wurde.

5. Zusammenfassung

5.1 Hintergrund und Fragestellung

Die Glomerulonephritis gehört zu den häufigsten Ursachen des terminalen Nierenversagens. Wie andere chronische Nierenleiden ist die Erkrankung durch einen progressiven Funktionsverlust bis zum vollständigen Organversagen charakterisiert. Morphologisch findet sich eine fortschreitende Nierenfibrose, bzw. Expansion extrazellulärer Matrixproteine. Mit der heute klinisch etablierten Angiotensin II-Blockade und/oder Restriktion der Proteinzufuhr kann die Progression chronischer Nierenerkrankungen nur verlangsamt, nicht jedoch aufgehalten werden.

Die Gabe der NO-Vorstufe L-Arginin hat kürzlich in einer Reihe von hypertensiven Modellen renaler Erkrankungen günstige Wirkungen auf die gestörte Hämodynamik und die pathologische Matrixexpansion gezeigt. L-Arginin ist eine semi-essentielle Aminosäure, deren endogen gebildete Metabolite (NO, Polyamine, L-Prolin, Agmatin) eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulation, Autoimmunität, Proliferation und Matrixexpansion spielen. Ziel dieser Habilitationsarbeit war es, den potentiellen Nutzen der L-Argininingabe in Modellen der immun-vermittelten akuten und chronischen Glomerulonephritis/Glomerulosklerose zu prüfen.

5.2 Methoden und Ergebnisse

Als Modelle wurden die akute Anti-Thy1-Glomerulonephritis der Ratte und die chronisch-fortschreitende Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus eingesetzt. In beiden Modellen spielt die destruktive NO-Produktion der NOS II eine wichtige Rolle bei der renalen Gewebsschädigung. Die akute Anti-Thy1-Glomerulonephritis ist durch eine zeitlich relativ klar abgegrenzte Sequenz aus anfänglicher Mesangialzellschädigung und nachfolgender Matrixexpansion charakterisiert. In diesem Modell wurde die Wirkung von L-Arginin getrennt auf die Phase der Schädigung (Protokoll 1, Vorbehandlung) und auf die Phase der Matrixvermehrung (Protokoll 2, Nachbehandlung) untersucht. Bei der chronischen Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus wurde geprüft, wie sich die Gabe von L-Arginin bei chronischer NOS II-Expression auf die fortschreitende Nierenfibrose auswirkt (Protokoll 3). In diesem Modell laufen die Schädigungs- und Matrixexpansionsphase, wie bei humaner Glomerulonephritis, kontinuierlich und parallel zu einander ab.

In allen drei Versuchsprotokollen wurde die Wirkung von L-Arginin in Beziehung zur histologisch meßbaren Matrixakkumulation und zur Expression des zentralen profibrotischen Zytokins TGF-ß1, dem Matrixprotein Fibronektin und dem Protease-Inhibitor PAI-1 gesetzt. Zusätzlich wurde die Wirkung von L-Arginin auf die Aktivität des endogenen NO-Stoffwechsels bestimmt.

In Protokoll 1 wurde die Wirkung der L-Argininingabe (1 % L-Arginin im Trinkwasser) auf die kurzzeitige, NO-vermittelte Mesangialzellyse der Anti-Thy1-Glomerulonephritis sowie der nachfolgenden Fibrosereaktion untersucht. Sechs Stunden nach Antikörperinjektion waren bei den Tieren mit L-Argininingabe signifikant mehr Mesangialzellen untergegangen als bei den Tieren mit normaler L-Argininzufuhr. Bei nephritischen Tieren, in denen die L-Argininingabe 16 Stunden nach Antikörperinjektion beendet wurde, fand sich am Tag 2 eine signifikant höhere Proteinurie und am Tag 6 eine signifikant höhere glomeruläre Matrixexpansion sowie Expression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 im Vergleich zu Tieren mit normaler L-Argininzufuhr. Die L-Argininingabe hatte keinen Einfluß auf die Infiltration mit Makrophagen und der Expression von NOS II-mRNA und Protein (6 Stunden nach Induktion der Glomerulonephritis). Statt dessen fanden sich bei Tieren mit L-Argininingabe signifikant höhere L-Arginin- und Nitrit/Nitrat-Konzentrationen im Plasma als bei den Tieren ohne L-Argininvorbehandlung. Zusammen mit dem Nachweis, daß die NO-Produktion nephritischer Glomeruli stark von dem extrazellulären L-Argininangebot abhängt, zeigen diese Daten, daß die negative Wirkung der L-Argininingabe auf die Mesangialzellyse durch ein verstärktes Substratangebot für die destruktive NOS II vermittelt wird.

In Protokoll 2 wurde die Wirkung der L-Argininingabe auf die Phase der Matrixexpansion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis untersucht. L-Arginin (1% im Trinkwasser) wurde 24 Stunden nach Induktion der Glomerulonephritis und damit nach Ablauf der Mesangialzellyse gegeben. Die Tiere erhielten entweder eine Diät mit normalem Proteinanteil (22 % Kasein) oder eine Diät mit vermindertem Proteinanteil (6 % Kasein, antifibrotischer Therapiestandard).

Die Gabe von L-Arginin nach Induktion der Glomerulonephritis führte zu einer signifikanten Abnahme der glomerulären Matrixakkumulation sowie der mRNA- und Proteinexpression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 am Tag 6. Der Grad der antifibrotischen Wirkung von L-Arginin war im Kern bei allen oben genannten Parametern der Wirksamkeit einer diätetischen Proteinrestriktion vergleichbar. Die kombinierte Behandlung mit L-Argininingabe und Proteinrestriktion zeigte signifikante, additiv-günstige Wirkungen auf die glomeruläre Matrixexpansion in der Histologie sowie der Proteinexpression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1. Auf mRNA-Ebene war der Effekt für TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1 von der Tendenz her auch nachweisbar, erreichte hier jedoch keine statistische Signifikanz.

Die Gabe von L-Arginin hatte keinen Einfluß auf die Proteinurie. Der systemische Blutdruck bei Tieren mit Anti-Thy1-Glomerulonephritis war normal. L-Arginin hatte keinen Effekt auf den Blutdruck. Die L-Argininingabe führte zur signifikanten Zunahme der Plasma-L-Argininspiegel, hatte aber keine meßbare Wirkung auf die Nitrit/Nitrat-Konzentration im Plasma und Urin. Diese Parameter sind aber wahrscheinlich nicht sensitiv genug, um unter normotensiven Bedingungen Aktivitätsänderungen der endothelialen NOS III zu erfassen.

In Protokoll 3 wurde die Wirkung von L-Arginin auf die Matrixexpansion bei der chronischen NOS II-vermittelten Nierenschädigung der MRL/lpr-Lupusmaus untersucht. Ab der 16. Lebenswoche wurde 1% L-Arginin im Trinkwasser gegeben. Wie in Protokoll 2 erhielten die Tiere eine Diät mit normalem Proteinanteil (22 % Kasein) oder eine Diät mit vermindertem Proteinanteil (6 % Kasein).

Bei den Mäusen mit manifester Lupusnephritis führte die L-Argininingabe zu einer deutlichen Zunahme der Proteinurie, der renalen Matrixvermehrung sowie der Proteinexpression von TGF-ß1, Fibronektin und PAI-1. Als Folge des stärkeren Nierenschadens verkürzte L-Arginin signifikant die Lebensspanne der Mäuse. Im Gegensatz dazu führte die Niedrigproteindiät zu einer Verbesserung der Fibrosezeichen und der Überlebenszeit der Mäuse. Die Ergänzung der

Niedrigproteindiät mit der Gabe von L-Arginin hob die günstige Wirkung der Proteinrestriktion im Kern wieder auf. Die negative Wirkung der L-Argininingabe bei der Lupusnephritis ging mit den Zeichen einer verstärkten endogenen NO-Synthese im Blut einher, so daß sie wahrscheinlich über eine gesteigerte Aktivität der destruktiven NOS II vermittelt wird.

5.3 Schlußfolgerungen

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß der L-Argininstoffwechsel in dualer Weise mit der renalen Matrixexpansion verbunden ist. Im Modell der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis beobachteten wir sowohl günstige als auch ungünstige Wirkungen der erhöhten L-Argininzufuhr auf die renale Matrixvermehrung. Die L-Argininingabe vor Induktion der Glomerulonephritis bewirkte eine signifikante Verstärkung der NOS II-vermittelten Mesangialzellschädigung und der nachfolgenden Matrixvermehrung. Die L-Argininingabe nach Induktion der Anti-Thy1-Glomerulonephritis verminderte hingegen signifikant, wahrscheinlich NOS III-vermittelt, die TGF-ß-Überexpression und Matrixakkumulation. Diese Wirkung war unabhängig vom Blutdruck und ist möglicherweise über eine Aktivitätszunahme der endothelialen NOS III vermittelt. Im Modell der chronisch-fortschreitenden, NOS II-vermittelten Lupusnephritis der MRL/lpr-Maus zeigte sich ein Überwiegen der negativen Wirkungen von L-Arginin auf die renale Matrixexpansion. Die L-Argininingabe verstärkte signifikant die renale TGF-ß1-Überexpression und Matrixexpansion und verkürzte als Zeichen der Progressionsbeschleunigung die Lebensspanne der Tiere.

Die duale Wirkung der L-Argininingabe auf die renale Matrixexpansion ist im wesentlichen als Ausdruck der „ambivalenten" Wirkung von NO zu deuten. Antifibrotische L-Argininwirkungen sind wahrscheinlich Folge einer gesteigerten endothelialen NO-Synthese. Neben renaler Drucksenkung vermittelt diese vermutlich auch wichtige parakrine antifibrotische Wirkungen. Profibrotische L-Argininwirkungen stehen in engem Zusammenhang mit einer gesteigerten induzierbaren NO-Synthese und sind Ausdruck einer verstärkten renalen Schädigung.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, daß die Gabe von L-Arginin, obgleich partiell günstig, keine sinnvolle Behandlungsalternative für Patienten mit chronisch-fortschreitender Glomerulonephritis zu sein scheint. Die Daten lassen vielmehr den Schluß zu, daß bei NOS II-vermittelten Nierenkrankheiten eine Beschränkung der L-Argininzufuhr angestrebt werden sollte.

6. Referenzen

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 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 Group, N Engl J Med, 1994, *330*, S.877-884,

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

5 The gisen Group (Gruppo Ittaliano di Studi Epidemiologici in Nefrologia), Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy, Lancet, 1997, *349*, S.1857-1863,

6 Ihle BU, Becker GJ, Whitworth JA, Charlwood RA, Kinaid Smith PS, The effect of protein restriction on the progression of renal insufficiency, N Engl J Med, 1989, *321*, S.1773-1777,

7 Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, Ponticelli C,Ritz E, Zucchelli P, Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group, N Engl J Med, 1996, *334*, S.939-945,

8 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 Kidney Dis, 1992, *20*, S.168-176,

9 Katoh T, Takahashi K, Klahr S, Reyes AA, Badr KF, Dietary supplementation with L-arginine ameliorates glomerular hypertension in rats with subtotal nephrectomy, J Am Soc Nephrol, 1994, *4*, S.1690-1694,

10 Reyess 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.1346-1354,

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

12 Morrissey JJ, Ishidoya S, McCracken R, Klahr S, Nitric oxide generation ameliorates the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy, J Am Soc Nephrol, 1996, *7*, S.2202-2212,

13 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,

14 Chen PY, St.John PL, Kirk KA, Abrahamson DR, Sanders PW, Hypertensive nephrosclerosis in the Dahl/Rapp rat. Initial sites of injury and effect of dietary L-arginine supplementation, Lab Invest, 1993, *68*, S.174-184,

15 DE Nicola L, Thomson SC, Wead LM, Brown MR, Gabbai FB, Arginine feeding modifies cyclosporine nephrotoxicity in rats, j Clin Invest, 1993, *92*, S.1859-1865,

16 Ashab I, Peer G, Blum M, Wollman Y, Chernihovsky T, Hassner A, Schwartz D, Cabili S, Silverberg D, Iaina A, Oral administration of L-arginine and captopril in rats prevents chronic renal failure by nitric oxide production, Kidney Int, 1995, *47*, S.1515-1521,

17 Amore A, Gianoglio B, Ghigo D, Peruzzi L, Porcellini MG, Bussolino F, Costamagna C, Cacace G, Picciotto G, Mazzucco G, A possible role for nitric oxide in modulating the functional cyclosporine toxicity by arginine, Kidney Int, 1995, *47*, S.1507-1514,

18 Yang CW, Kim YS, Kim J, Kim YO, Min SY, Choi EJ, Bang BK, : Oral supplementaion of L-arginine prevents chronic cyclosporine nephrotoxicity in rats, J Am Soc Nephrol, 1997, *8*, S.A2842,

19 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.R1768-74,

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

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

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

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

24 Grossie VB, Jr., Nishioka K, Ajani JA, Ota DM, : Substituting ornithine for arginine in total parenteral nutrition eliminates enhanced tumor growth, J Surg Oncol, 1992, *50*, S.161-167,

25 Kone BC, Nitric oxide in renal health and disease, Am J Kidney , 1997, *30*, S.311-333,

26 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.1640-1650,

27 Bohle A, [Importance of the renal interstitium for kidney function]Die Bedeutung des Niereninterstitiums fur die Nierenfunkti, Klin Wochenschr, 1982, *60*, S.1186-1190,

28 Peters H, Border WA, Noble NA, : Angiotensin II and L-arginine in tissue fibrosis: more than blood pressure, Kidney Int, 1997, *51*, S.1481-1486,

29 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,

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

31 Ziyadeh FN, Hoffman BB, Guo J, Eltayeb BO , Han DC, Sharma K, : Amiloration of renal insufficiency and excess matrix gene expression by chronic treatment with anti-TGF-ß antibody in db/db diabetic mice (abstract), J Am Soc Nephrol, 1998, *9*, S.p646,

32 Floege J, Grone HJ, : Progression of renal failure: what is the role of cytokines?, Nephrol Dial Transplant, 1995, *10*, S.1575-1586,

33 Peters H, Border WA, Noble NA, : L-arginine supplementaion increases mesangial cell injury and subsequent tissue fibrosis in experimental glomerulonephritis, Kidney Int, 1999, *55*, S.2264-2273,

34 Bagchus WM, Hoedemaeker PJ, Rozing J, Bakker WW, Glomerulonephritis induced by monoclonal anti-thy 1.1 antibodies. , Lab Invest, 1986, *55*, S.680-687,

35 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,

36 Theofilopoulos AN, Dixon FJ, : Etiopathogenesis of murine SLE, Immunol Rev, 1981, *55*, S.179-216,

37 Weinberg JB, Granger DL, Pisetsky DS, Seldin MF, Misukonis MA, Mason SN, Pippen AM, Ruiz P, Wood ER, Gilkeson GS, The role of nitric oxide in the pathogenesis of spontaneous 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 Exp Med , 1994, *179*, S.651-660,

38 Kreft B, Yokoyama H, Naito T, Kelley VR, : Dysregulated transforming growth factor-beta in neonatal and adult autoimmune MRL-lpr mice, J Autoimmun, 1996, *9*, S.463-472,

39 Rosman JB, ter Wee PM, Meijer S, Piers Becht TP, Sluiter WJ, Donker AJ, : Prospective randomised trial of early dietary protein restriction in chronic renal failure, Lancet , 1984, *2*, S.1291-1296,

40 Okuda S, Nakamura T, Yamamoto T, Ruoslahti E, Border WA, Dietary protein restriction rapidly reduces transforming growth factor beta 1 expression in experimental glomerulonephritis, Proc Natl Acad Sci U S A , 1991, *88*, S.9765-9769,

41 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,

42 Nishimura M, Okamura M, Konishi Y, et al, Effect of treatment with ACE inhibitor (ACEI) on TGF-beta gene expression in renal biopsy from patients with IgA nephropathy. (abstract). , J Am Soc Nephrol, 1996, *6*, S.397-390,

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

44 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 observations on nitric oxide synthesis, Am J Physiol , 1995, *268*, S.E360-367,

45 Kone BC, Baylis C, Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney, Am J Physiol, 1997, *272*, S.F561-78,

46 Muhl H, Pfeilschifter J, Tetrahydrobiopterin is a limiting factor of nitric oxide generation in interleukin 1 beta-stimulated rat glomerular mesangial cells, Kidney Int, 1994, *46*, S.1302-1306,

47 Beckman JS, Koppenol WH, Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly, Am J Physiol, 1996, *271*, S.C1424-1437,

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

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

50 Yao J, Schoecklmann HO, Prols F, Gauer S, Sterzel RB, : Exogenous nitric oxide inhibits mesangial cell adhesion to extracellular matrix components, Kidney Int, 1998, *53*, S.598-608,

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

52 Huang PL, Fishman MC, Genetic analysis of nitric oxide synthase isoforms: targeted mutation in mice, J Mol Med, 1996, *74*, S.415-421,

53 Peters H, Noble NA, Dietary L-arginine in renal disease, Sem Nephrol, 1996, *16-6*, S.567-575,

54 Noiri E, Peresleni T, Miller F, Goligorsky MS, In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia, J Clin Invest, 1996, *97*, S.2377-2383,

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

56 Trachtman H, Futterweit S, Garg P, Reddy K, Singhal PC, : 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,

57 Craven PA, Studer RK, Felder J, Phillips S, DeRubertis FR, : Nitric oxide inhibition of transforming growth factor-beta and collagen synthesis in mesangial cells, Diabetes, 1997, *46*, S.671-681,

58 Satriano J, Kelly CJ, Blantz RC, Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase activity(abstract), J Am Soc Nephrol, 1997, *7*, S.p337,

59 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.F162-167,

60 Hogan M, Cerami A, Bucala R, : Advanced glycosylation 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,

61 Shih VE, Regulation of ornithine metabolism, Enzyme, 1981, *26*, S.254-258,

62 Schulze LE, Brand K, Fees H, Netzker R, Sterzel RB, : Role of ornithine decarboxylase for proliferation of mesangial cells in culture, Kidney Int, 1991, *40*, S.684-690,

63 Yeatman TJ, Risley GL, Brunson ME, Depletion of dietary arginine inhibits growth of metastatic tumor, Arch Surg, 1991, *126*, S.1376-1381,

64 Smith RJ, Phang M, : Proline metabolism in cartilage: the importance of proline biosynthesis, Metabolism, 1978, *27*, S.685-694,

65 Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshraghi J , Copper R, Reis DJ, Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain, Science, 1994, *263*, S.966-969,

66 Morrissey J, McCracken R, Ishidoya S, Klahr S, Partial cloning and characterization of an arginine decarboxylase in the kidney, Kidney Int , 1995, *47*, S.1458-1461,

67 Lortie MJ, Novotny WF, Peterson OW, Vallon V, Malvey K, Mendonca M, Satriano J, Insel P, Thomson SC, Blantz RC, : Agmatine, a bioactive metabolite of arginine. Production, degradation, and functional effects in the kidney of the rat, J Clin Invest, 1996, *97*, S.413-420,

68 Schwartz D, Peterson OW, Mendonca M, Satriano J, Lortie M, Blantz RC, Agmatine affects glomerular filtration via a nitric oxide synthase-dependent mechanism, Am J Physiol, 1997, *272*, S.F597-601,

69 Satriano J, Matsufuji S, Murakami Y, Lortie MJ, Schwartz D, Kelly CJ, Hayashi S, Blantz RC, Agmatine suppresses proliferation by frameshift induction of antizyme and attenuation of cellular polyamine levels, J Biol Chem, 1998, *273*, S.15313-1516,

70 Auguet M, Viossat I, Marin JG, Chabrier PE, Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by agmatine, Jpn J Pharmacol, 1995, *69*, S.285-287,

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

72 Haberstroh U, Stilo K, Pocock J, Wolf G, Helmchen U, Wenzel U, Zahner G, Stahl RA,

Thaiss F, L-arginine suppresses lipopolysaccharide-induced expression of RANTES in glomeruli, J Am Soc Nephrol, 1998, *9*, S.203-210,

73 Peters H, Border WA, Noble NA, Low protein diet and L-arginine supplementation produce additive therapeutic effects on mesangiproliferative glomerunephrtitis in the rat (abstract), J Invest Med, 1997, *45*, S.277A,

74 Peters H, Border WA, Noble NA, Tandem effects of L-arginine supplementation and low protein on TGF-ß overexpression and matrix accumulation in experimental glomerulonephritis, Kidney Int, 1999, *in press*,

75 Schlondorff D, The role of chemokines in the initiation and progression of renal disease, Kidney Int, Suppl 49, *1995*, S.S44-S47,

76 Wu J, Zhou T, Zhang J, He J, Gause WC, Mountz JD, Correction of accelerated autoimmune disease by early replacement of the mutated lpr gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MRL-lpr/lpr mice, Proc Natl Acad Sci U S A , 1994, *91*, S.2344-2348,

77 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,

78 Berden JH, Faaber P, Assmann KJ, Rijke TP, : Effects of cyclosporin A on autoimmune disease in MRL/1 and BXSB mice, Scand J Immunol, 1986, *24*, S.405-411,

79 Schuster R, Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromotography, J Chromo, 1988, *431*, S.271-284,

80 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 U S A, 1995, *92*, S.4552-4556,

81 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,

82 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,

83 Peters H, Border WA, Noble NA, Therapeutic reduction in TGF-beta and matrix proteins in Thy 1- induced glomerulonephritis is enhanced by angiotensin II blockade at higher doses and further enhanced by addition of low protein diet (abstract), J Am Soc Nephrol, 1997, *8*, S.524-520,

84 Albina JE, Mills CD, Barbul A, Thirkill CE, Henry WL, Jr., Mastrofrancesco B, Caldwell MD, Arginine metabolism in wounds, Am J Physiol, 1988, *254*, S.E459-E467,

85 Albina JE, Mills CD, Henry WL, Jr., Caldwell MD, Temporal expression of different pathways of 1-arginine metabolism in healing wounds, J Immunol, 1990, *144*, S.3877-3880,

86 Ketteler M, Westenfeld R, Gawlik A, Distler A, Die Rolle der Polyaminsynthese bei experimenteller Glomerulonephritis: in-vivo-Blockade mit DFMO(abstract), Med Klinik, Abstractband 1, *1998*, S.p133,

87 Peters H, Border WA, Noble NA, Neumayer HH, L-Arginine but not agmatine limits TGF-ß overexpression and matrix expansion in experimental glomerulonephritis(abstract), Kidney Blood Press Res, 1999, *eingereicht zur Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie*,

88 Ketteler M, Bachmann S, de Heer E, Frey A , Petermann A, Gawlik A, Westenfeld R, Wagner S, Sharma AM, Distler A, Expression and localization of neuronal nitric oxide synthase in chronic anti-Thy-1 glomerulonephritis in Lewis rats (abstract), J Am Soc Nephrol, 1997, *8*, S.p500,

89 Mulligan MS, Moncada S, Ward PA, Protective effects of inhibitors of nitric oxide synthase in immune complex-induced vasculitis, Br J Pharmacol, 1992, *107*, S.1159-1162,

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

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

92 Cattell V, Cook HT, Ebrahim H, Waddington SN, Wei XQ, Assmann KJ, Liew FY, Anti-GBM glomerulonephritis in mice lacking nitric oxide synthase type 2, Kidney Int, 1998, *53*, S.932-936,

93 Waddington S, Cook TH, Reaveley D, Jansen A, Cattell V, L-arginine depletion inhibits glomerular nitric oxide synthesis and exacerbates rat nephrotoxic nephritis, Kidney Int, 1996, *49*, S.1090-1096,

94 Cattell V, Nitric oxide-potential mediator in glomerulonephritis?, Nephrol Dial Transplant, 1995, *10*, S.759-774,

95 Moncada S, Higgs A, The L-arginine-nitric oxide pathway, N Engl J Med , 1993, *329*, S.2002-2012,

96 Vouldoukis I, Riveros Moreno V, Dugas B, Ouaaz F, Becherel P, Debre P, Moncada S, Mossalayi MD, The killing of Leishmania major by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen, Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, *92*, S.7804-7808,

97 Kashem A, Endoh M, Yano N, Yamauchi F, Nomoto Y, Sakai H, Expression of inducible-NOS in human glomerulonephritis: the possible source is infiltrating monocytes/macrophages, Kidney Int, 1996, *50*, S.392-399,

98 Furusu A, Miyazaki M, Abe K, Tsukasaki S, Shioshita K, Sasaki O, Miyazaki K, Ozono Y, Koji T, Harada T, Sakai H, Kohno S, Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in human glomerulonephritis, Kidney Int, 1998, *53*, S.1760-1768,

99 Ikegaya N, Yamamoto T, Peters H, Pollock J, Border WA, Noble NA, Increased expression of endothelial nitric oxide synthase, TGF- beta1 and matrix proteins in human kidney

diseases (abstract). , J Am Soc Nephrol, 1996, *7*, S.1563-1560,

100 MacMillan Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA, Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts, Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, *93*, S.11853-11858,

101 Nicholson S, Bonecini Almeida M, Lapa S, Nathan C, Xie QW, Mumford R, Weidner JR, Calaycay J, Geng J, Boechat N, et al, Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis, J Exp Med, 1996, *183*, S.2293-2302,

102 Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K, Saito I, Miyasaka N, Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides, J Clin Invest, 1995, *96*, S.2357-2363,

103 Wheeler MA, Smith SD, Garcia Cardena G, Nathan CF, Weiss RM, Sessa WC, Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils, J Clin Invest, 1997, *99*, S.110-116,

104 Bukrinsky MI, Nottet HS, Schmidtmayerova H, Dubrovsky L, Flanagan CR, Mullins ME, Lipton SA, Gendelman HE, Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected monocytes: implications for HIV-associated neurological disease, J Exp Med, 1995, *181*, S.735-745,

105 Adamson DC, Wildemann B, Sasaki M, Glass JD, McArthur JC, Christov VI, Dawson TM, Dawson VL, Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41, Science, 1996, *274*, S.1917-1921,

106 Xiao L, Eneroth PH, Qureshi GA, Nitric oxide synthase pathway may mediate human natural killer cell cytotoxicity, Scand J Immunol, 1995, *42*, S.505-511,

107 De Nicola, L., Bellizzi, V., Minutolo, R., Andreucci, M., Capuano, A., Garibotti, G., Corso, G, Andreucci, V. E., and Cianciaruso, B, Randomized, double-blind, placebo-controlled study of arginine supplementation in chronic renal failure, Kidney Int., 1999, *56*, S.674-684,

108 Eisenberger, U., Damann, M., Bode-Böger, S. M., Böger, R. H., Schäffer, J., Rademacher, J., and Brunkhorst, R., Placebo-controlled cross-over study of oral arginine in patients with chronic renal allograft dysfunction(abstract), Kidney Blood Press Res, 1999, *22*, S.p396,