

Einfluss der Glitazone auf die Phase der akuten Entzündung sowie der Fibrogenese bei  
der Herausbildung einer interstitiellen Nierenfibrose im Modell der unilateralen  
Ureterligatur der Ratte

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Regina Rusch  
geboren am 23. Juli 1976  
in Hennigsdorf

Jena, im März 2006

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. med. G. Stein
2. Prof. Dr. med. G. Raabe
3. Prof. Dr. med. habil. R. Fünfstück

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06. Februar 2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Chronische Niereninsuffizienz .....	1
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Pathophysiologie .....	2
1.2	Unilaterale Ureterobstruktion als Modell der interstitiellen Fibrose.....	3
1.3	Der Zellzyklus.....	4
1.3.1	Typ D-Cyclin .....	6
1.3.2	Typ E-Cyclin.....	7
1.3.3	Typ A-Cyclin .....	7
1.3.4	Typ B-Cyclin.....	8
1.4	Das 27-kilo Dalton Protein p27 <sup>Kip1</sup> .....	8
1.5	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma .....	10
1.5.1	PPAR und Nierenerkrankungen.....	12
1.6	Das Monozyten-Chemoattrahierende Protein-1 .....	15
1.7	Ziele der Arbeit.....	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.1	Tierversuch .....	19
2.1.1	Therapie der Versuchstiere .....	19
2.2	Durchführung des Tierversuchs.....	19
2.2.2	Messung des Blutdrucks .....	21
2.2.3	Messung des Blutzuckers.....	21
2.2.4	Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität .....	22
2.2.5	Anfertigen des Zelllysats.....	22
2.2.6	Quantitative Proteinbestimmung.....	22
2.3	Western-Blotting.....	23
2.3.1	Chemikalien .....	23
2.3.2	Puffer und Substratlösungen .....	24
2.3.3	SDS-PAGE.....	25
2.3.4	Proteinblotting.....	26
2.3.5	Immunreaktion .....	26
2.3.6	Färbung der Proteine .....	27

2.4	Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes.....	29
2.4.1	Chemikalien .....	29
2.4.2	Pufferlösungen und Standards für die Hydroxyprolinbestimmung .....	29
2.4.3	Probenvorbereitung von Nierengewebe zur Hydroxyprolinbestimmung mittels HPLC .....	30
2.4.4	Fluoreszenz-HPLC .....	31
2.4.5	Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes mittels Fluoreszenz-HPLC ....	33
2.5	Polymerase Chain Reaction .....	34
2.5.1	Chemikalien .....	35
2.5.2	Ansätze .....	35
2.5.3	RNA-Extraktion aus Gewebe.....	35
2.5.4	Konstruktion des Kompetitors .....	36
2.5.5	Primer .....	36
2.5.6	PCR .....	37
2.5.7	Quantifizieren der c-DNA-Proben .....	37
2.6	Statistische Auswertung.....	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
3.1	Systolischer Blutdruck.....	40
3.2	Blutzucker .....	41
3.3	Urinvolumen .....	42
3.4	Plasma-Renin-Aktivität .....	43
3.5	Hydroxyprolinegehalt des Nierengewebes.....	44
3.6	Monozyten-Chemoattrahierendes Protein-1 .....	45
3.6.1	MCP-1 Western Blot.....	45
3.6.2	MCP-1 PCR .....	47
3.7	p27 <sup>Kip1</sup> -Western Blot.....	48
3.8	PPAR-gamma .....	50
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>51</b>
4.1	Die interstitielle Fibrose Modell der unilateralen Ureterligatur .....	51
4.2	Monozyten-Chemoattrahierendes Protein-1 .....	53
4.3	Systolischer Blutdruck und Plasmareninaktivität.....	55
4.4	Urinvolumen .....	58

4.5	Blutzucker .....	59
4.6	PPAR-gamma .....	60
4.7	Die Zelluläre Proliferation und das p27 <sup>Kip1</sup> .....	62
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Daten .....</b>	<b>82</b>
7.1	Mittlerer systolischer Blutdruck .....	82
7.2	Zucker .....	82
7.3	Urin .....	82
7.4	Plasma-Renin-Aktivität .....	83
7.5	Hydroxyprolin.....	83
7.6	MCP-1 Western Blot .....	83
7.7	MCP-1 PCR.....	84
7.8	p27 <sup>Kip1</sup> Western Blot.....	84
7.9	PPAR-gamma .....	84
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>86</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chronische Nierenersatztherapie in Deutschland 2003.....	1
Abbildung 2: Jahresvergleich der chronischen Nierenersatztherapie.....	1
Abbildung 3: Hämodialyseplätze; Prävalenz der Dialysepatienten.....	2
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Zellzyklus .....	5
Abbildung 5: Coomassie-Blue Färbung eines Western-Blots zur Demonstration einer gleichmäßigen Proteinbeladung der einzelnen Bahnen.....	28
Abbildung 6: Darstellung der Retentionszeiten mittels HPLC.....	34
Abbildung 7: Schema einer kompetitiven PCR-Messung .....	38
Abbildung 8: Mittelwerte des systolischen Blutdrucks .....	40
Abbildung 9: Mittelwerte des Blutzuckers .....	41
Abbildung 10: Mittelwerte des Urinvolumens .....	42
Abbildung 11: Plasma-Renin-Aktivität .....	43
Abbildung 12: Mittelwerte des Hydroxyprolinegehaltes des Nierengewebes .....	44
Abbildung 13: Western Blot Ergebnisse des MCP-1 .....	46
Abbildung 14: MCP-1 Western Blots 25 Tage nach Ureterligatur bzw. Scheinoperation.....	46
Abbildung 15: PCR Ergebnisse des MCP-1 .....	47
Abbildung 16: p27 <sup>Kip1</sup> -Mittelwerte .....	49
Abbildung 17: p27 <sup>Kip1</sup> Western Blots 25 Tage nach Ureterligatur bzw. Scheinoperation.....	49
Abbildung 18: Mittelwerte des Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma .....	50
Abbildung 19: PPAR-gamma Expression 12, 24 und 48 Stunden nach Fütterung .....	61

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung in Abhängigkeit von Scheinoperation bzw. unilateraler Ureterligatur und Medikation (Placebo, Rosi sowie Dauer der UUO .....	19
Tabelle 2: Darstellung der Blutdruckmittelwerte .....	82
Tabelle 3: Darstellung der Blutzuckermittelwerte.....	82
Tabelle 4: Darstellung der Urinvolumenmittelwerte.....	82
Tabelle 5: Darstellung der Plasma-Renin-Aktivität-Mittelwerte .....	83
Tabelle 6: Darstellung der Hydroxyprolinmittelwerte .....	83
Tabelle 7: Darstellung der Western Blot Ergebnisse des MCP-1.....	83
Tabelle 8: Darstellung der PCR Ergebnisse des MCP-1 .....	84
Tabelle 9: Darstellung der p27 <sup>Kip1</sup> -Mittelwerte .....	84
Tabelle 10: Darstellung der PPAR-gamma-Mittelwerte .....	84

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACO	Acyl-CoA-Oxidase
APS	Ammonium Peroxydisulfat
AT 1	Angiotensin II Typ 1-Rezeptor
bp	Basenpaar
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
c-DNA	copy Desoxyribonukleinacid (abgeschriebene Desoxyribonukleinsäure)
CDC	Cell Division Cycle (Zellteilungszyklus)
CDK	Cyclin Dependend Kinase (Cyclin abhängige Kinase)
CKI	Cyclin Kinase Inhibitoren (Cyclin Kinase Hemmer)
CSF	Colony Stimulating Factor (koloniestimulierender Faktor)
DDT	1,4-Dithiotreit
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-Acetate (Äthylendiamintetraessigsäure)
EGF	Epidermal Growth Factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EZMP	Extrazelluläre Matrixproteine
FFA	Free Fatty Acid (freie Fettsäure)
FGF	Fibroblast Growth Factor (fibroblastischer Wachstumsfaktor)
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
Gw	Grauwert
HPLC	High Pressure Liquide Chromatography (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie oder Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1)
IgG	Immunglobulin G
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Ink-4	Inhibitor of CDK4
kDa	kilo Dalton
KG	Körpergewicht
LCAD	Long-Chain Acyl CoA Dehydrogenase (langkettige Acyl CoA Dehydrogenase)

MCAD	Medium-Chain Acyl CoA Dehydrogenase (mittelkettige Acyl CoA Dehydrogenase)
MCP-1	Monozyten-Chemoattrahierendes Protein-1
MIP1 $\beta$	Macrophage Chemotactic Protein-1- $\beta$
m-RNA	messenger Ribonucleinacid (Boten-Ribonukleinsäure)
NBD-CL	7-Chloro-4-Nitrobenzofurazan
NP	Normal Phase
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pmp	per million population (pro Million Einwohner)
PPAR-g	Peroxisome Proliferator-aktivierter Rezeptor-gamma
PRA	Plasma-Renin-Aktivität
pRb	Retinoblastomprotein
RANTES	Regulated by Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted chemokine
RAS	Renin-Angiotensin-System
RP	Reversed Phase
rpm	rounds per minute (Runden je Minute)
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethylenediamin
TG	Triglycerid
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$ (transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ )
TGL	Troglitazon
THF	Tetrahydrofuran
TNF	Tumornekrosefaktor
TZD	Thiazolidinedion
UUO	Unilaterale Ureterobstruktion
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (Gefäßzelladhäsionsmolekül-1)
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells (glatten Gefäßmuskelzellen)
ZZP	Zellzyklusprotein

# 1 Einleitung

## 1.1 Chronische Niereninsuffizienz

### 1.1.1 Epidemiologie

Die Zahl der Patienten mit einer terminalen, dialysepflichtigen Niereninsuffizienz steigt stetig an. Mehr als 58.000 Patienten (710 pro eine Million Einwohner) sind zur Zeit in Deutschland dialysepflichtig. Im Jahr 2003 betrug die Inzidenz von Patienten mit dialysepflichtigem Nierenversagen 186 pro eine Million Einwohner (Abbildung 1). Somit waren mehr als 15.000 Patienten pro Jahr betroffen [Frei und Schober-Halstenberg, 2003/2004].

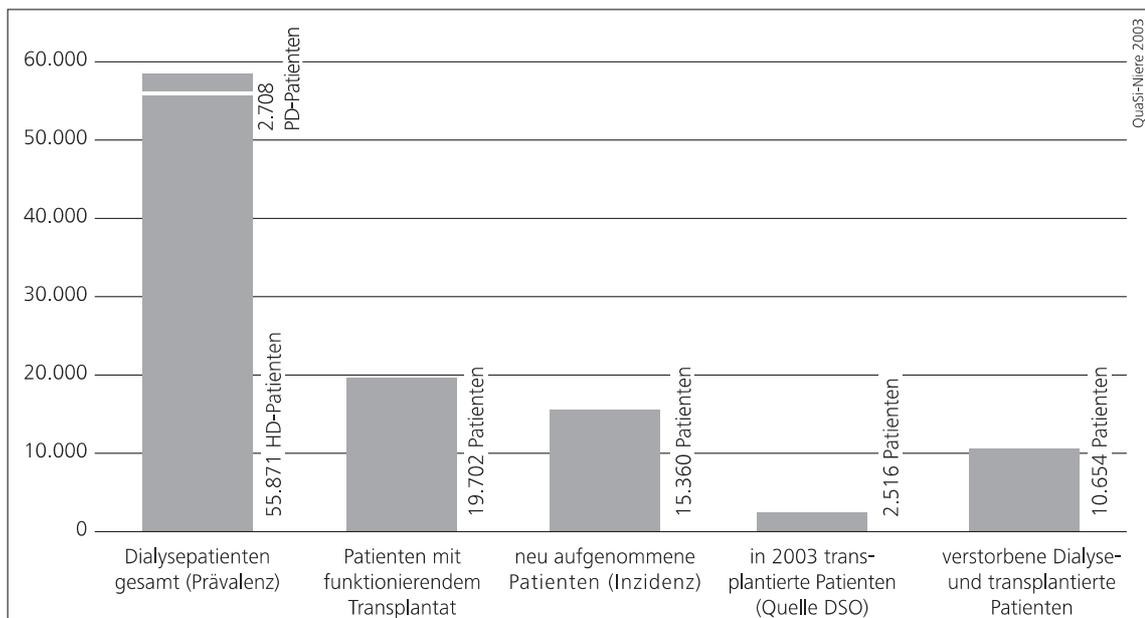


Abbildung 1: Chronische Nierenersatztherapie in Deutschland 2003 [Frei und Schober-Halstenberg, 2003/2004].

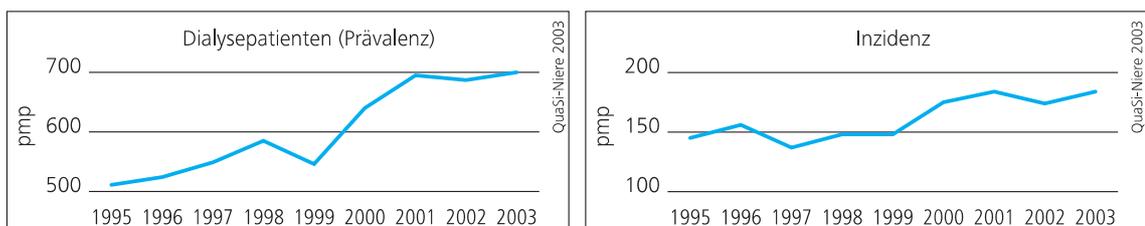


Abbildung 2: Jahresvergleich der chronischen Nierenersatztherapie 1995–2003 pro Million Einwohner (pmp) [Frei und Schober-Halstenberg, 2003/2004].

Dialysepatienten haben eine hohe Morbiditäts- und Mortalitätsrate. Die Kosten für die Dialysebehandlung eines Patienten sind beträchtlich und betragen im halbstationären Modus jährlich ca. 65.000,- Euro. In Jena werden zur Zeit etwa 150 Patienten betreut. Chronische Nierenerkrankungen verlaufen langsam progredient, es kommt zu einer zunehmenden Verschlechterung der Nierenfunktion selbst bei ausgeheilter renaler Grunderkrankung [Wenzel et al., 2003].

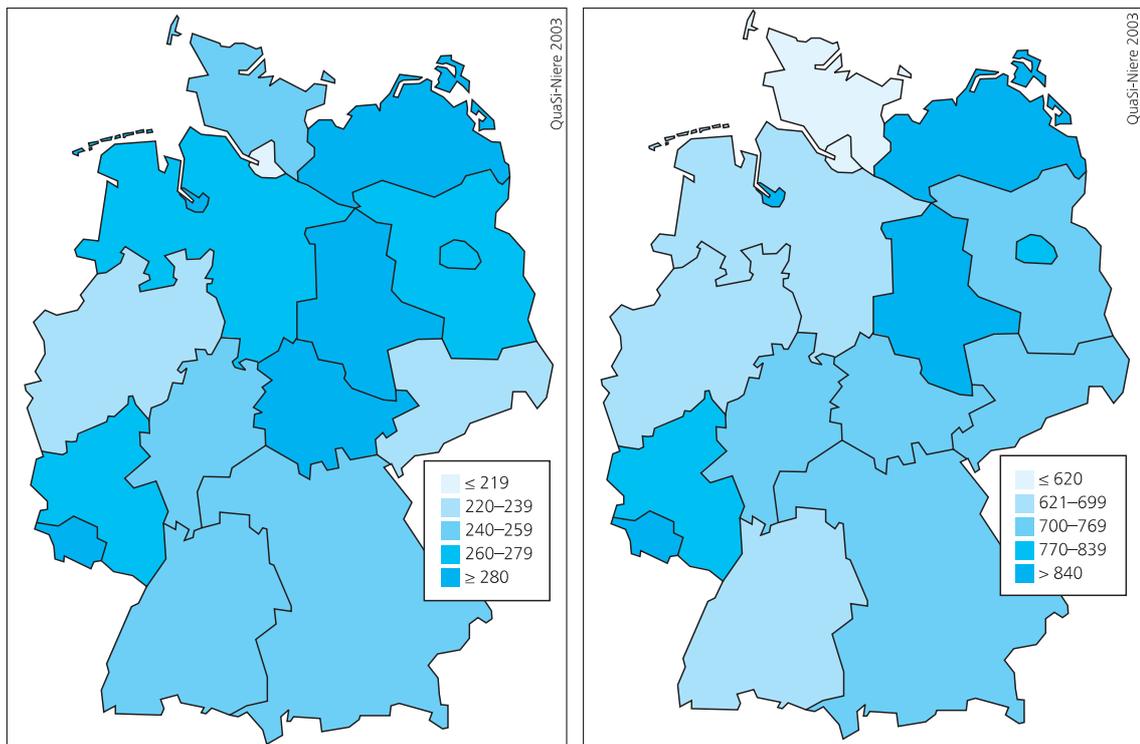


Abbildung 3: linkes Bild – Hämodialyseplätze pmp; rechtes Bild – Prävalenz der Dialysepatienten pmp [Frei und Schober-Halstenberg, 2003/2004].

### 1.1.2 Pathophysiologie

Die pathogenetischen Veränderungen bei der Entstehung einer Niereninsuffizienz sind vielgestaltig. Es gilt als gesichert, dass der progredienten Verschlechterung der Nierenfunktion, unabhängig von der Art der renalen Grunderkrankung die Entwicklung einer Glomerulosklerose, einer interstitiellen Fibrose und einer Sklerose der intrarenalen Gefäße zugrunde liegt [Stein et al., 1996]. Im Verlauf einer chronischen Nierenerkrankung kommt es infolge einer Adaptation an die glomeruläre Hämodynamik in den verbleibenden Nephronen, aber auch durch nicht hämodynamische Prozesse zu progredienten Fibrosierungsprozessen in diesen Kompartimenten [Bohle et al., 1989; Bohle et al., 1994]. Treten zusätzliche Belastungen (Hypertonie, eiweißreiche Ernährung) hinzu, resultiert ein fortschreitender Nierenfunktionsverlust. Die Folgen

sind glomeruläre Druckerhöhung (glomeruläre Hypertonie), Verlust der Barrierefunktion der Glomeruluskapillaren (Proteinurie) und Abfall der glomerulären Filtrationsrate.

Bei der Mehrzahl der zur terminalen Niereninsuffizienz führenden, dialysepflichtigen Nierenerkrankungen, aber auch bei dem chronischen Transplantatversagen, ist die interstitielle Fibrose ein Hauptfaktor der Progredienz. Das Ausmaß des von der interstitiellen Fibrose betroffenen Areals korreliert sowohl mit dem renalen Funktionsverlust als auch mit der Geschwindigkeit des Fortschreitens der Niereninsuffizienz. Dabei kann die interstitielle Fibrose noch Jahre nach Beseitigung der auslösenden Ursache als *circulus vitiosus* fortschreiten [Risdon et al., 1968; Schainuck et al., 1970; Bohle et al., 1996].

## **1.2 Unilaterale Ureterobstruktion als Modell der interstitiellen Fibrose**

Verschiedene tierexperimentelle Modelle der interstitiellen Nierenfibrose stehen zur Verfügung. Eines der am besten untersuchten ist das der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) der Ratte. Dieses Modell ist geeignet, innerhalb weniger Tage eine tubulointerstitielle Nierenfibrose zu verursachen. Es bietet gegenüber Modellen mit einem Einsatz tubulotoxischer Substanzen den Vorteil der schnelleren Ausbildung der Nierenfibrose sowie der besseren Reproduzierbarkeit [Eddy and Giachelli, 1995; Ophascharoensuk et al., 1998; Truong et al., 2001].

Bereits 3 Tage nach Ligatur ist in diesem Modell eine vermehrte m-RNA-Expression und nachfolgende Ablagerung von Fibronectin, Heparansulfatproteoglykan und Kollagen Typ I, III und IV nachweisbar [Sharma et al., 1993; Kaneto et al., 1994]. Eine interstitielle Fibrose wird nach 10–16 Tagen lichtmikroskopisch sichtbar [Nagle et al., 1973].

Bei der Ausbildung einer interstitiellen Nierenfibrose kommt es, ähnlich wie bei anderen chronischen Entzündungsprozessen, zunächst zur Invasion entzündlicher Zellen mit nachfolgender Proliferation tubulointerstitieller Zellen sowie von eingewanderten Monozyten/Makrophagen bzw. Lymphozyten. Diesen Vorgängen folgt eine zunehmende Ablagerung von Bindegewebsmatrix mit Bildung neuer Kapillaren sowie die Rückbildung der mesenchymalen Zellen und Ausbildung eines hypozellulären und matrixreichen Bindegewebes [Wendt et al., 1995; Sommer und Fünfstück, 1997]. Diese Schädigungsprozesse führen im Modell der UUO nach 20 bis 25 Tagen zur

irreversiblen Nierenfibrose [Fern et al., 1999]. Am aussichtsreichsten für die Prävention des chronisch-fibrotischen Endzustandes sind Maßnahmen gegen die frühzeitig ablaufenden Invasions- und Proliferationsvorgänge.

Werden die Versuchstieren nach UUO ACE-Hemmer [Kaneto et al., 1994; Ishidoya et al., 1995], Arginin [Reyes et al., 1994; Morrissey et al., 1996] oder Probucol [Modi et al., 1990] verabreicht, lassen sich nephroprotektive Effekte, wie eine verringerte Monozyten/Makrophagen-Infiltration, eine reduzierte Ablagerung von Interzellularmatrix histomorphometrisch oder biochemisch quantifizieren. Um den sich selbst unterhaltenden Prozess einer fortschreitenden Fibrosierung des Organs zu durchbrechen, sind frühzeitige Maßnahmen erforderlich, welche in die pathogenetischen Mechanismen eingreifen und deren Fortschreiten verhindern. Da die ablaufenden Prozesse auf verschiedenen, parallelen Bahnen stattfinden, die sich zum Teil gegenseitig ersetzen, ist ein Eingreifen an unterschiedlichen Schnittstellen erforderlich, um den Prozess aufzuhalten bzw. zu verlangsamen.

### **1.3 Der Zellzyklus**

Seit mehr als 100 Jahren ist bekannt, dass die Zellteilung letztendlich vom Inneren des Zellkerns ausgeht. Wenn sich Zellen teilen, muss die korrekte Weitergabe der genetischen Information an die nächste Generation gewährleistet sein. Der Zellzyklus somatischer Zellen des Eukaryonten lässt sich einteilen in:

- die M-Phase (Mitose), die Phase der Teilung von Chromosomen und der Zelle;
- die Interphase, der Abschnitt zwischen den aufeinanderfolgenden Stadien der Mitose; sie umfasst die:
  - G<sub>1</sub>-Phase, das Intervall zwischen der Mitose und dem Beginn der DNA-Replikation,
  - S-Phase, den Zeitraum der DNA-Synthese und die
  - G<sub>2</sub>-Phase, das Intervall zwischen der S-Phase und der Mitose.

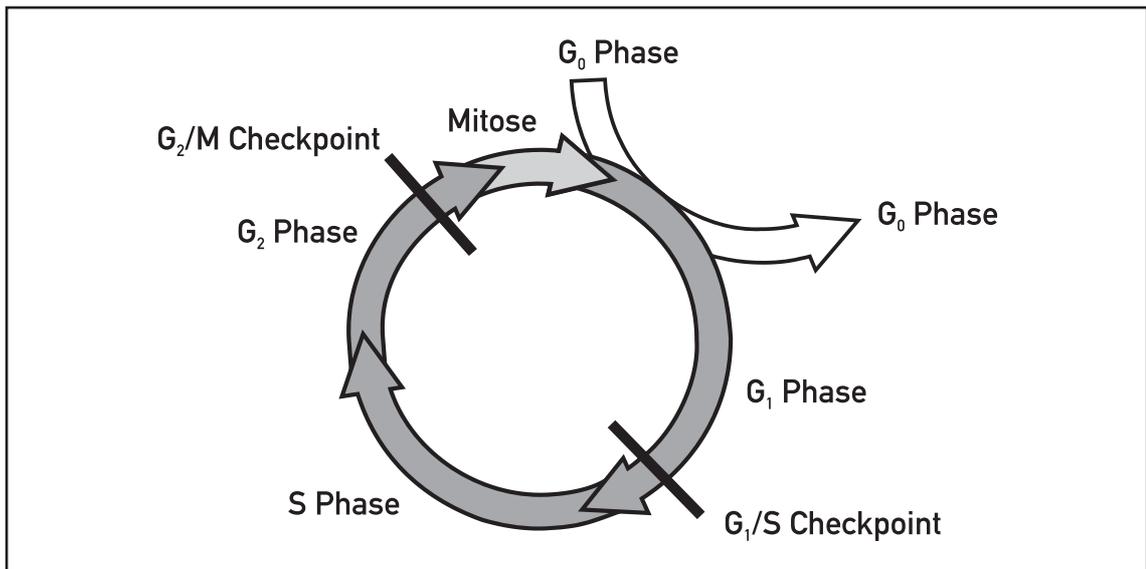


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Zellzyklus [angelehnt an Shankland and Wolf, 2000]

Ruhende, sich nicht teilende Zellen, befinden sich in der G<sub>0</sub>-Phase und können zumeist über die G<sub>1</sub>-Phase wieder in den Zyklus eintreten. Die Mitose unterteilt sich wiederum in Pro-, Meta-, Ana- und Telophase.

Der Übergang von einer Phase des Zellzyklus in eine andere ist ein koordinierter und synchronisierter Prozess mit genau definierter Reihenfolge. Es wird sichergestellt, dass die zelluläre Maschinerie für die DNA-Replikation bereit ist, dass die DNA-Replikation nur einmal in jedem Zyklus erfolgt, dass die DNA-Replikation vor dem Beginn der Mitose abgeschlossen ist und dass Chromosomen zu einem identischen Set von Tochterzellen repliziert werden. Wird der „Restriktions-Punkt“ in der späten G<sub>1</sub>-Phase überschritten, reagieren die Zellen nicht mehr auf extrazelluläre Signale und beenden den Zellzyklus.

Die Steuerung des Zellzyklus geschieht durch intranukleär lokalisierte Zellzyklusproteine (ZZP) und deren Inhibitoren (CKI). Cyclin-abhängige Kinase (CDK) sind Serin/Threonin-Proteinkinasen von 30-36 kDa mit mehr als 50 Prozent Homologie untereinander. Ihre Aktivität hängt von der Komplexbildung zwischen ihrer katalytischen Untereinheit und sehr instabilen Proteinen ab, die deshalb Cycline genannt werden. Die Erzeugung und der Abbau dieser Cycline sind entscheidende Kontrollmechanismen für das Durchlaufen der verschiedenen Zellzyklus-Phasen. Cycline weisen eine konservierte Sequenz aus 100 Aminosäuren auf, die sogenannte Cyclin-Box, die mit der CDK-Untereinheit reagiert. Dabei erfolgt eine Konformationsänderung der CDK, die zu einer Teilaktivierung führt. Die nachfolgende

Phosphorylierung eines speziellen Threoninrestes durch eine CDK-aktivierende Kinase ist zur vollen Aktivierung und zur Stabilisierung des Cyclin-CDK-Komplex nötig. Der aktive Komplex katalysiert dann die Phosphorylierung einer Reihe von Substanzen wie z. B. dem Retinoblastomprotein (pRb), welches im phosphorylierten Zustand den Transkriptionsfaktor E2F freigibt und damit eine DNS-Synthese ermöglicht [Pestell et al., 1999; Shankland et al., 2000].

Der Aktivitätszustand dieser Komplexe ist vom Phosphorylierungsgrad der Moleküle [Draetta, 1993] sowie von der Assoziation spezifischer CDK-Inhibitoren an die Komplexe [Sherr, 1995] abhängig. Für das Fortschreiten der G<sub>1</sub>-Phase sind insbesondere die Cycline D1-3 bedeutsam, während eine aufeinanderfolgende Aktivierung der Cycline E und A für den Übergang in die S-Phase erforderlich ist. Eine Unterdrückung der Kinaseaktivität dieser Cyclin-CDK-Komplexe führt durch Arretierung des Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase zur Hypertrophie der Zelle.

Die CDK-Inhibitoren lassen sich anhand von Strukturhomologien und Bindung an spezifische Cycline in 2 Gruppen einteilen. Die Ink-4-Familie (Inhibitor of CDK4) (p14, p15, p16, p18, p19) ist fast ausschließlich an der Regulation des G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Überganges durch Bindung an die D-Cycline beteiligt. Demgegenüber sind p21, p27<sup>Kip1</sup> und p57 (KIP-Familie) in nahezu allen Phasen des Zellzyklus nachweisbar und in der Lage, mit einer Reihe von Cyclin-CDK-Komplexen in Verbindung zu treten.

Am 8.10.2001 hat die Nobelversammlung am Karolinska Institut beschlossen, den Nobelpreis des Jahres 2001 in Physiologie und Medizin Leland H. Hartwell, R. Timothy Hunt und Paul M. Nurse gemeinsam für ihre Entdeckungen über „Die Kontrolle des Zellzyklus“ zu verleihen.

Nachfolgend werden die Cycline entsprechend des chronologischen Ablaufes der Zellzyklusphasen erläutert.

### **1.3.1 Typ D-Cyclin**

In der frühen G<sub>1</sub>-Phase werden Cycline des Typs D (D1- D3) exprimiert [Sherr, 1993]. Das pRb ist das primäre Zielprotein der D-Typ-Cyclin-CDK-Komplexe. Es wird von diesen Komplexen phosphoryliert und damit aktiviert [Ewen et al., 1993].

Bei mehr als 60 Prozent aller beim Menschen auftretenden Tumoren ist dieses Protein deletiert oder zu funktioneller Inaktivität mutiert. Damit gilt das pRb als echtes Tumorsuppressorprotein. Es wird unmittelbar nach der M-Phase dephosphoryliert und

ist in dieser Form imstande, Transkriptionsfaktoren, besonders das Heterodimer aus den Faktoren E2F und DRTF1 zu binden [Shankland et al., 2000]. Dadurch wird die Transkription einer Reihe von Genen verhindert, deren Genprodukte für die S-Phase benötigt werden.

Weiterhin können die CDK-Partner der Typ-D-Cycline die Wirkung von PCNA (proliferating cell nuclear antigen), welches einen Co-Faktor der DNA-Polymerase [Lee and Garcia-Lopez, 1990] darstellt und für die Zellteilung erforderlich ist, durch Komplexbildung hemmen oder aktivieren [Xiong et al., 1992]. Das PCNA wird als Proliferationsmarker u. a. in der immunhistologischen Diagnostik verwendet.

Won 1992 und Sewing 1993 haben nachweisen können, dass die Induktion von Cyclin D von Wachstumsfaktoren abhängig ist. Ein Entzug von Wachstumsfaktoren führt zu einer Verminderung der Expression von D-Typ-Cyclinen. Neben der Fähigkeit, den Übergang zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen einzuleiten, vermag diese Gruppe von Cyclinen auch die Dauer der G<sub>1</sub>-Phase zu bestimmen. Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression der Cycline D1, D2 und D3 die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus verkürzt [Kato et al., 1993; Pagano et al., 1993]. Andererseits blockieren Antikörper, die gegen das Cyclin D1 gerichtet sind, den Übergang in die G<sub>1</sub>-Phase und verlängern diese [Baldin et al., 1993; Quelle et al., 1993].

### **1.3.2 Typ E-Cyclin**

Cyclin E wird in der späten G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus exprimiert. Wie bei den Typ D-Cyclinen führt eine Überexpression zu einer Verkürzung der G<sub>1</sub>-Phase und zu einem niedrigeren Bedarf an Wachstumsfaktoren in Bezug auf die Progression des Zellzyklus [Ohtsubo et al., 1995]. Transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF  $\beta$ 1) bewirkt durch die Aktivierung eines Inhibitorproteins der Kip-Familie, welches das Cyclin E aus seiner Bindung an CDK2 verdrängt, ein Verharren in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus [Geng and Weinberg, 1993; Eblen et al., 1994].

### **1.3.3 Typ A-Cyclin**

In der späten G<sub>1</sub>-Phase sowie in der S- und G<sub>2</sub>-Phase ist ein Anstieg von Cyclin A nachzuweisen, welches mit den Kinasen CDK 2 und CDC 2 (cell division cycle gen 2, bekannt als CDK 1) Komplexe bildet [Pagano et al., 1992]. Cyclin A wird sowohl zur

Einleitung der DNA-Synthese als auch zu deren Fortschreiten benötigt [Girard et al., 1991].

#### **1.3.4 Typ B-Cyclin**

Das Cyclin B wird überwiegend in der S-, der späten G<sub>2</sub>-Phase und in der M-Phase exprimiert. Seine Aktivierung erfolgt durch die Bindung an seinen Partner CDC 2 (CDK 1) [Pine and Darnell, 1989; Coleman and Dunphy, 1994]. Beide Cycline, A und B, werden als Regulatoren des Überganges in die Mitose angesehen.

#### **1.4 Das 27-kilo Dalton Protein p27<sup>Kip1</sup>**

Das p27<sup>Kip1</sup> als Mitglied der Familie der Cyclin Kinase Inhibitoren (CKI) bindet und hemmt die Cyclin D-, E-, A- und B-abhängigen Kinasen. Da p27<sup>Kip1</sup> nicht unter transkriptioneller Kontrolle steht, bleibt die m-RNA Menge während des Zellzyklus unverändert [Hengst and Reed, 1996]. Im Gegensatz zu p21 wird die p27<sup>Kip1</sup>-Expression durch Veränderungen in der Proteintranslation und -degradation über den Ubiquitin proteolytischen Weg reguliert und mittels Phosphorylierung modifiziert [Sheaff et al., 1997]. Dementsprechend besitzen ruhende oder ausdifferenzierte Zellen hohe p27<sup>Kip1</sup>-Spiegel. Im Gegensatz dazu fällt während der Proliferation der p27<sup>Kip1</sup>-Spiegel ab.

Im in vitro-Modell stimulierter Mesangialzellen und im Thy1-Modell (Modell einer mesangioproliferativen Glomerulonephritis) konnte unter anderem dem p27<sup>Kip1</sup> eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation durch Aktivitätssenkung einzelner Cyclin-CDK Komplexe nachgewiesen werden. Es kommt dabei zu einem Arrest des Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase mit konsekutiver zellulärer Hypertrophie [zusammenfassende Übersichten: Shankland et al., 1997, 1999, 2000; Nitta et al., 1999].

Es liegen Arbeiten über die Expression von Zellzyklusproteinen nach tubulointerstitieller Schädigung bzw. von renalen Tubulusepithelzellen vor. Die Proliferation von mit Epidermal growth factor (EGF) stimulierten Tubulusepithelzellen wird unter TGF-β<sub>1</sub>-Einfluss in ein hypertrophes Wachstum umgewandelt; dies geht mit einer Senkung der Cyclin E-CDK2-Aktivität einher [Liu et al., 1999].

Eine besondere Rolle kommt dem CDK-Inhibitor p27<sup>Kip1</sup> in der Regulation der proliferativen bzw. hypertrophen Wachstumsprozesse der G<sub>1</sub>-Phase zu. Wolf und Stahl konnten 1996 zeigen, dass Angiotensin II über eine Aktivierung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors

eine Hypertrophie proximaler Tubulusepithelzellen induziert. Dies geschieht unter Vermittlung einer gesteigerten Expression von p27<sup>Kip1</sup> und nachfolgender Aktivitätssenkung des Cyclin D1-CDK4-Komplexes. Die intrazelluläre Signaltransduktion geschieht unter anderem durch Superoxid-Anionen [Hannken et al., 1998]. Eine Blockade von p27<sup>Kip1</sup> durch antisense-Oligonukleotide unterdrückt die Hypertrophie und erleichtert den Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus [Wolf und Stahl, 1996].

Während die verstärkte p27<sup>Kip1</sup>-Expression zur Hypertrophie in der G<sub>1</sub>-Phase führt, begünstigt eine supprimierte p27<sup>Kip1</sup>-Expression neben der zellulären Proliferation unter bestimmten Bedingungen den Eintritt der Zelle in den Prozess des programmierten Zelltodes – Apoptose. In Tubulusepithelzellen und renalen Fibroblasten, welche aus p27<sup>Kip1</sup>-knock-out Mäusen isoliert wurden, findet sich eine massiv erhöhte Apoptoserate, wenn diese Zellen unter wachstumsfaktorfreien Kulturbedingungen gehalten werden. Die Zugabe von Wachstumsfaktoren unterstützt den Eintritt der Zellen in die S-Phase und die darauffolgende Mitose. Die verstärkte Apoptoserate unter Wachstumsfaktor-freien Kulturbedingungen geht mit einer erhöhten CDK2-Cyclin A-Aktivität ohne vorherige Aktivierung des CDK2-Cyclin E-Komplexes einher. Die aufeinanderfolgende Aktivierung von Cyclin E und Cyclin A wäre jedoch Voraussetzung für den Eintritt der Zellen in die S-Phase. Eine spezifische pharmakologische Hemmung der Cyclin-A-CDK 2-Aktivität durch Roscovitine bzw. die transiente Transfektion der Zellen mit einem p27<sup>Kip1</sup>-DNA tragenden Plasmid unterdrückt die verstärkte Apoptoserate nahezu vollständig. Eine gesteigerte Expression der Komponenten des CDK2-Cyclin A-Komplexes war auf RNA- und Proteinebene nicht nachweisbar. Die durch p27<sup>Kip1</sup>-Abwesenheit vorzeitig hervorgerufene Cyclin-A-Aktivierung führt demzufolge zu einem direkten Eintritt der Zelle von der G<sub>1</sub>-Phase in die Apoptose [Hiromura et al., 1999]. Das Verlassen des Zellzyklus zur Apoptose geschieht typischerweise aus der G<sub>1</sub>-Phase [Meikrantz und Schlegel, 1995].

In p27<sup>Kip1</sup>-knock-out Mäusen führen sowohl eine immunologische Schädigung der Mesangialzellen (Anti-Thy 1-Modell) als auch eine nicht immunologische Schädigung des Tubulointerstitiums (UUO-Modell) zu einer massiven Verstärkung der Zellproliferation, der Ablagerung von Bindegewebsmatrix sowie einem verstärkten renalen Funktionsverlust [Ophascharoensuk et al., 1998]. Unter diesen Bedingungen werden 2–3fach erhöhte Apoptoseraten gemessen [Shankland et al., 2000].

Somit stellt p27<sup>Kip1</sup> in den untersuchten Nierenzellpopulationen eine zentrale Schnittstelle in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus dar. Eine starke Expression von p27<sup>Kip1</sup> führt zum Arrest des Zellzyklus in der späten G<sub>1</sub>-Phase. Unter Einfluss von Wachstumsfaktoren kommt es bei weiterhin verstärkter Expression zur zellulären Hypertrophie. Eine Hemmung der Expression führt zum Eintritt in die S-Phase sowie zur Zellteilung. Eine p27<sup>Kip1</sup>-Suppression führt unter einem Mangel an Wachstumsfaktoren zum Einmünden des Zellzyklus in die Apoptose. Ein weiterer wichtiger Hinweis für die Rolle von p27<sup>Kip1</sup> als Suppressor einer Apoptose ist die Tatsache, dass während des Apoptosevorganges aktivierte Enzyme (verschiedene Kaspasen) p27<sup>Kip1</sup> vom C-terminalen Ende des Moleküls her abbauen können und somit dessen Aktivität unterdrücken [Levkau et al., 1998].

Es ist bekannt, dass die p27<sup>Kip1</sup>-Expression durch TGF- $\beta$ , Rapamycin, cAMP sowie Zell-Zell-Kontakt in vitro stimulierbar ist [Nourse et al., 1994, Shankland et al., 2000]. Dabei hat die über p27<sup>Kip1</sup> vermittelte Proliferationshemmung von Rapamycin bereits erfolgreich Eingang in die klinische Praxis gefunden. Dies gilt sowohl für die Prävention der Transplantatabstoßung solider Organe und damit dem Einsatz des Medikamentes als Immunsuppressivum als auch für die Prävention der Intimaproliferation beim Einsatz Rapamycin beschichteter Koronarstents.

An renalen Zellen wurde gezeigt, dass neben hohen Angiotensin II-Spiegeln (Bindung an Cyclin D-CDK4) [Wolf und Stahl, 1996] auch eine hohe Glukosekonzentration in der Lage ist, die p27<sup>Kip1</sup>-Expression zu verstärken [Wolf et al., 1997, 1998]. Es ist bislang unklar, ob weitere Mediatoren die p27<sup>Kip1</sup>-Expression stimulieren können. Es ist ebenso unklar, welche Faktoren zur p27<sup>Kip1</sup>-Suppression beitragen und damit den Eintritt in die Apoptose unterstützen. Dies ist insbesondere auch im Hinblick auf die Funktion von p27<sup>Kip1</sup> als Tumorsuppressor bedeutsam [Sgambato et al., 2000].

## **1.5 Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma**

Issemann und Green identifizierten 1990 den ersten Zellkern-Rezeptor, an den Peroxisomen Proliferatoren binden. Dieser Rezeptor wurde als Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha) bezeichnet. Anschließend konnten zwei weitere Isoformen des PPAR identifiziert werden: PPAR-beta/sigma und PPAR-gamma [Dreyer et al., 1992].

Seit der Bestimmung des ersten PPAR in Mäusen [Issemann and Green, 1990] wurden die drei Isoformen geklont und durch ihre Expressionsmuster verschiedene Ligandenspezifitäten und metabolische Funktionen charakterisiert. Die Kenntnis der Rolle des PPAR in der Physiologie des gesamten Körpers und bei vielen humanen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Adipositas, Arteriosklerose, Hypertension und maligne Erkrankungen, stellt einen beträchtlichen Fortschritt der letzten Dekade dar.

Die Peroxisomen Proliferatoren umfassen eine Gruppe strukturell verschiedener Verbindungen, die ursprünglich als Induktoren der hepatischen Peroxisomenproliferation identifiziert wurden [Reddy et al., 1980]. Heute ist bekannt, dass diese Effekte durch Bindung der Peroxisomen Proliferatoren an die PPAR vermittelt werden.

PPAR-gamma ist ein Mitglied der Zellkern Rezeptor Familie Liganden aktivierbarer Transkriptionsfaktoren, die sich nach Aktivierung vorteilhaft auf den Diabetes mellitus im Sinne einer verbesserten Insulinsensitivität und eines verbesserten Fettstoffwechsels auswirken.

Die Insulinresistenz wird als wesentlicher pathogenetischer Faktor in der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 angesehen. Sie spielt eine außergewöhnliche Rolle in der Entstehung des metabolischen Syndroms [Reaven, 1988; Itoh et al., 1999]. Für die Kontrolle des Diabetes mellitus Typ 2 hat die Behandlung der Insulinresistenz ein großes therapeutisches Potential. Die Aktivierung des PPAR-gamma durch synthetische Thiazolidinedione (TZD) wird bereits erfolgreich in der Behandlung von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt [Auwerx, 1999]. Troglitazon (TGL) war das erste Beispiel dieser neuen Substanzklasse antidiabetischer Medikamente. In Deutschland sind für die Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 Rosiglitazon (Avandia<sup>R</sup>) und Pioglitazon (Actos<sup>R</sup>) zugelassen.

Es wurde gezeigt, dass die Klasse der TZD einen antihyperglykämischen und antihyperinsulinämischen Einfluss hat. Neben diesen Effekten reduzieren TZD auch die Triglycerid- (TG) und freien Fettsäurespiegel (FFA) [Brown et al., 1999].

Neben ihrer Rolle in der Therapie des Diabetes mellitus werden in den letzten Jahren eine ganze Reihe von Indikationen für den klinischen Einsatz von TZD anhand vielversprechender tierexperimenteller Daten diskutiert. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf die Arteriosklerose. Es konnte in verschiedenen Tiermodellen, aber auch am Menschen gezeigt werden, dass TZD die Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen hemmen und eine Makrophagen- bzw. Schaumzellakkumulation in der Gefäßwand

unterdrücken. Sie sind ebenfalls in der Lage, die Mikroinflammation, die einen pathogenetischen Faktor der Arteriosklerose darstellt, zu unterdrücken. Verheißungsvolle erste Ergebnisse liegen bereits bei Patienten mit einer Karotisstenose vor, bei denen TZD die Rezidivstenoserate senken konnten [Blaschke et al., 2004]. An verschiedenen Organen wurden im Tierversuch ebenfalls positive Effekte nach Ischämie/Reperfusionsschäden nachgewiesen. Als pathogenetischer Faktor wird hierbei die Suppression der Entzündung durch eine Hemmung verschiedener nukleärer Transkriptionsfaktoren NFkB und AP1 diskutiert [Naito et al., 2004]. Weiterhin werden TZD durch ihre antiproliferativen Effekte im Hinblick auf Tumorzellwachstum und Tumorangiogenese als potentielle Hoffnungsträger in der Onkologie angesehen [Margeli et al., 2003].

### **1.5.1 PPAR und Nierenerkrankungen**

Über die Rolle der PPAR Isoformen in der Niere ist bislang nur wenig bekannt. In vielen Spezies, einschließlich dem Menschen werden alle drei Formen im Nierengewebe gefunden [Yang et al., 1999].

PPAR-alpha wird vor allem im proximalen Tubulus und im dicken Schenkel der Henle-Schleife exprimiert und könnte zur lipidinduzierten Genexpression der peroxysomalen und mitochondrialen  $\beta$ -Oxydation in diesen Segmenten beitragen [Ouali et al., 1998]. Der PPAR-alpha Agonist Clofibrat induziert die Expression von  $\beta$ -Oxidase Enzymen in der Nierenrinde, einschließlich der langkettigen Acyl CoA Dehydrogenase (LCAD), der mittelkettigen Acyl CoA Dehydrogenase (MCAD) und der Acyl CoA Oxidase (ACO). Diese Daten lassen darauf schließen, dass PPAR-alpha eine wichtige Rolle in der Fettsäureverwertung der Niere spielt und das Gleichgewicht von Energieproduktion und -verbrauch der Niere, durch Regulation der Expression der in die  $\beta$ -Oxidation einbezogenen Gene beeinflusst [Portilla et al., 2000]. Diese Daten stützen die Beobachtung, dass PPAR-alpha-Liganden die Rattenniere vor Ischämie-/Reperfusionsschäden schützen. PPAR-alpha knock-out Mäuse zeigen eine stärkere kortikale Nekrose und schlechtere Nierenfunktion als die Wild-Typ Kontrolltiere nach renaler Ischämie [Portilla et al., 2000]. Diese Ergebnisse tragen dazu bei, die molekularen Mechanismen zu verstehen und vielleicht eine neue therapeutische Strategie für ischämische Nierenerkrankungen zu entwickeln.

PPAR-gamma wird im Gegensatz zu PPAR-alpha hauptsächlich in den Sammelrohren exprimiert. Die Lokalisation in den Sammelrohren lässt einen Einfluss auf die Wasser- und Elektrolythomöostase vermuten. So führt die Behandlung mit TZD bei Nagern und Menschen zu einer ausgeprägten Flüssigkeitsretention, Ödemen und Hämodilution [Akanuma et al., 1993; Yoshimoto et al., 1997]. Zhang et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung von PPAR-gamma in den Sammelrohren für die Wasser- und Natriumretention verantwortlich ist. Sie zeigten an Mäusen, deren PPAR-gamma-Gene manipuliert bzw. ausgeschaltet waren, dass diese einer Rosiglitazon induzierten Gewichtsabnahme und einer Plasmavolumenexpansion gegenüber resistent waren. Rosiglitazon verminderte die Natriumausscheidung im Urin nur bei den Kontrolltieren, nicht aber bei den Knock-Out-Mäusen. Des Weiteren stimuliert Rosiglitazon den Natriumtransport in Sammelrohr-Zellkulturen mit PPAR-gamma Expression [Zhang et al., 2005].

Kultivierte Mesangiumzellen exprimieren ebenfalls PPAR-gamma [Asano et al., 2000]. Sie können auch einen Precursor des 15dPGJ2, einem vermeintlichen endogenen PPAR-gamma Liganden, produzieren. Erste Untersuchungen ergaben, dass PPAR-gamma in frisch isolierten Glomeruli vorkommt und ein parakrines PPAR-gamma System in glomerulären Mesangiumzellen existiert [Guan and Breyer, 2001].

Es ist gut belegt, dass mesangiale Zellen eine wichtige Rolle beim Fortschreiten einer Nephropathie spielen. Während einer entzündlichen Schädigung (z.B. Thy-1-Nephritis) oder einer Glukosebelastung durchlaufen Mesangiumzellen einen Aktivierungsprozess von einem ruhenden hin zu einem proliferativen myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp. Dies wird deutlich durch ansteigende alpha Aktin-Expression, wie auch durch eine vermehrte Produktion extrazellulärer Matrixproteine [Johnson et al., 1991; Makino et al. (Diabetes 45, Diabetes Compl 9.) 1995]. Diese phänotypischen Veränderungen werden als grundlegender pathogenetischer Schritt in der Entwicklung der diabetischen Nephropathie und verschiedener Glomerulonephritiden betrachtet. Studien von Asano et al. haben gezeigt, dass synthetische PPAR-gamma Liganden (z.B. Troglitazon) und endogene PPAR-gamma Liganden (z. B. 15dPGJ2) die Produktion von alpha Aktin unterdrücken. Dies legt die Vermutung nahe, dass die PPAR-gamma Aktivierung die Transdifferenzierung der Mesangiumzellen inhibiert [Asano et al., 2000]. Darüber hinaus zeigten in vitro Studien, dass PPAR-gamma Liganden dosisabhängig die Proliferation von mesangialen Zellen hemmen [Asano et al., 2000]. PPAR-gamma Aktivierung könnte also phänotypische Veränderungen des Mesangiums unterdrücken,

induziertes Zellwachstum aufhalten und die Ablagerung extrazellulärer Matrixproduktion reduzieren. Deshalb könnte die Aktivierung von glomerulärem PPAR-gamma ein therapeutisches Ziel in der Behandlung der diabetischen Nephropathie sowie proliferativer Glomerulonephritiden sein.

Tatsächlich wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Troglitazon die Mikroalbuminurie in Streptozotocin-induzierten diabetischen Ratten und bei Diabetes mellitus Typ 2 Patienten unterdrückt [Fujii et al., 1997, Imano et al., 1998]. Bei der fa/fa Ratte, einem genetischen Modell des Diabetes mellitus Typ 2, verminderte die Applikation von Troglitazon die Proteinurie und hielt den frühen Ausbruch und das Fortschreiten der mesangialen Expansion und der Glomerulosklerose auf [McCarthy et al., 2000]. Ähnlich eindrucksvoll reduzieren Pioglitazon und Rosiglitazon die Proteinurie und verlangsamen die Progression der diabetischen Nephropathie bei genetisch fettleibigen diabetischen Ratten [Yoshimoto et al., 1997, Buckingham et al., 1998].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass TZD direkte vorteilhafte Effekte auf glomeruläre Strukturen in Tiermodellen einer diabetischen Nephropathie hat. Troglitazon ist nicht nur in der Lage, die glomeruläre Hyperfiltration und die Albuminurie zu verhindern, sondern verminderte auch die m-RNA Expression extrazellulärer Matrixproteine (Fibronektin und Typ IV Kollagen) und von TGF- $\beta$ 1 in diabetischen Glomeruli. Diese Effekte bei insulinabhängigem Diabetes mellitus lassen darauf schließen, dass PPAR-gamma Liganden die glomeruläre Funktion, unabhängig von ihrer Kapazität, die Insulinresistenz zu unterdrücken, schützen können.

Weiterhin haben PPAR-gamma Liganden bei einem nichtdiabetischen Glomerulosklerosemodell die Verschlechterung der renalen Funktion verhindert. Ma et al. beschrieben an einem 5/6 Ablationsmodell der Niere, dass eine Troglitazonbehandlung die Proteinurie, den Serumkreatininspiegel und das Ausmaß der Glomerulosklerose vermindert. Dies geschieht durch Inhibition der glomerulären Zellproliferation und Reduktion der TGF- $\beta$ 1 Expression in den Glomeruli und Tubuli [Guan and Breyer, 2001]. Zusammengefasst lassen diese Studien darauf schließen, dass TZD als therapeutisches Agens zur Beeinflussung der Nephropathie und der Glomerulosklerose in Betracht kommen.

PPAR-alpha und PPAR-gamma haben außerdem starke antiinflammatorische Effekte [Jiang et al., 1998, Ricote et al., 1998]. Es ist anzunehmen, dass eine Aktivierung von PPAR eine Rolle in der Suppression der renalen Entzündung, einschließlich der Glomerulonephritis und der interstitiellen Nephritis, spielt. Der Einfluss der PPAR-

gamma-Agonisten auf nichtdiabetische glomeruläre und tubulointerstitielle Erkrankungen ist bislang wenig untersucht [Ma et al., 2001; Zafiriou et al., 2005].

## **1.6 Das Monozyten-Chemoattrahierende Protein-1**

Das Monozyten-Chemoattrahierende Protein-1 (MCP-1) gehört zu den Chemokinen und damit zur heterogenen Gruppe der Zytokine. Zytokin ist der Oberbegriff für zahlreiche körpereigene Substanzen (Peptide), die von aktivierten T-Zellen und anderen Zellen während der natürlichen und spezifischen Immunantwort freigesetzt werden. Die Zytokine haben vielfältige v. a. proinflammatorische, immunregulatorische und die Hämatopoese steuernde Funktionen. Außerdem sind sie wichtig für Reparaturmechanismen von Gewebeschäden und wirken für viele Zellen als Wachstumsfaktoren. Zu den Zytokinen gehören unter anderem Interleukine (IL), Interferone (IFN), Wachstumsfaktoren (v.a. CSF), Monokine und natürlich die chemotaktischen Peptide. Zytokine werden zunehmend therapeutisch angewendet: z.B. der Granulozytenkolonie stimulierende Faktor (G-CSF) bei Knochenmarkaplasie infolge Chemotherapie, Interferone (IFN-alpha) bei Haarzelleukämie und verschiedenen Tumoren.

Als Chemokine bezeichnet man eine Gruppe von mindestens 40 Zytokinen, wovon die meisten erst in den letzten Jahren identifiziert wurden. Chemokine werden am Ort der Entzündung von Leukozyten und Gewebezellen sezerniert. Sie haben chemotaktische Wirkungen und steuern damit die Leukozytenwanderungen im Körper. Sie aktivieren darüber hinaus z. T. Immun- und Entzündungszellen. Neben dem MCP-1 gehören IL 8, RANTES (Regulated by Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted chemokine) und MIP1  $\beta$  (macrophage chemotactic protein-1- $\beta$ ) zu den typischen Vertretern der Chemokine. Diese Proteine sind in der Lage, Leukozyten anzulocken und haben strukturelle Gemeinsamkeiten. Derzeit sind 17 Chemokinrezeptoren bekannt.

Chemokine sind 8–10 kD Proteine mit 20 bis 70 Prozent Homologie in den Aminosäuresequenzen. Sie wurden anhand der Stellung der Cysteinreste in vier Familien unterteilt. Bislang sind nur zwei Familien ausführlich untersucht. Die größten Familien sind die alpha und beta Chemokine, die vier Cysteinreste besitzen. Bei den alpha Chemokinen trennt eine Aminosäure (AS oder X) die ersten zwei Cysteinreste voneinander (CXC), wohingegen bei den beta Chemokinen die ersten beiden Cysteinreste miteinander verbunden sind (CC). Es gibt zwei Chemokine, die nicht in

diese Klassifikation passen, zum einen Lymphotactin, welches nur zwei Cysteinreste besitzt und zum anderen Fractalkin, ein membrangebundenes Glykoprotein, bei welchem die ersten beiden Cysteinreste durch drei Aminosäuren unterbrochen werden (CXXXC) und die Chemokin-Domäne an einem mucinähnlichen Stiel sitzt. Möglicherweise repräsentiert Fractalkin eine eigene zusätzliche Familie [Luster, 1998]. Die alpha Chemokine, die die Sequenz Glutaminsäure-Leuzin-Arginin, gefolgt von der CXC Sequenz, besitzen, wirken auf Neutrophile chemotaktisch. Chemokine, die diese Sequenz nicht besitzen, wirken auf Lymphozyten chemotaktisch.

Bisher wurden 4 humane CXC Chemokin-Rezeptoren (CXCR1 bis CXCR4), 8 humane CC Chemokin-Rezeptoren (CCR1 bis CCR8) und ein humaner CXXXC Chemokin-Rezeptor (CX<sub>3</sub>CR1) identifiziert.

Im Allgemeinen wirken beta Chemokine nicht auf Granulozyten, ziehen aber Monozyten, Eosinophile, Basophile und Lymphozyten mit variabler Selektivität an. Strukturell werden die beta Chemokine wiederum in 2 Familien unterschieden: zum einen die Monozyten-Chemoattrahierenden-Protein-Eotaxin Familie, die aus 5 Monozyten chemoattrahierenden Proteinen und Eotaxin besteht, gegenüber allen anderen beta Chemokinen [Luster, 1998].

Erwähnenswert ist, dass Individuen mit bestimmten Mutationen an den Chemokin-Rezeptoren teilweise oder gänzlich gegen HIV resistent sind. Chemokinrezeptor-Antagonisten könnten also in der AIDS-Behandlung künftig eine wichtige Rolle spielen. Des weiteren könnten Chemokine und Chemokinrezeptor-Antagonisten auch durch Hemmung von allergischen und septischen Prozessen oder des Immunsystems von therapeutischem Nutzen sein. In Kombination mit anderen Zytokinen könnten Chemokine sehr effektiv in der Antitumorthherapie und bei der Behandlung von Infektionen sein.

MCP-1, ein Homolog eines bei der Maus beschriebenen Chemokins, reguliert die Chemotaxis und Aktivierung von Monozyten [Matsushima et al., 1989]. Das Molekulargewicht variiert aufgrund posttranslationaler Modifizierungen zwischen 13 und 15 kDa [Ishii et al., 1995].

MCP-1 ist eines der wichtigsten Monozyten-Chemoattraktanzien, die von Tumorzellen in vitro oder entzündlichem Gewebe in vivo, wie Knorpel [Villiger et al. 1992], Thymus [Liu et al., 1996] und Myokard produziert wird. In der Literatur lassen sich Isoformen mit einer Größe von 9 kDa und 13 kDa durch Lektinbindungen unterscheiden, wobei Glykosilierungen der 13 kDa MCP-1 Isoformen keinen Unterschied ihrer antigenen

Eigenschaften zeigen und sich somit nicht auf die Kapazität, die Monozytenmigration zu induzieren, auswirken. Des Weiteren sind glykosilierte MCP-1 Formen in einer Größe von 30 kDa bekannt, die eine geringere spezifische chemoataktische Aktivität (für Lymphozyten als auch Makrophagen) besitzen als die unglykosilierten 6-7 kDa MCP-1 Formen [Liu et al., 1996]. MCP-1 bewirkt an Monozyten u. a. die Expression von Adhäsionsmolekülen, die Stimulation der Interleukine (IL) 6 und 8, die Sekretion und Steigerung des Kalziumeinstromes [Rollins et al., 1991].

Während der UUO werden durch die Niere eine Vielzahl von Chemoattraktanzien produziert [Rovin et al., 1990].

Erste Untersuchungen legen nahe, dass der PPAR-gamma Ligand, Troglitazon, die glomeruläre Expression von MCP-1 steigert [Panzer et al., 1999]. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass bestimmte PPAR-gamma Liganden das Fortschreiten entzündlicher Veränderungen in den Nierenglomeruli eher fördern als unterbinden. Sollte dies der Fall sein, könnten PPAR-gamma Antagonisten einen therapeutischen Einsatz bei renalen inflammatorischen Krankheiten rechtfertigen.

## 1.7 Ziele der Arbeit

Die interstitielle Nierenfibrose stellt neben den glomerulären Veränderungen die häufigste Ursache einer terminalen, dialysepflichtigen Niereninsuffizienz dar. Sie tritt im Verlauf verschiedener glomerulärer Erkrankungen auf und ist ein entscheidender Pathogenitäts- und Prognosefaktor in der Entwicklung der Niereninsuffizienz.

Die Pathogenese der zur interstitiellen Nierenfibrose führenden Prozesse ist bisher nicht ausreichend erforscht. Kausal wirkende Behandlungsmethoden fehlen deshalb. Ein Fortschreiten der Fibrosierung konnte bislang nur verzögert, nicht verhindert werden. Substanzen, die die Herausbildung einer interstitiellen Nierenfibrose im Tiermodell verhindern bzw. verzögern, könnten auch beim Menschen erfolgreich eingesetzt werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, am Modell der unilateralen Ureterligatur den Einfluss der Glitazone sowohl auf die akute Phase der Entzündung als auch auf die Fibrogenese und Herausbildung einer interstitiellen Nierenfibrose zu untersuchen.

Dazu werden bei Versuchstieren über unterschiedlich lange Zeiträume eine komplette einseitige Ureterligatur angelegt und der Einfluss zweier unterschiedlicher Dosierungen des PPAR-gamma-Agonisten Rosiglitazon untersucht. Die erhobenen Parameter werden denen scheinoperierter mit bzw. ohne Rosiglitazon behandelte Ratten gegenübergestellt.

Des Weiteren soll der Einfluss der jeweiligen Therapieformen auf den Blutdruck, das Urinvolumen und den Blutzuckerwert untersucht werden. Zur Abschätzung des Einflusses der Therapie auf das Ausmaß der Fibrosierung erfolgt die Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes. Pathogenetische Prozesse werden anhand der PPAR-gamma-Expression, der p27<sup>Kip1</sup>-Expression sowie der Messung des Chemokins MCP-1 analysiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tierversuch

Untersucht wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 120 bis 200g. Insgesamt 100 Tiere waren in die Versuche einbezogen. Sie wurden in 18 Gruppen zu je 5 bis 7 Tieren eingeteilt. Die Gliederung der Gruppen nach Art der Operation, der Pharmakotherapie und der Zeitspanne zwischen Operation und Organentnahme stellt Tabelle 1 dar.

Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen, d. h. bei einer Raumtemperatur von 25 °C in einem Licht-Dunkel-Zyklus von jeweils 12 Stunden. Die Ernährung bestand aus Trockenpellets (Altromin, Lage) sowie Wasser ad libitum.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung in Abhängigkeit von Scheinoperation bzw. unilateraler Ureterligatur und Medikation (Placebo, Rosi [mg Rosiglitazon/kg KG]) sowie Dauer der UUO

	Keine UUO			UUO		
	3 Tage	8 Tage	25 Tage	3 Tage	8 Tage	25 Tage
<b>Placebo</b>	Gr. 1	Gr. 7	Gr. 13	Gr. 3	Gr. 9	Gr. 15
<b>0,5 Rosi</b>	Gr. 2	Gr. 8	Gr. 14	Gr. 4	Gr. 10	Gr. 16
<b>10 Rosi</b>	Gr. 5	Gr. 11	Gr. 17	Gr. 6	Gr. 12	Gr. 18

#### 2.1.1 Therapie der Versuchstiere

Beginnend drei Tage vor dem Operationstermin zur Anlage der unilateralen Ureterligatur bzw. der Scheinoperation bis zur Organentnahme erhielten die Tiere Normalfutter ohne oder mit 0,5 bzw. 10 mg Rosiglitazon/kg KG täglich. Rosiglitazontabletten waren zuvor mittels eines Mörsers in Pulverform überführt und durch die herstellende Firma in die Futterpellets eingearbeitet worden. Bei der Berechnung der Rosiglitazondosis wurde von einer Nahrungsaufnahme von durchschnittlich 12–15 g pro Tag ausgegangen.

### 2.2 Durchführung des Tierversuchs

Alle operativen Eingriffe erfolgten mit herkömmlichen chirurgischen Instrumenten unter sterilen Bedingungen im Institut für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller-

Universität Jena. Die Tierversuche wurden unter dem Zeichen 112.43-2684-04-02-22/01 am 22.11.2001, aufgrund der Stellungnahme der beratenden Kommission nach § 15 Abs. 1 Tierschutzgesetz vom 15.10.2001, genehmigt (§ 8 Abs. 1 Tierschutzgesetz). Das Thema des Antrages lautet: „Einfluss der Glitazone und des Angiotensin-Systems auf die Phase der akuten Entzündung sowie der Fibrogenese bei der Herausbildung einer interstitiellen Nierenfibrose im Modell der unilateralen Ureterligatur - Untersuchungen zum Einsatz antifibrotisch wirksamer Substanzen bei chronischen Nierenerkrankungen“. Die genehmigende Behörde ist das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, dieses vollzog das Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 25.05.1998 (BGBl. I Nr. 30 vom 29.05.98 S. 1105, 1818).

#### **2.2.1.1 Narkose**

Für die Anästhesie kamen Inhalationsnarkotika zur Anwendung. Zunächst erfolgte die Betäubung mittels Diäthyläther in einem abgeschlossenen Kunststoffbehälter. Über eine Maul und Nase umschließende Maske wurde die Narkose mit Isofluran aufrecht erhalten. Isofluran war zuvor in seiner analgetischen Wirkung durch Lachgas verstärkt und mit Sauerstoff kombiniert worden.

Auf diese Weise wurden die Ratten sowohl zur Anlage der Ureterligatur und der Scheinoperation, als auch zum Blutdruckmessen mittels Schwanzplethysmographie und der Entnahme der Organe betäubt.

#### **2.2.1.2 Unilaterale Ureterligatur**

Nach Eröffnung des Retroperitonealraumes durch eine dorsale Subcostalinzision links wurde der Ureter freipräpariert und zwischen zwei hilusnahen Ligaturen durchtrennt. Der Verschluss der abdominalen Wand erfolgte in zwei Schichten mit separaten Nähten. Die tiefere Muskelnäht war dabei nach Kürschner fortlaufend, für die oberflächliche Hautnäht kamen Einzelknopfnähte zur Anwendung.

Die Tiere tolerierten den Eingriff ohne Komplikationen. Keine der Ratten starb oder zeigte eine Wund- oder systemische Infektion. Futter- und Sozialverhalten änderten sich nicht.

#### **2.2.1.3 Scheinoperation**

Bei den Kontrolltieren wurde die linke Niere freigelegt, der Ureter mit einem stumpfen Instrument manipuliert, jedoch nicht ligiert und anschließend die Schnittwunde verschlossen.

#### **2.2.1.4 Organentnahme**

Zur Entnahme der Organe wurde am narkotisierten Tier ein Medianschnitt angelegt, mit einer feinen Kanüle das Herz punktiert und Blut zur Untersuchung der Nierenretentionswerte, der Plasma-Renin-Aktivität und der Angiotensin-Spiegel entnommen. Danach wurden die Nieren präpariert und entnommen, für weitere Untersuchungen geteilt und aufgearbeitet.

#### **2.2.2 Messung des Blutdrucks**

Die Messung des Blutdrucks geschah mittels Schwanzplethysmographie am narkotisierten Tier. Mindestens 4 Messungen pro Tier folgten aufeinander, um einen Mittelwert zu bilden.

#### **2.2.3 Messung des Blutzuckers**

Die Blutzuckermessung erfolgte direkt vor Organentnahme mit einem herkömmlichen Messgerät „one touch profile“ [LifeScan, Johnson & Johnson, Neckargemünd, Deutschland].

#### **2.2.4 Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität**

Die Plasma-Renin-Aktivität wurde mittels eines Angiotensin-I-Radioimmunoassays [SORIN Biomedica, Saluggia, Italien] ermittelt.

#### **2.2.5 Anfertigen des Zelllysats**

Die Nieren wurden in einem Mörsergefäß mit flüssigem Stickstoff übergossen und zermahlen. Nach der Beimengung des Lysispuffers in einem Potter S der Firma Braun, Deutschland, entstand aus dem Pulver ein dickflüssiges Zelllysats.

#### **2.2.6 Quantitative Proteinbestimmung**

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte nach dem Mikroplatte Assay Protokoll, einer abgewandelten Lowry-Methode [Lowry et al., 1951].

Folgendes Mikroplatte Assay Protokoll wurde angewandt:(siehe Gebrauchsinformation der Firma Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547, USA)

- 1.) Zugabe von 20 µl des Reagenz S zu jedem gebrauchten ml Reagenz A ; ergibt A`
- 2.) Herstellung der Standardverdünnungsreihe
- 3.) Pipettieren von 5µl des Standards oder der Probe
- 4.) Pipettieren von 25 µl A` in jedes well
- 5.) Hinzufügen von 200 µl Reagenz B in jedes well

Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln und 15 min warten

Die gemessene Extinktion mehrerer Proben bekannter Proteinkonzentration wurde als Funktion der Proteinkonzentration graphisch dargestellt und der molare Extinktionskoeffizient aus dem Anstieg der resultierenden Geraden ermittelt. Unter Verwendung des so erhaltenen molaren Extinktionskoeffizienten lässt sich für eine beliebige Proteinprobe die Konzentration bestimmen.

## 2.3 Western-Blotting

Die Proteine des Zellysats wurden mittels Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS-PAGE) getrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Die Membran wurde dann mit einem primären Antikörper inkubiert (z.B. Anti-p27<sup>Kip1</sup>, monoklonaler Mausantikörper). Ein Sekundärantikörper gegen das speziesspezifische Fc-Fragment des primären Antikörpers, welcher mit Peroxidase gekoppelt war, ermöglichte eine Nachweisreaktion, so dass das Protein aus dem Lysat auf der Blotmembran lokalisiert und später densitometrisch quantifiziert werden konnte.

### 2.3.1 Chemikalien

Acrylamid 30%	[SERVA, Heidelberg, Deutschland]
Ammonium peroxydisulfat (APS)	[Sigma, St. Louis, MO, USA]
Anti-Kip1/p27 mAb Concentration 250 µg/ml	[Transduction Laboratories, USA]
Anti-mouse IgG:HRP	[Transduction Laboratories, USA]
Bromphenolblau	[Merck, Darmstadt, Deutschland]
Coomassie Brilliant Blue	[SERVA, Heidelberg, Deutschland]
1,4-Dithiotreit (DDT)	[Roth, Karlsruhe, Deutschland]
ECL (enhanced chemiluminescence)	[amersham pharmacia biotech, Buckinghamshire, England]
Essigsäure	[Merck, Deutschland]
Full range Rainbow recombinant protein molecular weight markers RPN 756	[Amersham, USA]
Glycerol	[Merck, Darmstadt, Deutschland]
Glycin	[Merck, Darmstadt, Deutschland]
Magermilchpulver	[Saliter, England]
2-Mercaptoäthanol (Thioäthylenglykol)	[FERAK, Berlin, Deutschland]
Methanol	[Merck, Darmstadt, Deutschland]
Natriumchlorid	[Merck, Darmstadt, Deutschland]
Natriumhydrogenphosphat Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	[Riedel de Haen, Seelze, Deutschland]
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	[Sigma, Deutschland]
purified Anti-rat MCP-1	[Transduction Laboratories, USA]

Rainbow coloured protein molecular weight markers RPN 756

[Amersham, USA]

Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)

[Pharmacia Biotech, USA]

TEMED (N,N,N',N' Tetramethylethylenediamin) [SERVA, Heidelberg, Deutschland]

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) [SERVA, Heidelberg, Deutschland]

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris)

[SERVA, Heidelberg, Deutschland]

Tween 20 %

[SERVA, Heidelberg, Deutschland]

### **2.3.2 Puffer und Substratlösungen**

#### Lysispuffer

125 mM Tris-HCl (pH 6,8) + 2 % SDS, 5 % Glycerol, 0,1 M DTT

#### 5 % Acrylamid-Sammelgel (für 2 Gelplatten)

2,5 ml Acrylamid 30 % + 3,6 ml 0,5 M Tris (pH 6,8) + 8,5 ml aqua bidest. + 150 µl  
SDS 10 % + 150 µl APS 10 % + 20 µl TEMED

#### 12 % Acrylamid-Trenngel (für 2 Gelplatten)

18 ml Acrylamid 30 % + 11,25 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) + 14,25 ml aqua bidest. + 450 µl  
SDS 10 % + 450 µl APS 10 % + 30 µl TEMED

10 % APS = 0,1 g Ammoniumpersulfat /1 ml H<sub>2</sub>O [wöchentlich neu angesetzt]

#### Blockpuffer (5 %)

5 g Trockenmagermilch in 100 ml PBS (0,1 %)

#### Blotpuffer

25 mM (3,079 g) Tris + 0,2 M (15,014 g) Glycin + 200 ml (20 %) Methanol  
ad 1000 ml aqua bidest.

#### Bromphenolblau-Färberlösung

42,5 % Glycerol + 0,5 % Bromphenolblau + 0,5 % Xylencyanol

### Coomassie-Färberlösung

45 % Methanol, 9 % Essigsäure, 1 % Coomassie Brilliant Blue

### Coomassie-Entfärberlösung

10 % Essigsäure, 30 % Methanol, 60 % aqua bidest.

### Laemmli I

33 % 0,5 M Tris (pH 6,8) + 66 % SDS

### Laemmli II

50 % Mercaptoethanol + 50 % Glycerol

### PAGE Puffer (10x)

60 g Tris + 100 g Glycin + 10 g SDS ad 1000 ml aqua bidest.

### Phosphatpuffer (PBS) Waschlösung (10x)

71,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  + 13,9 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  + 58,4 g NaCl

### PBS Waschlösung (1x)

250 ml 10 x PBS Waschlösung + 2250 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest. + 2,5 ml Tween 20 %

## **2.3.3 SDS-PAGE**

Die Herstellung der Trenn-(12 % Acrylamid) und Sammelgele (5 % Acrylamid) erfolgte nach folgendermaßen:

- auffüllen von 2/3 der Kammer mit Trenngellösung
- beschichten mit Aqua dest. zur Begradigung der Trennlinie
- nach Polymerisation des Trenngels abgießen des Aqua dest.
- füllen des letzten Drittels der Kammer mit Sammelgellösung und einbringen eines Kammes
- entfernen des Kammes nach dem Polymerisieren des Sammelgels

Die Taschenzahl richtete sich nach verwendetem Kamm. Die Zusammensetzung der Gele sind dem Abschnitt 2.3.2 zu entnehmen, wobei Maßangaben für zwei Gele gelten.

Die Elektrophoreseapparatur, bestehend aus den zwei Kammern, einem Träger und einer Wanne, wurde montiert, mit 1 x PAGE befüllt und die Geltaschen mit den vorbereiteten Proben gefüllt.

### **Proben**

Abhängig von der quantitativen Proteinbestimmung wurden die Proben mit Laemmli I auf ein Volumen von 15 µl verdünnt, um sie dann mit einem Drittel (hier 5 µl) Laemmli II zu versetzen und ein weiteres Drittel (5 µl) der Färbelösung hinzuzugeben. Nach kurzem zentrifugieren, erhitzen bis zum Siedepunkt und erneut zentrifugieren, konnten die Proben aufgetragen werden.

Die Trennung der Proteine erfolgte über eine Zeit von 150 Minuten bei 250 V. Kurz bevor die Indikatorfront das untere Ende des Gels erreichte, wurde die Stromzufuhr unterbrochen und das Gel vorsichtig entnommen.

### **2.3.4 Proteinblotting**

Zum Blotten wurden nach Sandwich-Art auf der Gitterelektrode übereinandergeschichtet:

oben	Deckel
	3 Lagen Filterpapier [Whatman]
	Nitrozellulosemembran* [High-bond-N, Amersham, USA]
	Gel
	3 Lagen Filterpapier [Whatman]
unten	Gitterelektrode

\*Nitrozellulosemembran auf Gelgröße zurechtschneiden, dann spülen (10 sec in Methanol, 5 min in H<sub>2</sub>O, 10 min in Blotpuffer).

Nach Hinzufügen des Blotpuffers und Entfernung der Luftblasen, Blotten der Proteine über 90 Minuten bei 40 V vom Gel auf die Nitrozellulosemembran.

### **2.3.5 Immunreaktion**

Bevor die Proteinblots einer spezifischen Nachweisreaktion ausgesetzt werden, müssen alle freien, unspezifischen Proteinbindungsstellen der Blotmembran mit indifferentem

Protein (Blockpuffer: 5 % Magermilch/PBS Lösung) für 30 Minuten abgesättigt sein. Der Blockpuffer wird entfernt und die Membran in 10 ml Blockpuffer mit darin enthaltenem primärem Antikörper inkubiert. Nachdem die Membran 60 Minuten (oder auch über Nacht) bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert, begann der 25 minütige Waschvorgang in einer einfach konzentrierten PBS-Waschlösung (wechseln der Waschlösung nach 15 und 20 Minuten). Anschließend wurde die Membran wiederum in 10 ml Magermilchlösung und einem sekundären Antikörper inkubiert und anschließend nach bereits beschriebener Methode gewaschen.

Zur Lokalisation des Peroxidase gekoppelten Sekundär-Antikörpers wurde die ECL (enhanced chemiluminescence)-Methode benutzt [Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England]. Dazu tropft die Membran kurz ab und kommt für 1 Minute in 5 ml ECL Lösung, die kurz vorher zu gleichen Teilen aus den Lösungen I und II der kommerziellen ECL-Lösungen hergestellt wurde. Danach wurde die Membran in Haushaltsfrischhaltefolie gewickelt, in eine Röntgenfilmkassette gelegt und in einer Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm bedeckt. Nach variablen Expositionszeiten erfolgte die maschinelle Entwicklung des Filmes.

Die Western Blots für MCP-1 und p27 wurden mit qualitativ ähnlichen Ergebnissen pro Gruppe dreimal wiederholt. Zur Quantifizierung der Banden wurden die Röntgenfilme gescannt und mit einem kommerziellem Computerprogramm densitometriert.

### **2.3.6 Färbung der Proteine**

Um die gleichmäßige Proteinbeladung zu überprüfen, wurden die transferierten Proteine mit Hilfe des Farbstoffs Coomassieblau zur Sichtbarmachung angefärbt (Abbildung 5). Dazu wurden gewaschene und getrocknete Membranen verwendet und zunächst für etwa 10 Minuten in die Coomassie-Färbelösung und danach in eine Entfärberlösung gelegt. Diese Lösung musste mehrfach gewechselt werden, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Die Färbemethode ist unspezifisch und deshalb können verschiedene Proteine verschieden angefärbt werden. Aus dem Ausmaß der Färbung ist nur näherungsweise auf die Proteinmenge zu schließen. Als halbquantitative Methode ist diese Abschätzung aber allgemein akzeptiert. Das Entfärben dient dazu, die Membrananteile, in denen kein Protein vorliegt, farbstofffrei zu waschen, so dass nach dem Entfärben nur die Proteine als gefärbte Banden zu erkennen sind.

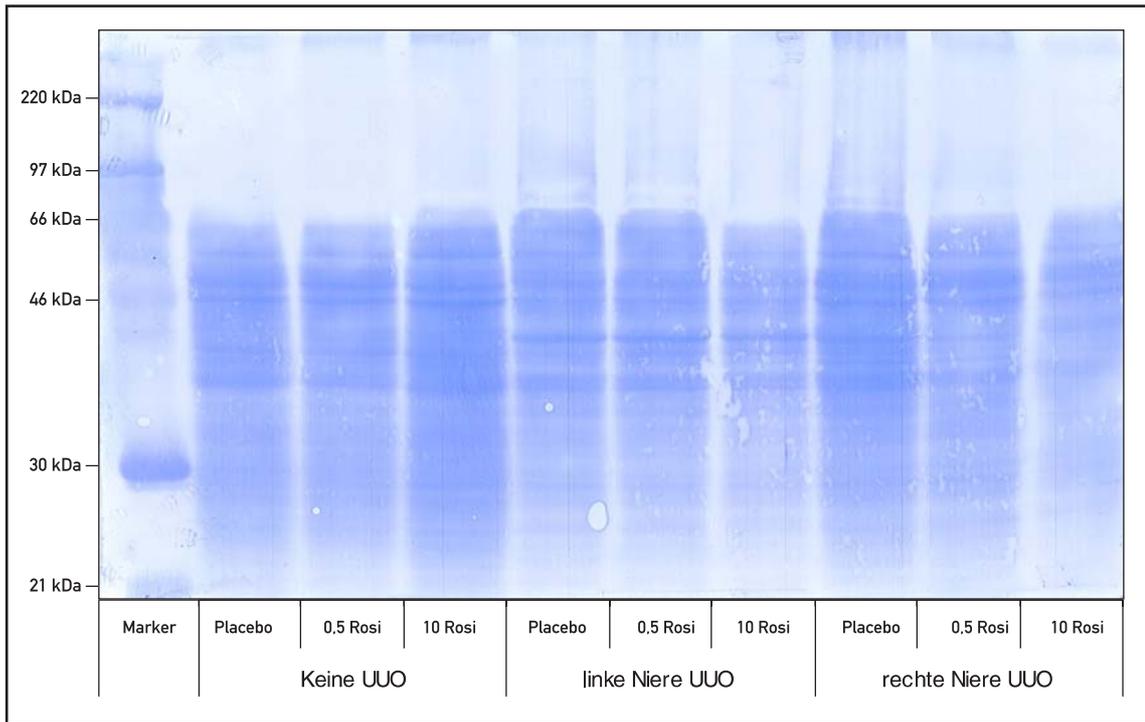


Abbildung 5: Coomassie-Blue Färbung eines Western-Blots zur Demonstration einer gleichmäßigen Proteinbeladung der einzelnen Bahnen

## 2.4 Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes

### 2.4.1 Chemikalien

Methanol und Wasser (HPLC Qualität)	[Merck, Deutschland]
Essigsäure	[Merck, Deutschland]
Borsäure	[Merck, Deutschland]
7-Chloro-4-Nitrobenzofurazan (NBD-CL)	[Merck, Deutschland]
3,4-Dehydroprolin (Interner Standard)	[Merck, Deutschland]
Dinatriumhydrogenphosphat	[Merck, Deutschland]
Dowex 50 WX 8	[Merck, Deutschland]
Natriumacetat	[Merck, Deutschland]
RP-18 Säule (Purospher 5 µm)	[Merck, Deutschland]
Trinatriumcitrat-Dihydrat	[Merck, Deutschland]
Zitronensäure	[Merck, Deutschland]

### 2.4.2 Pufferlösungen und Standards für die Hydroxyprolinbestimmung

#### Interner Standard

8 mg 3,4-Dehydroprolin in 100 ml aqua bidest. gelöst (C ~ 708 µmol/l)

#### Phosphat-Zitronensäurepuffer

pH 5,0; hergestellt aus 0,2 mol Dinatriummonohydrogenphosphat und 0,1 mol Zitronensäure in aqua bidest.

#### Acetat-Zitronensäure-Citrat-Puffer

pH 6,0; hergestellt durch Lösen von 58,7 g Trinatriumcitrat-Dihydrat, 57,1 g Natriumacetat trihydrat (34,4 g Natriumacetat wasserfrei) und 5,5 g Zitronensäure in 800 ml aqua bidest.

#### Extraktionspuffer

80 % v/v Methanol (HPLC) + 20 % Acetatpuffer

### Acetatpuffer

50 mM Natriumacetat pH 7,0; hergestellt aus: 6,005 g = 5,72 ml Essigsäure (reinst) gelöst in 1.950 ml aqua bidest. (HPLC), pH-Adjustierung mit NaOH (ca. 15–16 ml 6n NaOH-Lösung), auffüllen auf 2 l

### Boratpuffer

3,09 g Borsäure + 80 ml aqua bidest. mit NaOH auf pH 9,5 bringen; Boratlösung hat dann eine Konzentration von 0,5 mol/l

### o-Phthalaldehydreagens

200 mg o-Phthalaldehyd in 18 ml Methanol und 2 ml Boratpuffer

### 7-Chloro-4-Nitrobenzofurazanreagenz

200 mg 7-Chloro-4-Nitrobenzofurazan in 20 ml Methanol

### HCl

es wird 2N HCl in das 20 ml Gefäß gefüllt

### Standards

100, 300, 500  $\mu\text{mol/l}$  Hydroxyprolin gelöst in aqua bidest.; diese werden aus einer entsprechenden Stocklösung hergestellt (Hydroxyprolin 13,133 mg in 100 ml aqua bidest. = 1 mmol/l)

### Laufmittel

A: 78 % Acetatpuffer + 22 % Methanol

B: 75 % Methanol + 25 % Acetatpuffer (Acetatpuffer vor Mischung filtrieren)

C: Methanol

Waschlösung = Eluent A

## **2.4.3 Probenvorbereitung von Nierengewebe zur Hydroxyprolinbestimmung mittels HPLC**

- tiefgefrorenes Gewebe in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Mörsergefäß zerkleinern

- bis zur völligen Trockene 24h – 48h gefriertrocknen und auswiegen
- 10 mg in 15-ml-Zentrifugenglas einwiegen
- 1 ml 6M HCl zugeben und 24 Stunden bei 114 °C hydrolysieren
- 200 mg Dowex W-X8(H<sup>+</sup>)-Harz [Merck, Deutschland] in einem braunen Reagenzglas mit Schraubverschluss (Teflon) vorlegen
- 500 µl des Überstandes bzw. 250 µl Standardlösung und jeweils 250 µl internen Standard zugeben
- Probe mit 1,5 ml Phosphat-Zitronensäure-Puffer versetzen
- Probe anschließend 10 min. bei 1.000 rpm schütteln
- 5 min bei 5.000 rpm zentrifugieren und Überstand absaugen (mittels Pasteurpipette und Wasserstrahlpumpe)
- Harz in 6 ml Wasser aufnehmen, gut mischen (Vortex-Schüttler) und wiederum bei 5.000 rpm zentrifugieren
- Überstand so quantitativ wie möglich abziehen und das verschlossene Reagenzglas 16 Stunden bei 115°C erhitzen (Heizblock)
- nach Abkühlen mit 1 ml Acetat-Zitrat-Zitronensäure-Puffer versetzen, mit Vortex-Schüttler kurz aufmischen und anschließend 10 min bei 1000 rpm schütteln
- 5 min bei 5.000 rpm zentrifugieren
- 400 µl des Überstandes als Probe abnehmen und mit 600 µl Extraktionspuffer verdünnen (in den Vials für HPLC)

#### **2.4.4 Fluoreszenz-HPLC**

Es handelt sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem durch hohe Drücke bzw. hohe Flussraten des Elutionssmittels große Trenngeschwindigkeiten erreicht werden (HPLC = high pressure liquid chromatography = Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie). Üblicherweise geht der Trennsäule eine Vorsäule (precolumn) voraus, die zur Abhaltung von Verunreinigungen dient.

Je nach Stärke der Wechselwirkungen zwischen der zu untersuchenden Substanz und der stationären Phase erscheinen die Bestandteile der Substanz zu verschiedenen Zeiten (den „Retentionszeiten“) am Ende der Trennsäule, wo sie dann mit einem Detektor nachgewiesen werden können.

Es werden zwei Methoden unterschieden: Normal Phase (NP) und Reversed Phase (RP). Bei der NP-HPLC wird eine polare stationäre Phase (z.B. Silicagel/Kieselgel) genutzt.

Die RP-HPLC ist in der Praxis die gängigste Methode. 70 Prozent aller analytischen HPLC-Trennungen sind RP-Trennungen. Hier wird eine unpolare stationäre Phase verwendet und die Elutionskraft sinkt mit steigender Polarität. Die stationäre Phase wird hergestellt, indem man Silane welche mit langkettigen Kohlenwasserstoffen substituiert wurden, mit Silicagel reagieren lässt. Dabei wird die polare Oberfläche der Silicagel-Partikel mit einer unpolaren Schicht aus Alkanen überzogen, also die Polarität umgekehrt (engl.: „reversed“). Als mobile Phase werden meist Mischungen aus Wasser oder Puffer und Acetonitril, Tetrahydrofuran (THF) oder Methanol eingesetzt.

Die Verwendung von sehr kleinen Gelpartikeln (3–10 µm) und von verschiedenartigen Elutionsgradienten führt zu verbesserter Auflösung und besserer Trennleistung der Säulen (HPLC = high performance liquid chromatography = Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie).

Besondere Anwendung findet die RP-HPLC bei der Auftrennung von polaren Analyten die auf Normalphasen zu hohe Retentionszeiten aufweisen würden. Dafür wird eine C18-Säule (also ein Octadecylsilan als Derivatisierungsreagenz für das Silicagel) eingesetzt, die Detektion erfolgt mittels UV- oder Fluoreszenzdetektor [wikipedia.org].

### **Die Fluoreszenzderivatisierung**

Durch die Umsetzung mit hydrophoben Fluorophoren werden hydrophile Aminosäuren in hydrophobe Derivate umgewandelt, die an hydrophoben Umkehrphasen bei Verwendung wässriger Eluenten mit unterschiedlicher Retentionszeit zurückgehalten werden. Durch Zusatz organischer mit wässrigen Phasen mischbarer Lösungsmittel können die Retentionszeiten verkürzt werden. Die Größe der Retention eines Derivates nimmt mit abnehmender Polarität des Eluenten ab. Da bei Umsetzung eines Aminosäuregemisches der Fluorophor für alle Aminosäurederivate gleich ist, sind die Aminosäurereste ausschlaggebend für die Trennung der Derivate. Eine Trennung wird also um so effektiver erfolgen, je stärker der Aminosäurerest im Verhältnis zum Fluorophorteil zur Geltung kommt. Unter diesem Gesichtspunkt sind die Derivate der Umsetzung mit o-Phthalaldehyd vor den anderen Fluoreszenzderivaten begünstigt. O-Phthalaldehyd reagiert jedoch nur mit primären Aminen und Aminosäuren, so dass z.B.

Prolin und Hydroxyprolin nicht erfasst werden. Eine elegante Methode zur Lösung dieses Problems haben C.A. Palmerini und Mitarbeiter vorgeschlagen, in dem sie alle primären Aminosäuren mit o-Phthalaldehyd ohne Zusatz von Reduktionsmitteln (Mercaptoethanol) umsetzen. Dabei entstehen nicht fluoreszierende Derivate. Dies entspricht einer „Vortrennung“.

Anschließend setzen sie Prolin und Hydroxyprolin mit NBD-Cl (7-Chlor-4-Nitrobenzofurazan) zu ihren Fluoreszenzderivaten um, die sie nun getrennt von allen anderen Aminosäuren bestimmen können. Die Bestimmung des gesamten Aminosäuregemisches durch Umsetzung mit NBD-Cl ist nicht empfehlenswert, da die Trennung der NBD-Derivate nicht so effektiv ist wie die der o-Phthalaldehyd-Derivate.

### **Die Eluenten**

In der Aminosäure- HPLC konkurrieren heute besonders zwei Eluenten Systeme: Gradienten aus Acetonitril und wässrigen Phosphatpuffern pH 7,2 [Ahnoff et al., 1981; Krishnamurti et al., 1984; Palmerini et al., 1985] bzw. Gradienten aus Methanol und wässrigen Acetatpuffern pH 7,0 [Lenda and Svenneby, 1980; Döhler und Zink, 1983]. Auch Kombinationen aus Methanol und wässrigen Phosphatpuffern pH 7,4 wurden eingesetzt [Watanabe et al., 1982; Ali-Qureshi et al., 1984]. Das Arbeiten mit wässrigen Phosphatlösungen in der HPLC kann gelegentlich zur Ausfällung von Phosphatkristallen im Hochdruckpumpensystem führen mit der Folge mühsamer Reinigungsprozedur. Acetonitril ist als organisches Lösungsmittel toxischer als Methanol. Unsere Trennmethode wurde daher mit dem Methanol/Acetatpuffer-System optimiert.

#### **2.4.5 Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes mittels Fluoreszenz-HPLC**

Die quantitative Bestimmung der Aminosäure Hydroxyprolin erfolgte durch Derivatisierung mit NBD-Cl Purospher RP 18 und HPLC-Trennung an hydrophober Umkehrphase.

Zunächst wurden die vorbehandelten Nierengewebeproben über Nacht (16 Stunden) einer mittels saurem Harz katalysierten Hydrolyse unterzogen. Probleme bei der Lagerung von Aminosäureproben konnten durch Gefriertrocknung der Proben behoben werden, wodurch zugleich eine verbesserte Extraktion der Aminosäuren aus der

Probenmatrix erreicht wurde. Für eine höhere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde ein interner Standard genutzt.

Mittels der hochsensitiven Fluoreszenzdetektion (Anregung 470 nm, Emission 530 nm) wurde Hydroxyprolin durch Umkehrphasen (RP)-Chromatographie und Gradiententrennung auf einer RP 18 Säule gemessen. Die modifizierte HPLC-Methode schließt eine vollautomatische Vorsäulenderivatisierung mit NBD-Cl (7-Chlor-4-Nitrobenzofurazan) ein. Prolin und Hydroxyprolin, die mit o-Phthalaldehyd nicht reagieren, können getrennt von anderen Aminosäuren durch Umsetzung mit NBD-Cl bestimmt werden.

Die Probe wurde sofort nach dem Derivatisierungsschritt analysiert. Das Injektionsvolumen für die HPLC betrug 40 µl.

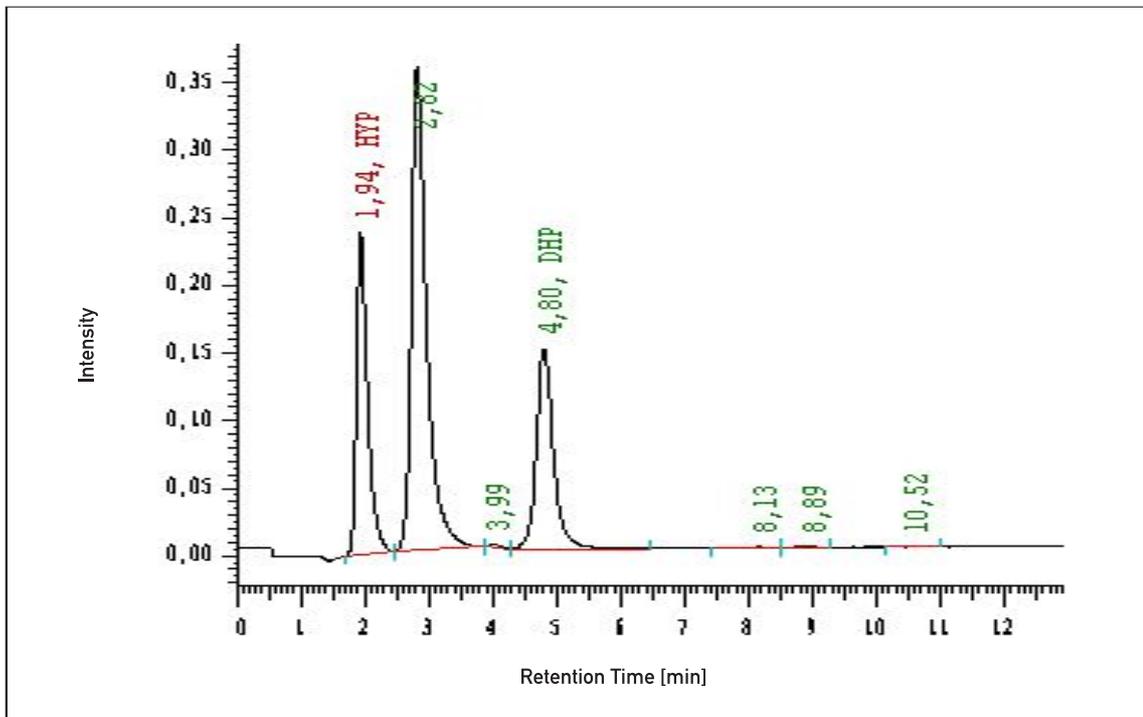


Abbildung 6: Darstellung der Retentionszeiten mittels HPLC

## 2.5 Polymerase Chain Reaction

Die quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR) ist ein Verfahren zur Bestimmung der Genosis oder der Genexpression und ist für quantitative Messungen prädestiniert.

### 2.5.1 Chemikalien

Agarose	[SIGMA, Deutschland]
Borsäure	[Roth, Deutschland]
Chloroform	[SIGMA, Deutschland]
EDTA	[SIGMA, Deutschland]
75 %iges Ethanol	[SIGMA, Deutschland]
Ethidiumbromid	[SIGMA, Deutschland]
Isopropanol	[SIGMA, Deutschland]
Tris Base	[Roth, Deutschland]
TRIZol Reagenz	[Invitrogen, Paisley, Schottland]

### 2.5.2 Ansätze

#### 10xTris-Borat-EDTA (TBE)

108 g Tris Base + 55g Borsäure + 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (= 0,5 EDTA mit 10 NaOH einstellen – ca. 25 ml für 0,5 l)

#### 0,5xTBE (Laufpuffer für Elektrophorese)

50 ml 10 x TBE + 950 ml Bidest. + 40 µl Ethidiumbromid

#### Gel für Bio-Rad Kammer (1,5 % Agarosegel)

1,8 g Argarose + 114 ml aqua bidest. + 6 ml 10 x TBE + 5 µl Ethidiumbromid

### 2.5.3 RNA-Extraktion aus Gewebe

Aus dem mit flüssigen Stickstoff übergossenen und in einem Mörsergefäß zermahlenden Nierengewebe entstand mittels eines Potters [Braun, Deutschland] ein dickflüssiges Zellysat. Die RNA wurde durch TRIZol Reagenz [Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland] extrahiert.

Dieses Gemisch wurde nach folgendem Schema behandelt:

- Proben 5 min auf Eis inkubieren
- pro 1 ml TRIZol 0,2 ml Chloroform
- 15 s schütteln

- 3 min auf Eis inkubieren
- 15 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugieren
- obere wässrige Phase abnehmen
- Verhältnis 1:1 Isopropanol hinzugeben
- mind. 1 h bei –20 °C inkubieren
- 10 min bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugieren
- 2 x waschen mit 75 %igem Ethanol (1,5 ml/Tube)
- 10 min bei 8.000 rpm zentrifugieren
- 10 min lufttrocknen des RNA-Pellet
- lösen in Diethylpyrocarbonat behandeltem Wasser

Durch Messen der Absorbanz bei 260 nm und 280 nm erfolgte die photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes der Probe mit einem (Ultrospec 4.300 pro UV/Visible) Spektrometer [Amersham Pharmacia Biotec, USA].

1 µg der RNA wurde mit Hilfe eines Kits für die umgekehrte Transkription [Promega, Madison, WI, USA] in c-DNA umgeschrieben. Nach Herstellerangaben sind durch Inkubation mit [<sup>3</sup>H]-RNA und [<sup>3</sup>H]- DNA für eine Stunde bei 45°C alle Inhaltstoffe frei von kontaminierenden Nukleasen.

#### **2.5.4 Konstruktion des Kompetitors**

Für die kompetitive PCR wurden DNA-Fragmente genutzt, die die gleichen Primer Template Sequenzen teilen, deren dazwischenliegende Sequenzen sich jedoch komplett unterscheiden. Um DNA-Fragmente bekannter Größe zu erhalten, wurde das „PCR MIMIC<sup>TM</sup> Construction Kit“ [Clontech Laboratories Inc., Paolo Alto, California, USA] verwendet. Die Reaktionsbedingungen und die Bestimmung der Kompetitor-konzentrationen wurden nach dem Protokoll des Herstellers ausgeführt. Die Größe der entsprechenden Kompetitoren (MIMICs) für MCP-1 betrug 442 bp.

#### **2.5.5 Primer**

Die PCR Primer wurden mittels „Primer Analyse Software – Oligo 5,0“ [Medprobe ASS, Norwegen] entworfen. MCP-1 Primer sahen wie folgt aus: sense (138 bp): 5´-CTg CTg CTA CTC ATT CAC Tgg; antisense (460 bp): 5´- CTC TgT CAT ACT ggT CAC

TTC. Die daraus folgende Größe des entsprechende PCR Produktes der Zielsequenz beträgt 343 bp.

PPAR-gamma sense: CgT CCC CgC CTT ATT ATT CTg A

Antisense: AAA CTg GCA CCC TTg AAA AAT g

### **2.5.6 PCR**

Die PCR dient dem amplifizieren spezifischer DNA-Sequenzen. Die PCR erfolgte mit einem Endvolumen von 25 µl unter Standardbedingungen (10 mM Tris-HCl, pH 8,8; 50 mM KCl; Triton X-100; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM jedes NTP; 0,4 µM des jeweiligen Primers; 1 µl des c-DNA-Synthese-Gemisches; 0,5 Einheiten DyNAzyme™ DNA Polymerase [thermus brockianus, FINNZYMES]). Benutzt wurde ein DyNAzyme™ DNA Polymerase Kit der Firma FINNZYMES [FINNZYMES OY, Finnland].

Die PCR Zyklen bestehen aus 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 30 Sekunden Primer Anlagerung bei 55°C und Verlängerung bei 72 °C für 45 Sekunden. Für MCP-1 wurden die Proben 30 Zyklen und für PPAR-gamma 33 Zyklen einem „Mastercycler Gradient“ [Eppendorf] ausgesetzt.

### **2.5.7 Quantifizieren der c-DNA-Proben**

Für das Quantifizieren der c-DNA-Proben wurden equivalente Mengen von 1 µl total DNA mit zunächst 10- und dann 2-fach Serienlösungen der MCP-1/PPAR Mimics coamplifiziert.

Danach wurden 10 µl von jedem PCR Produkt einer Elektrophorese durch ein 1,5 %iges Agarosegel unterzogen. Dazu wurden Agarose, aqua bidest. und 10 x TBE in einen Glaskolben gegeben und in einer herkömmlichen Mikrowelle [AEG] auf Stufe fünf 2 min erhitzt. Nachdem das Gemisch etwa auf 60 °C abkühlen konnte, wurde Ethidiumbromid hinzugefügt, das Gel in die Bio-Rad Kammer gegossen und ein entsprechender Kamm (z. B. 20 Taschen) eingesteckt Nach dem Polymerisieren des Gels wurde der Kamm wieder entfernt. Die Elektrophoreseapparatur, bestehend aus einem Träger und einer Wanne, wurde montiert und 0,5 x TBE Laufpuffer dazugegeben und die Geltaschen mit den vorbereiteten Proben gefüllt.

Die Trennung der Proteine erfolgte über eine Zeit von 60 Minuten bei 80 V. Kurz bevor die Indikatorfront das untere Ende des Gels erreichte, wurde die Stromzufuhr unterbrochen und das Gel vorsichtig entnommen.

Die Menge der c-DNA wurde errechnet durch Messen der Fluoreszenzintensität (Phoretix 2D Advanced Full Software 5.0) [Phoretix International, New Castle-upon-Tyne, England]. Die c-DNA Proben passte man der MCP-1/PPAR c-DNA gleichen Inhaltes an. Dann trug man den Logarithmus des Verhältnisses von amplifiziertem Kompetitor zu Probenprodukten als Funktion der ursprünglichen Kompetitormenge auf. Danach war die Menge der Proben c-DNA aus der linearen Regressionsanalyse der Datenpunkte zu erhalten.

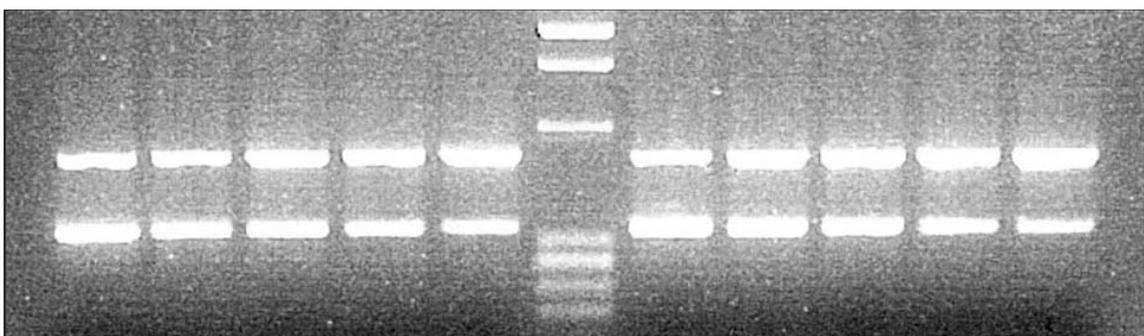
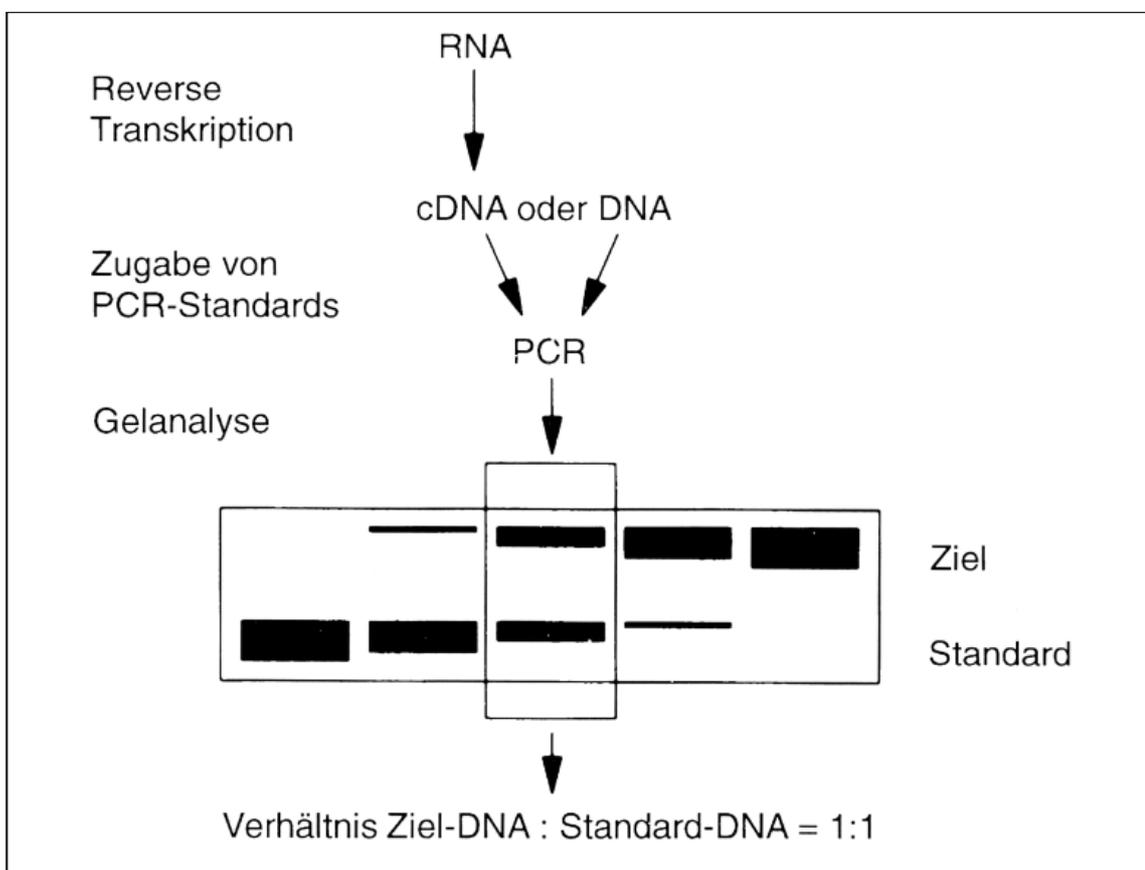


Abbildung 7: Schema einer kompetitiven PCR-Messung

Reaktionen mit DNA- oder c-DNA- Matrizen kann man mit unterschiedlichen Mengen DNA Standard versetzen und mit denselben Primern wie die Zielsequenz amplifizieren. Nach der Gelelektrophorese vergleicht man die Intensität der Amplikons und der DNA-Standards miteinander. Die Konzentration der Ziel-DNA wird bestimmt, indem man von den Standards aus extrapoliert [Newton and Graham, 1994].

## **2.6 Statistische Auswertung**

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Statistikpaket SPSS 11.5S und Excel 2000 (Microsoft) durchgeführt.

Ergebnisse gleichartiger Experimente wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung (+\-) SD berechnet. Für alle Parameter wurde eine univariate Varianzanalyse durchgeführt. Die Varianzanalyse ist ein statistisches Verfahren zur Untersuchung der Wirkung von Faktoren auf Versuchsergebnisse, das auf der Grundlage des geeigneten Vergleichens von Streuungen beruht.

Die Parameter durften nur als Gesamtmodell ausgewertet werden, wenn keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen Art der OP, Zeitpunkt und Dosis der Medikation bestanden. War dies nicht der Fall, so wurden z.B. die Gruppen der operierten Tiere getrennt von den scheinoperierten Tieren betrachtet.

Während die Varianzanalyse Aussagen darüber machte, ob es Unterschiede gab, prüfte der Post-Hoc-Test, worin die Unterschiede bestanden.

Die Resultate wurden mit Hilfe des T-Tests für Gruppen auf ihre Signifikanz untersucht. P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant angenommen.

### 3 Ergebnisse

Am Tag der Organentnahme zeigte sich schon makroskopisch in Abhängigkeit von der Ligaturdauer eine deutliche Größenzunahme der Nieren, die einer UUO unterzogen worden waren. Das Nierenparenchym war deutlich verschmälert.

#### 3.1 Systolischer Blutdruck

Der Blutdruck wurde aufgrund von Wechselwirkungen der einzelnen Faktoren (Art der OP, Zeitpunkt und Dosis der Medikation) nicht als Gesamtmodell ausgewertet. 3, 8 und 25 Tage nach UUO war der mittlere systolische Blutdruck bei allen ureterligierten Gruppen signifikant höher als in den scheinoperierten Kontrolltieren (Mittelwert 126 mmHg versus 139 mmHg,  $p = 0,004$  – Abbildung 8). In den Gruppen der scheinoperierten Tiere gab es zeitabhängige Unterschiede zwischen 3 und 8 Tagen (Mittelwert 122 mmHg versus 138 mmHg,  $p = 0,05$ ) sowie zwischen 8 und 25 Tage (Mittelwert 138 mmHg versus 119 mmHg,  $p = 0,02$ ).

Die Rosiglitazon Therapie ergab in keiner der eingesetzten Dosierungen einen statistisch signifikanten Unterschied des Blutdrucks im Vergleich zu den Tieren, die Placebo erhielten. Dies gilt sowohl für scheinoperierte, als auch für ureterligierte Tiere.

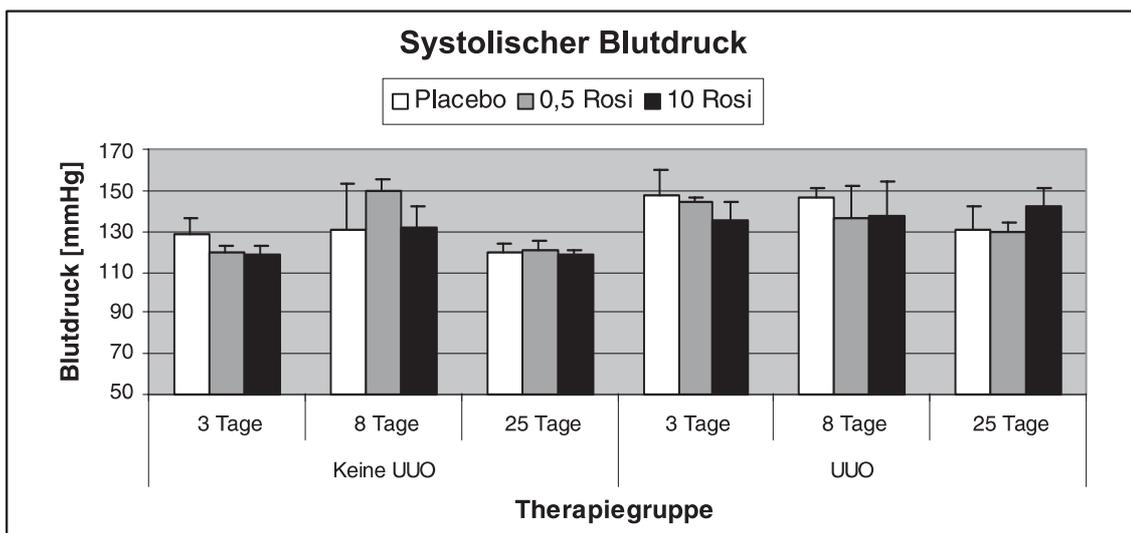


Abbildung 8: Mittelwerte des systolischen Blutdrucks [mmHg]

Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen UUO und Scheinoperation, nicht aber zwischen den verschiedenen Medikationen nachgewiesen werden. Es unterscheiden sich die Gruppen 3 und 8 sowie 8 und 25 Tage nach Scheinoperation.

### 3.2 Blutzucker

Bei allen Tieren erfolgte die Bestimmung des Blutzuckerspiegels am Tag der Organentnahme. Die Blutzuckerwerte werden in Abhängigkeit von der Ligaturdauer und Medikation in Abbildung 9 illustriert.

Es traten weder in Abhängigkeit von der Operation noch von der Medikation signifikante Blutzuckerunterschiede auf. Tendenziell wurden jedoch für die Gruppe der scheinoperierten Tiere gegenüber den ureterligierten Tiere höhere Blutzuckerwerte gemessen (Mittelwert ohne UUO 7,7 mmol/l versus Mittelwert mit UUO 6,9 mmol/l,  $p = 0,052$ ).

Bei den ureterligierten Tieren zeigte sich nach 8 Tagen ein Anstieg (Mittelwert 6,9 mmol/l versus 7,7 mmol/l,  $p = 0,02$ ) und nach 25 Tagen ein signifikanter Abfall (Mittelwert 7,7 mmol/l versus 6,1 mmol/l,  $p = 0,006$ ) des Blutzuckerspiegels. Auch in den Gruppen 3 und 25 Tage gab es einen Unterschied ( $p = 0,03$ ).

Die Therapie mit Rosiglitazon hatte weder bei ureterligierten noch bei scheinoperierten Tieren einen signifikanten Einfluss auf den Blutzuckerspiegel.

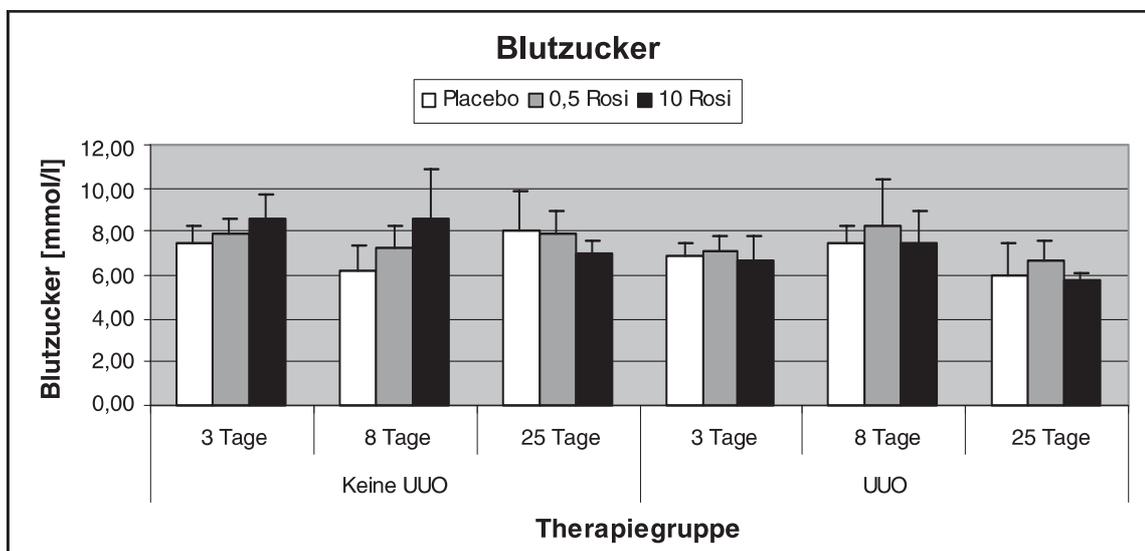


Abbildung 9: Mittelwerte des Blutzuckers [mmol/l]

Rosiglitazon hatte keinen Einfluss auf den Blutzuckerspiegel in den verwendeten, nichtdiabetischen Tieren. Es gab 3, 8 und 25 Tage nach Ureterligatur Unterschiede in den Gruppen. Operation und Scheinoperation unterschieden sich nur tendenziell.

### 3.3 Urinvolumen

Für den Parameter Urinvolumen wurde eine univariate Varianzanalyse durchgeführt. Da keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen Art der OP, Zeitpunkt der Untersuchung und Dosis von Rosiglitazon bestehen, wurde dieser Parameter als Gesamtmodell ausgewertet. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen scheinoperierten und ureterligierten Tieren (Mittelwert 6,8 ml/24h versus 8,3 ml/24h,  $p = 0,07$  – Abbildung 10). Bei den scheinoperierten Tieren stieg die Urinausscheidung von 3 zu 25 Tage an (Mittelwert 4,3 ml/24h versus 8,3 ml/24h,  $p = 0,006$ ); unter den ureterligierten Tieren unterschieden sich die Gruppen 3 und 8 Tage (Mittelwert 6,4 ml/24h versus 9,4 ml/24h,  $p = 0,01$ ) und 3 und 25 Tage (Mittelwert 6,4 ml/24h versus 9,0 ml/24h,  $p = 0,03$ ) voneinander. Rosiglitazon hatte keinen Einfluss auf das Harnvolumen.

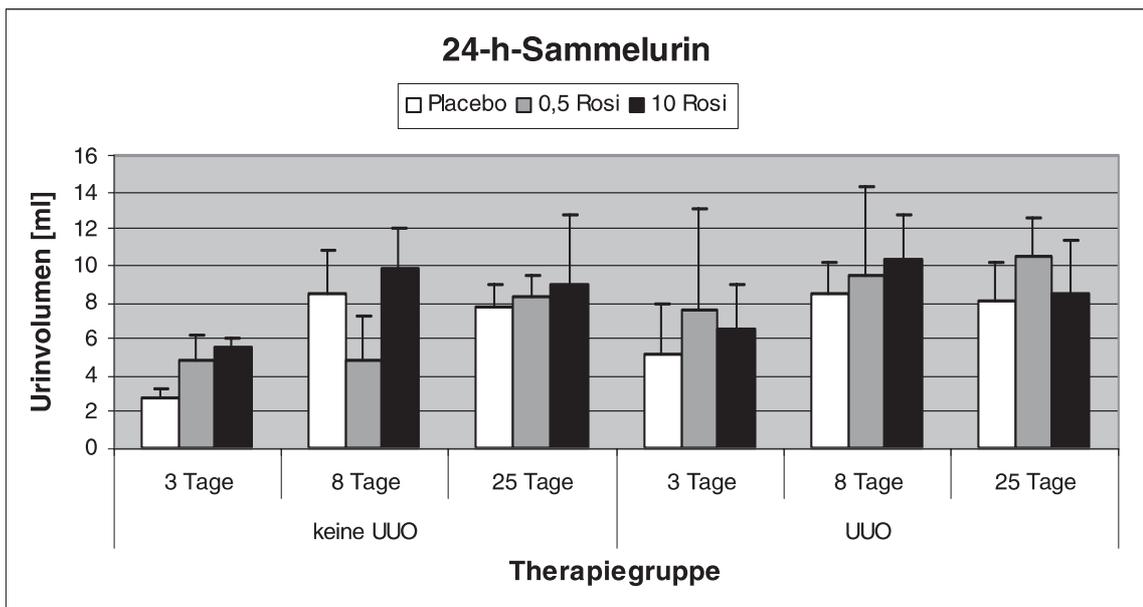


Abbildung 10: Mittelwerte des Urinvolumens [ml/24h]

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen UUO und Scheinoperation, oder zwischen den verschiedenen Medikationen nachgewiesen werden. Sowohl bei UUO als auch Scheinoperation unterschieden sich die Gruppen 3 und 25 Tage, bei den ureterligierten Tieren unterschieden sich auch 3 und 8 Tage voneinander.

### 3.4 Plasma-Renin-Aktivität

Aufgrund vorhandener Wechselwirkungen wurde die PRA für alle Faktoren (Art der OP, Zeitpunkt und Dosis) getrennt untersucht.

Ureterligierte Tiere hatten eine signifikant niedrigere PRA im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren (Mittelwert 6,5 ng/ml/h versus 16,6 ng/ml/h,  $p < 0,001$  – Abbildung 11).

In der scheinoperierten Gruppe zeigte sich 3 und 8 Tage nach der Operation ein Anstieg der PRA (Mittelwert 15,3 ng/ml/h versus 23,7 ng/ml/h,  $p = 0,053$ ), während es 8 und 25 Tage nach OP zu einem Abfall kam (Mittelwert 23,7 ng/ml/h versus 10,8 ng/ml/h,  $p = 0,01$ ). Bei den ureterligierten Tieren ließ sich angedeutet sowohl 3 als auch 8 Tage ein Anstieg der PRA nachweisen (Mittelwert 3,5 ng/ml/h versus 7,7 ng/ml/h,  $p = 0,04$ ), während 25 Tage nach OP (Mittelwert 8,3 ng/ml/h) ein Abfall der PRA nachzuweisen war. Das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht.

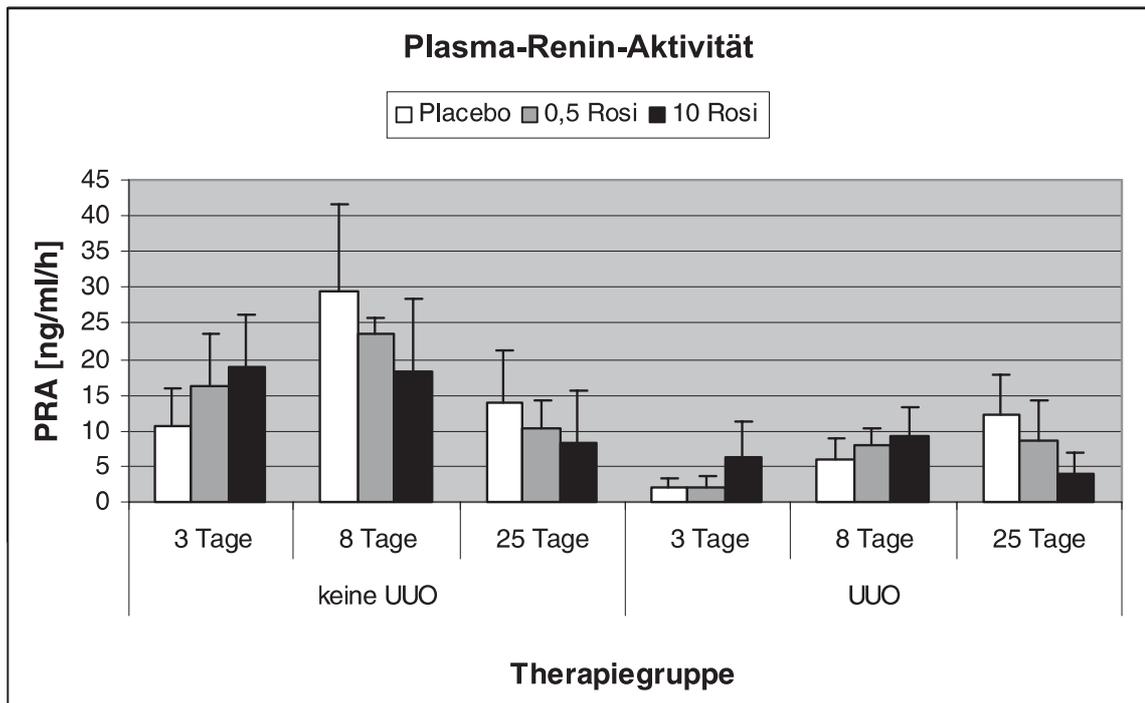


Abbildung 11: Plasma-Renin-Aktivität [ng/ml/Stunde]

Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen UUO und Scheinoperation, nicht aber zwischen den verschiedenen Medikationen nachgewiesen werden. Bei den Scheinoperierten unterschied sich die Gruppe 8 und 25 Tage, bei den ureterligierten Tieren die Gruppe 3 und 8 Tage.

### 3.5 Hydroxyprolinegehalt des Nierengewebes

Zur Quantifizierung des Ausmaßes der Nierenfibrose wurde der Hydroxyprolinegehalt des Nierengewebes bestimmt. Der Hydroxyprolinegehalt kann als Maß für die Kollagenbildung und damit für die Aktivität der Interzellularsubstanz bildenden Zellen angesehen werden.

Am geringsten war der Hydroxyprolinegehalt in den kontralateralen rechten Nieren der ureterligierten Tiere (Mittelwert 176 ng/ml - Abbildung 12). Am höchsten war der Hydroxyprolinegehalt in den linken Nieren der ureterligierten Tieren (Mittelwert 471 ng/ml versus 176 ng/ml,  $p = 0,01$ ). Die Nieren der scheinoperierten Tiere wiesen im Vergleich zu den kontralateralen rechten Nieren der ureterligierten Tiere erhöhte Werte auf (Mittelwert 332 ng/ml versus 176 ng/ml,  $p = 0,006$ ).

Der Hydroxyprolinegehalt der Nieren der scheinoperierten Tiere nahm im Vergleich 3 und 25 Tage ab (Mittelwert 376 ng/ml versus Mittelwert 137 ng/ml,  $p < 0,001$ ).

Der mittlere Hydroxyprolinegehalt in den linken, ureterligierten Nieren stieg 3 bis 8 Tage nach Ureterligatur (Mittelwert 137 ng/ml versus 420 ng/ml,  $p = 0,004$ ) an, um 25 Tage nach Ureterligatur sein Maximum zu erreichen (857 ng/ml,  $p = 0,03$ ). Auch der Unterschied der Gruppen 3 und 25 Tage ist signifikant ( $p = 0,006$ ).

Rosiglitazon hatte keinerlei Einfluss auf das Ausmaß der Hydroxyprolinablagerung.

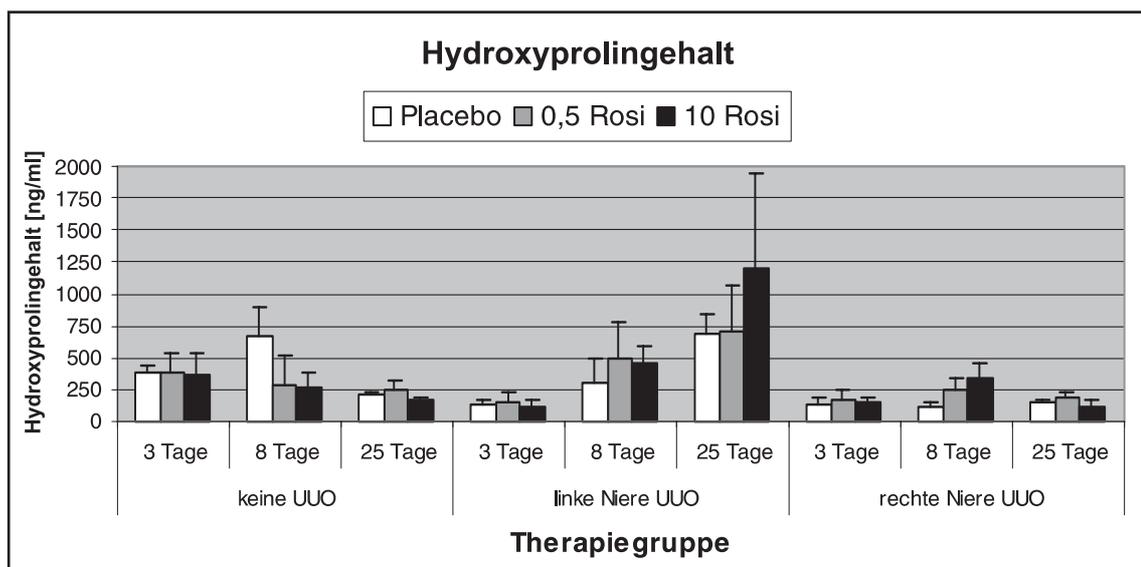


Abbildung 12: Mittelwerte des Hydroxyprolinegehaltes des Nierengewebes [ng/ml]

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen UUO links und Scheinoperation, aber zwischen UUO rechts und Scheinoperation und rechts gegen links nachgewiesen werden. Der Hydroxyprolinegehalt stieg in den linken Nieren der ligierten Tiere signifikant an. Die verschiedenen Medikationen hatten keinen Einfluss.

## **3.6 Monozyten-Chemoattrahierendes Protein-1**

### **3.6.1 MCP-1 Western Blot**

Aufgrund signifikanter Wechselwirkungen zwischen der Operationsart und dem Zeitverlauf ist der Parameter MCP-1 nicht als Gesamtmodell interpretierbar. Die Auswertung für operierte und nicht operierte Tiere wurde getrennt durchgeführt.

Der MCP-1-Proteingehalt der linken ureterligierten Nieren ist gegenüber den kontralateralen rechten Nieren erhöht (Mittelwert 3,36 Grauwert (Gw) versus 1,56 Gw,  $p = 0,007$  - Abbildung 13). Die linken ureterligierten Nieren unterschieden sich von den scheinoperierten Kontrollnieren (Mittelwert 3,36 Grauwert (Gw) versus 1,36 Gw;  $p = 0,004$ ). Der MCP-1-Proteingehalt der rechten, nicht operierten Nieren war mit dem der scheinoperierten Kontrollnieren vergleichbar (Mittelwert 1,56 Gw versus 1,36 Gw;  $p = 0,1$ ).

Der MCP-1-Proteingehalt der linken ureterligierten Nieren steigt im zeitlichen Verlauf zwischen 3 und 25 Tagen (Mittelwert 1,97 Gw versus 5,69 Gw;  $p = 0,004$ ) sowie zwischen 8 und 25 Tage (Mittelwert 2,42 Gw versus 5,69 Gw;  $p = 0,01$ ) signifikant an. Ein signifikanter Einfluss der Rosiglitazon-Medikation auf die MCP-1-Expression ist weder für operierte, noch für scheinoperierte Tiere nachweisbar.

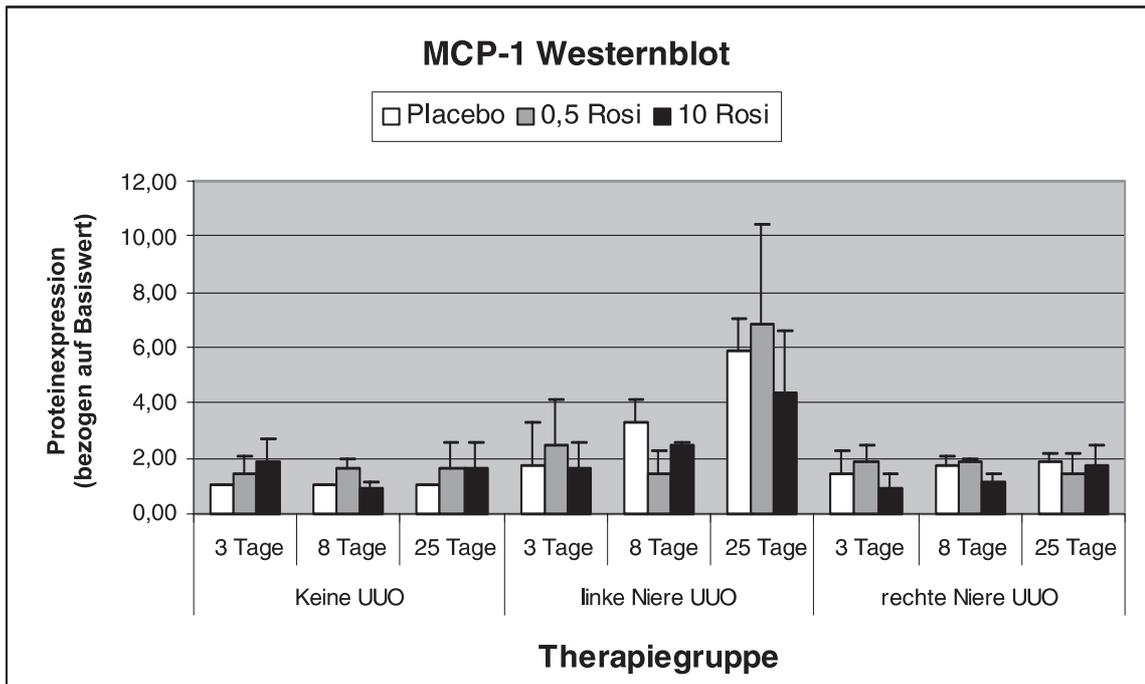


Abbildung 13: Western Blot Ergebnisse des MCP-1 [Grauwert]

Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen UUO linke Niere und Scheinoperation festgestellt werden. Der MCP-1-Proteingehalt der rechten, nicht operierten Nieren war mit dem der scheinoperierten Kontrollnieren vergleichbar. Unterschiede konnten zwischen 3 und 25 sowie zwischen 8 und 25 Tage nach Ureterligatur festgestellt werden. Die Gabe von Rosiglitazon hatte keinen Einfluss auf diesen Parameter.

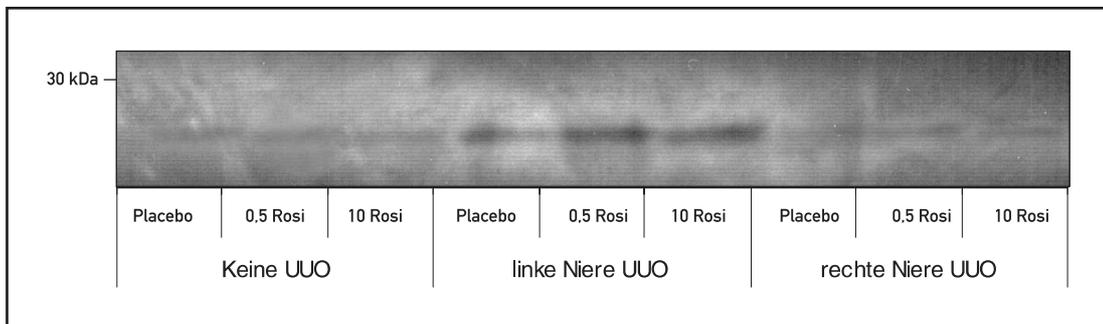


Abbildung 14: MCP-1 Western Blot 25 Tage nach Ureterligatur bzw. Scheinoperation (Gruppe 13–18)

### 3.6.2 MCP-1 PCR

Aufgrund zahlreicher Wechselwirkungen kann zu dem Parameter MCP-1 auf RNA-Ebene als Gesamtmodell keine Aussage gemacht werden. Zu allen Zeitpunkten liegt der MCP-1 Gehalt in den ureterligierten Nieren signifikant über dem der scheinoperierten Kontrollnieren (Mittelwert 0,61 Gw versus 0,15 Gw;  $p = 0,001$  - Abbildung 15).

Auf m-RNA-Ebene sind tendenzielle Unterschiede im zeitlichen Verlauf nach Ureterligatur in den operierten Nieren nachweisbar. Hier erreicht die m-RNA-Expression 8 Tage nach UUO ihr Maximum (Mittelwert 0,32 Gw versus 0,91 Gw;  $p = 0,06$ ), 25 Tage nach UUO sind bereits wieder deutlich niedrigere MCP-1-m-RNA-Spiegel nachweisbar (Mittelwert 0,60 Gw). Ein Signifikanzniveau wird dabei nur im Vergleich der Gruppen 3 und 25 mit erreicht ( $p = 0,03$ ).

Im Vergleich der scheinoperierten Tiere ergab sich ein Unterschied zwischen den Gruppen 3 und 8 Tage (Mittelwert 0,07 Gw versus 0,22 Gw;  $p = 0,008$ ).

Es konnte kein signifikanter Einfluss der Rosiglitazon-Medikation auf die MCP-1-RNA-Expression weder für operierte, noch für scheinoperierte Tiere nachgewiesen werden.

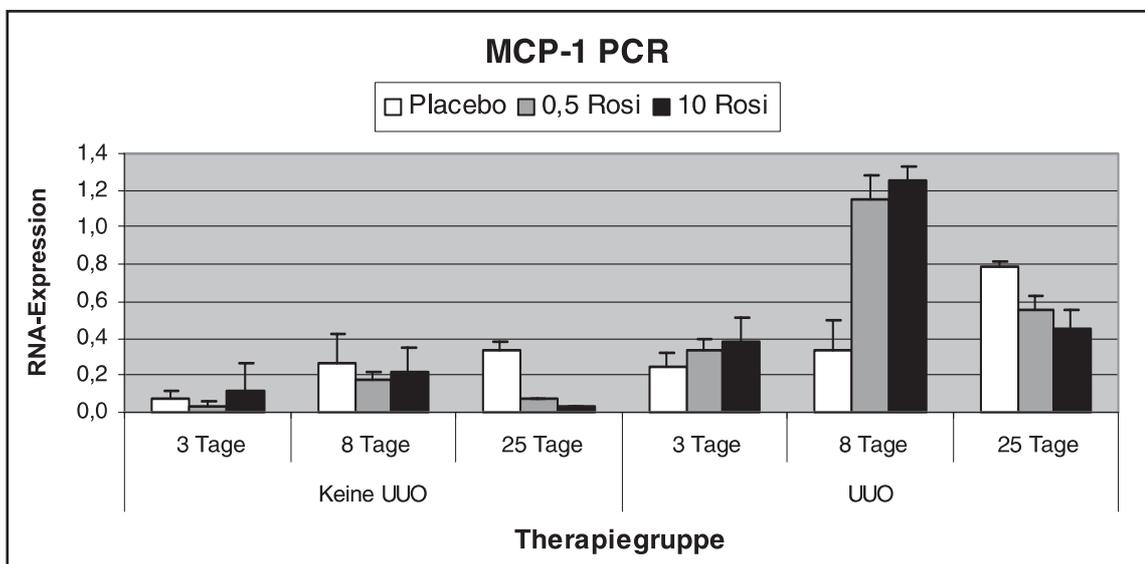


Abbildung 15: PCR Ergebnisse des MCP-1 [Grauwert]

Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen UUO und Scheinoperation, nicht aber zwischen den verschiedenen Medikationen nachgewiesen werden. Es unterscheiden sich die Gruppen 3 und 8 Tage nach Scheinoperation sowie 3 und 25 Tage nach UUO.

### 3.7 p27<sup>Kip1</sup>-Western Blot

Der Parameter p27<sup>Kip1</sup> ist aufgrund signifikanter Wechselwirkungen zwischen der Operationsart und dem Zeitverlauf nicht als Gesamtmodell interpretierbar. Die Auswertung für operierte und nicht operierte Tiere erfolgt getrennt. Sowohl 3, 8 als auch 25 Tage nach Ureterligatur liegen die p27<sup>Kip1</sup>-Proteinmengen deutlich über denen scheinoperierter Kontrolltiere (Mittelwert 3,92 Gw versus 1,21 Gw;  $p = 0,004$  - Abbildung 16).

Der p27<sup>Kip1</sup>-Proteingehalt der rechten, nicht operierten Nieren ist mit dem der scheinoperierten Kontrollnieren vergleichbar (Mittelwert 1,46 Gw versus 1,21 Gw;  $p = 0,1$ ). Zwischen rechter und linker Niere der ligierten Tiere gab es einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,007$ ).

Der p27<sup>Kip1</sup>-Proteingehalt der linken ligierten Nieren unterscheidet sich im zeitlichen Verlauf zwischen allen Gruppen signifikant (Mittelwert 3 Tage 1,89 Gw versus Mittelwert 8 Tage 2,49 Gw versus Mittelwert 25 Tage 7,38 Gw;  $p_{3-8} = 0,05$ ;  $p_{3-25} < 0,001$ ;  $p_{8-25} < 0,001$ ). Des Weiteren gab es einen Unterschied zwischen den Gruppen 8 und 25 Tage nach Scheinoperation (Mittelwert 1,11 Gw versus 1,66 Gw;  $p = 0,1$ ).

Ein Einfluss der Rosiglitazon-Medikation auf die p27<sup>Kip1</sup>-Expression ist weder für operierte, noch für scheinoperierte Tiere nachweisbar.

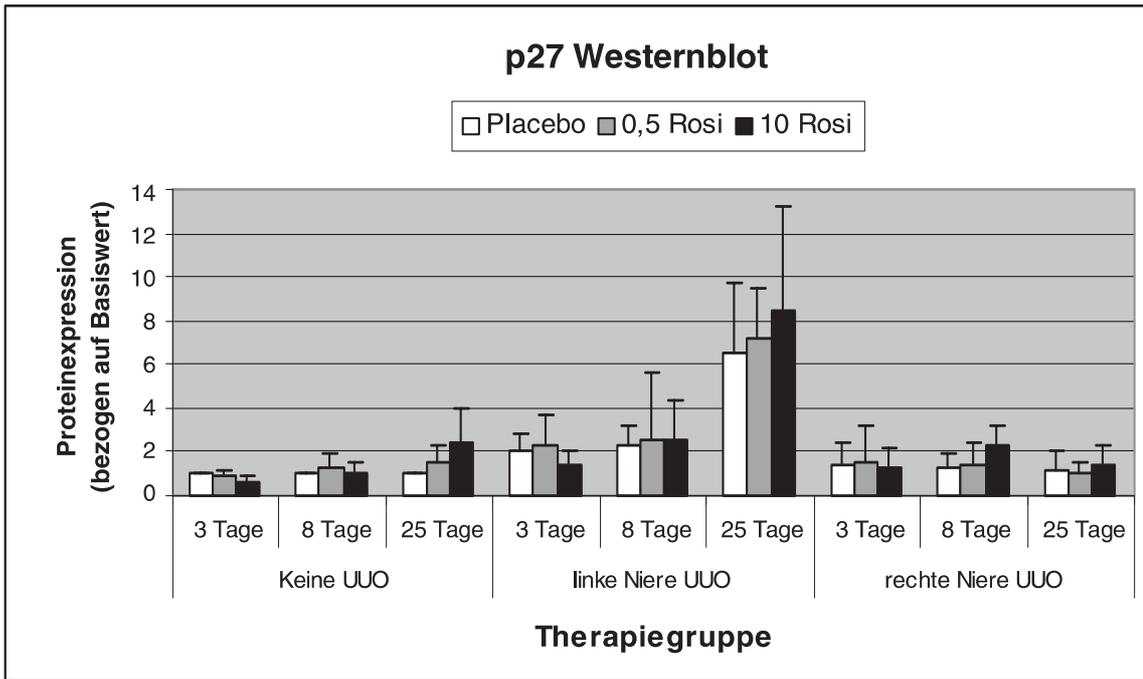


Abbildung 16: p27<sup>Kip1</sup>-Mittelwerte [Grauwert]

Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen UUO linker Niere und Scheinoperation festgestellt werden. Der p27<sup>Kip1</sup>-Proteingehalt der rechten, nicht operierten Nieren war mit dem der scheinoperierten Kontrollnieren vergleichbar. Unterschiede konnten zwischen allen Gruppen der ureterligierte Tiere sowie zwischen 8 und 25 Tage nach Scheinoperation festgestellt werden. Die Gabe von Rosiglitazon hatte keinen Einfluss auf diesen Parameter.

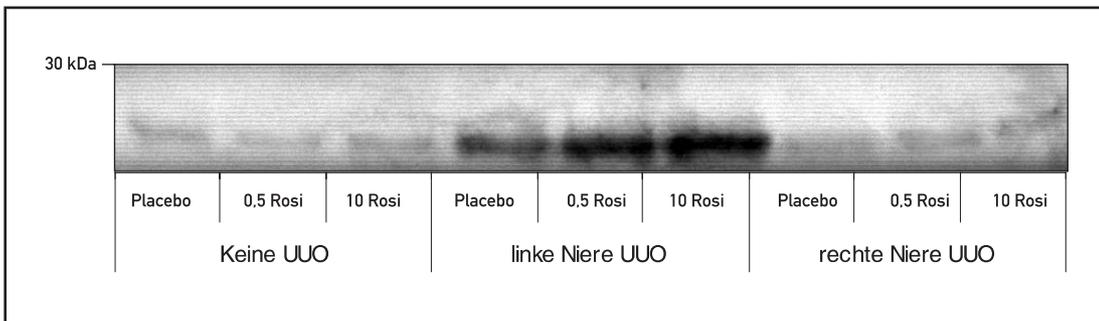


Abbildung 17: p27<sup>Kip1</sup> Western Blots 25 Tage nach Ureterligatur bzw. Scheinoperation (Gruppe 13–18)

### 3.8 PPAR-gamma

PPAR-gamma wurde als Gesamtmodell ausgewertet.

8 Tage nach war UUO die PPAR-gamma-Expression im Vergleich zu den übrigen Zeitpunkten sowohl in der Kontroll- (Mittelwerte: 0,020 Gw; 0,004 Gw; 0,029 Gw - Abbildung 18) als auch in der UUO-Gruppe (Mittelwerte: 0,019 Gw; 0,006 Gw; 0,023 Gw) signifikant erniedrigt.

Es zeigten sich zwischen den Gruppen 3–8, 3–25 und 8–25 Tage nach der Operation signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ ). Allerdings konnten im Vergleich der Gruppen 3–25 Tage der ureterligierten Tiere keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,08$ ) festgestellt werden.

Weder das Medikament Rosiglitazon noch die Operationsmethode hat einen Einfluss auf diesen Parameter.

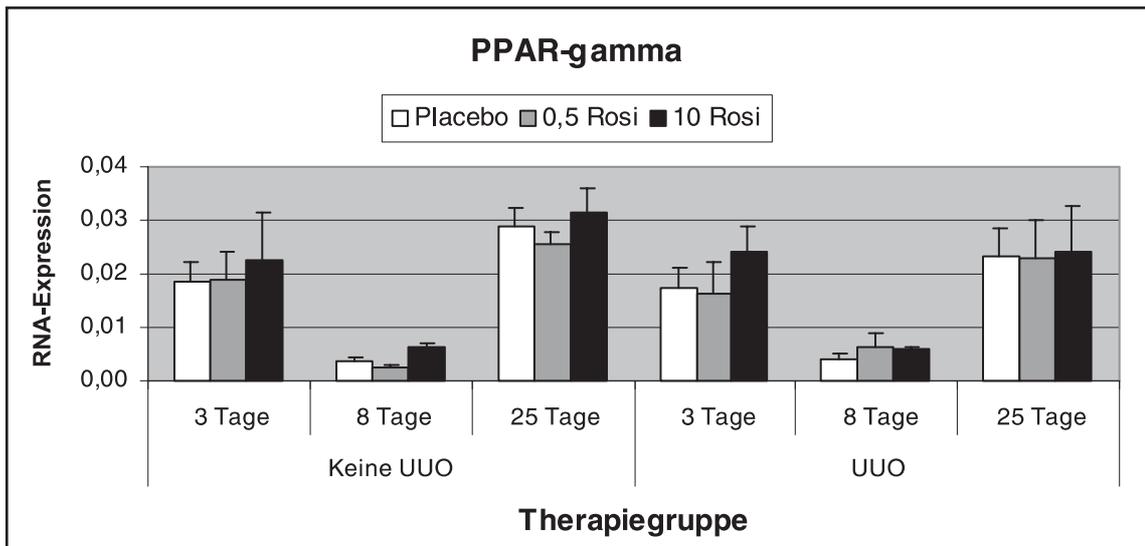


Abbildung 18: Mittelwerte des Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma [Grauwert]

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen UUO und Scheinoperation oder zwischen den verschiedenen Medikationen nachgewiesen werden. Es wurde eine signifikant verminderte Expression von PPAR-gamma 8 Tage nach der Operation festgestellt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die interstitielle Fibrose Modell der unilateralen Ureterligatur

Seit mehr als 30 Jahren wird der verminderte renale Blutfluss und der Abfall der glomerulären Filtrationsrate neben den fibrotischen tubulointerstitiellen Veränderungen als Charakteristikum der UUO beschrieben [Vaughan et al., 2004]. Es gibt derzeit eine Vielzahl von Studien, die das Modell der UUO an Nagetieren benutzen. Der Begriff Fibrose ist gekennzeichnet durch eine Zunahme von bindegewebigen Strukturen in Relation zu der Zahl der Zellen (Fibroblasten, Fibrozyten) [Perez-Tamayo et al., 1964], die hauptsächlich in parenchymatösen Organen wie Leber, Lunge und Niere stattfindet. Auf dem internationalen Kongress für Nephrologie 2001 beschäftigten sich mehr als 100 Arbeiten mit den verschiedenen pathophysiologischen und molekularen Erkenntnissen, die durch die UUO gewonnen werden konnten. Die obstruktive Nephropathie ist ein geeignetes Modell, um zelluläre Veränderungen der renalen epithelialen und interstitiellen Zellen sowohl im Rahmen einer Harnstauung als auch im Sinne einer interstitiellen Fibrose zu untersuchen [Klahr and Morrissey, 2002].

Tiermodelle spielen in der nephrologischen Grundlagenforschung eine besondere Rolle, da Untersuchungen am nierenkranken Patienten auf Körperflüssigkeiten und biopsisch bzw. operativ gewonnenes Material angewiesen und damit beschränkt sind [Tam et al., 2004]. Außerdem kann die Möglichkeit der genetischen Manipulation von Tieren dazu beitragen, Gene, die renale Krankheitsprozesse vorantreiben, zu entdecken und besser zu verstehen. Die UUO ist nicht nur zur Erforschung von Pathomechanismen der Fibrosierung des Tubulointerstitiums [Chun et al., 2004; Crisman et al., 2001], sondern auch zur Validierung von medikamentösen Therapiestrategien geeignet. Hatsukari et al. beschreiben beispielsweise einen positiven Einfluss von Morphin auf die interstitielle Fibrose am Modell der UUO [Hatsukari et al., 2005].

Hervorgerufen durch die chronische Harnstauung ähneln histopathologische Bilder und pathophysiologische Prozesse der UUO denen der tubulointerstitiellen Fibrose.

Zur Pathogenese gibt es folgende Vorstellungen:

Neben einer Ureterobstruktion bedingen beim Menschen eine Reihe von Noxen, wie nephrotoxische Medikamente, Virusinfektionen oder maligne Erkrankungen, wie Plasmozytom mit konsekutiver Toxizität von Leichtketten, eine primäre Schädigung des renalen Tubulointerstitiums. Auch primär glomeruläre Erkrankungen verursachen

häufig bereits in einem frühen Stadium tubulointerstitielle Begleitreaktionen, welche ähnliche pathophysiologische Phänomene zeigen und in ihrem Endstadium zu einer Fibrosierung des Tubulointerstitiums führen. Viele pathogenetische Mechanismen laufen nach einer initialen Schädigung uniform und unabhängig von der auslösenden Ursache ab. Dennoch ist die Pathogenese der interstitiellen Fibrose nur teilweise geklärt.

Der Prozess der interstitiellen Fibrose ist mit dem Verlust der renalen Tubuli sowie einer Akkumulation der extrazellulären Matrixproteine wie Kollagen (Typ I, III, IV, V und VII), Fibronectin und Laminin verbunden [Eddy et al., 1996]. Eine vermehrte Expression von Chemokinen (z.B. MCP-1), vaskulären Zelladhäsionsmolekülen (z.B. VCAM 1), [Morrissey and Klahr, 1999] sowie TGF $\beta$ <sub>1</sub> [Pimentel et al., 1995] und FGF [Strutz et al., 2000; Sommer et al., 2002] trägt zur Ausbildung der interstitiellen Fibrose sowie der tubulären Atrophie bei. Hyaluronsäure scheint ebenfalls am Fibrosierungsprozess beteiligt zu sein. Takeda et al. haben durch Hyperglykämie eine vermehrte Hyaluronsäureproduktion induziert, die bei der interstitiellen Fibrose diabetischer Nephropathien eine Rolle spielen kann [Takeda et al., 2001]. Kürzlich haben Moriyama et al. im UUO-Modell eine signifikante Suppression der tubulointerstitiellen Fibrose durch die antioxidative Wirkung von Fluvastatin – einem  $\beta$ -HMG-CoA-Reduktase-Hemmer – gezeigt [Moriyama et al., 2001].

Das Ausmaß der tubulointerstitiellen Fibrose wird in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Hydroxyprolinbestimmung untersucht. Hydroxyprolin korreliert direkt mit dem Ausmaß der Kollagenablagerung und kann somit als Maß für die fibrotischen Veränderungen herangezogen werden. Eine im zeitlichen Verlauf zunehmende Akkumulation des Kollagens in den Nieren mit UUO als Reaktion auf die Obstruktion des Ureters mit der Folge einer Hydronephrose, war nachweisbar (Abbildung 12). Das Ausmaß des Hydroxyprolingehaltes in unserer Untersuchung ist mit früheren Arbeiten im Modell der UUO vergleichbar [Sommer et al., 1999]. Im Gegensatz zur rechten, kontralateralen Niere zeigte sich ein leicht vermehrter Hydroxyprolingehalt in den scheinoperierten Tieren. Dies kann als Einfluss der Scheinoperation gedeutet werden. Die Kollagenbildung der ureterligierten Nieren hatte ein Maximum 25 Tage nach der Operation. Eine Vielzahl der in unserer Untersuchung nachgewiesenen Effekte und Ergebnisse müssen auf die UUO und weniger auf die Therapie mit Rosiglitazon zurückgeführt werden. Dies gilt auch für die Hydroxyprolinsynthese- und -ablagerung, für die kein signifikanter Einfluss der Rosiglitazon-Medikation nachgewiesen werden

konnte. Da die UUO sehr starke Veränderungen verursacht, wären für weitere Experimente Modelle zu empfehlen, welche eine Fibrose weniger stark und weniger schnell hervorrufen, um so den Einfluss protektiver Substanzen besser nachweisen zu können.

In einer Koreanischen Studie geht man davon aus, dass Modelle, bei denen man erst nach dem Aufheben einer UUO eingreift, eher den obstruktiven renalen Erkrankungen des Menschen ähneln als Modelle, in denen der Zeitpunkt des Therapiebeginns mit der experimentellen Obstruktion übereinstimmen. Ratten, die mit dem ACE-Hemmer Enalapril nach Beseitigung der unilateralen Ureterligatur behandelt wurden, hatten ein niedrigeres Verhältnis des Volumens von Interstitium zu Cortex als unbehandelte Tiere. Die Aufhebung der Obstruktion führte zur Rückbildung der interstitiellen Expansion. Dieser Effekt wurde signifikant durch Enalapril beschleunigt [Koo et al., 2003].

#### **4.2 Monozyten-Chemoattrahierendes Protein-1**

Ein zentraler Prozess in der frühen Phase der interstitiellen Fibrose ist die Migration von Monozyten aus dem Blutstrom in den subendothelialen, subvaskulären Raum und später ins Tubulointerstitium. Diese Extravasation wird massgeblich von lokal produzierten Chemokinen stimuliert. Einer der stärksten chemotaktischen Stimuli für Blutmonozyten ist das C-C Chemokin MCP-1, welches unter anderem von vaskulären Endothelzellen und VSMC produziert wird.

Auch nach UUO kommt es zur Invasion von Monozyten und Makrophagen (resp. Lymphozyten) mit nachfolgender Proliferation tubulärer und interstitieller Zellen [Schreiner et al., 1988]

Chun et al. untersuchten die MCP-1 Expression im UUO-Modell. Es wurden 60 Sprague-Dawley Ratten operiert, histologische Veränderungen wurden durch Hämatoxylin/Eosin- und Masson-Färbung verfolgt und das renale Gewebe immunhistochemisch auf den Gehalt an MCP-1 und ED-1 untersucht. Es fand sich ein signifikanter Anstieg der MCP-1- und ED-1-Expression bei den UUO-Tieren. Die vermehrte MCP-1 Expression korrelierte mit der interstitiellen Makrophagenakkumulation und der interstitiellen Fibrose. Der Grad der interstitiellen Makrophagenakkumulation korrelierte mit dem der interstitiellen Fibrose [Chun et al., 2004].

Tam et al. zeigten, dass Messungen von MCP-1 (nicht von Fractalkin) im Urin eine gute nicht-invasive Einschätzung der renalen Beteiligung und des Therapieerfolges bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden erlaubt [Tam et al., 2004].

Cheng et al. konnten erst kürzlich zeigen, dass TGF-beta1 über einen Phosphodiesterase Isoenzym 4-abhängigen Prozess die MCP-1-Expression in mesangialen Zellen stimuliert [Cheng et al., 2005].

Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen die gesteigerte Expression von MCP-1 nach UUO sowohl auf m-RNA als auch auf Proteinebene. Dabei liegt die m-RNA-Expression von MCP-1 zu allen 3 Zeitpunkten nach UUO über der Expression scheinoperierter Kontrolltiere (Abbildung 15). 8 Tage nach Anlage der UUO kommt es dabei zur maximalen MCP-1 m-RNA-Expression, während 25 Tage nach UUO bereits wieder ein Abfall nachweisbar ist. Auf Proteinebene wird dieses Maximum erst 25 Tage nach UUO erreicht, was mit einer Verzögerung durch die Proteintranslation erklärt werden kann.

In den MCP-1 PCR-Bestimmungen fällt auf, dass der PPAR-gamma-Agonist 3 und insbesondere 8 Tage nach UUO zu einer Verstärkung der MCP-1 Expression führt. Dies deckt sich mit den Daten von Panzer et al., der eine verstärkte Expression unter Troglitazon-Einfluss in einem glomerulären Schädigungsmodell beschrieb [Panzer et al., 1999]. 25 Tage nach UUO kehrt sich dieser Effekt jedoch um, d. h., die mit Rosiglitazon behandelten Tiere exprimieren dosisabhängig weniger MCP-1 m-RNA. Dieser Effekt war auf Proteinebene nicht zu bestätigen, wobei eingeräumt werden muss, dass die Qualität der Western-Blots, die densitometrische Auswertung und das geringe Ausmaß der Unterschiede eine Detektion dieser Effekte nicht zuließ.

Die PRA verhält sich nach UUO ähnlich wie die MCP-1 Expression; 3 und 8 Tage nach UUO kommt es zu einer Steigerung, während 25 Tage nach UUO eine Senkung der PRA und der MCP-1-Expression unter Rosiglitazon-Einfluss beobachtet werden. Inwiefern es sich um einen tatsächlichen Zusammenhang oder lediglich um eine Koinzidenz handelt, kann anhand der vorliegenden Daten nur spekuliert werden. Denkbar wäre eine Abhängigkeit der MCP-1-Expression von der PRA bzw. von der Angiotensin II-Konzentration.

### 4.3 Systolischer Blutdruck und Plasmareninaktivität

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Hauptursachen für Morbidität und Mortalität der Bevölkerung. Dies gilt insbesondere für Patienten mit dem Risikofaktor Niereninsuffizienz. Eine konsequente Führung und Prävention von Atherosklerose und Bluthochdruck, zwei komplexen und chronischen Störungen, reduzieren das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, wie Myokardinfarkt und Schlaganfall erheblich. Dies erfordert das Verständnis für die zugrundeliegenden Mechanismen, deren Entstehung und Progression. Obwohl viel über diese Erkrankungen, insbesondere über den arteriellen Hypertonus bekannt ist, sind Morbidität und Mortalität immer noch unakzeptabel hoch [Halabi and Sigmund, 2005].

Dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) wird eine zentrale Rolle bei der Vermittlung einer Hypertonie renaler Ursache zugeschrieben. Renin ist ein proteolytisches Enzym mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa, das in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet wird. Durch seine Wirkung entsteht aus Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I mit dem Molekulargewicht von 1,3 kDa. Angiotensin I wird durch Einwirkung des Convertin Enzyms (ACE) in das biologisch aktive Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit, hat aber die stärkste vasopressorische Wirkung. Hauptwirkungen sind Vasokonstriktion, Stimulation des sympathischen Nervensystems und Anregung der Aldosteronsekretion.

Da die Angiotensin I-Konzentration in direkter Beziehung zur PRA steht, hat die Plasma-Reninbestimmung bei der Bewertung des RAAS Bedeutung erlangt. Die Bestimmung der PRA kann bei Hochdruckpatienten in der Differenzierung zwischen primärem und sekundärem Hyperaldosteronismus hilfreich sein.

Die Reninsekretion wird durch Angiotensin II und ADH,  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Retention sowie erhöhten Nierendruck gehemmt.  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Mangel, erniedrigter Niereninnendruck und Sympathikuseinflüsse steigern die Reninsekretion.

Es ist gut belegt, dass neben dem Renin die meisten Bestandteile des RAAS auch intrinsisch im Nierengewebe exprimiert werden und dass im Modell der UUO dieses intrinsische RAAS aktiviert ist [El-Dahr 1990, 1993; Ishidoya et al., 1995, 1996; Klahr et al., 1995, 1997]. Eine Aktivierung des RAAS spielt eine entscheidende Rolle sowohl systemisch bei der Entstehung des Hypertonus als auch intrinsisch bei der Vermittlung verschiedener pathophysiologischer Phänomene, die zur Ausbildung der tubulointerstitiellen Fibrose im Rahmen obstruktiver Nierenerkrankungen beitragen.

Angiotensin II vermittelt eine vermehrte Expression von MCP-1, Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM1) und TGF- $\beta$ , was in einem gesteigerten Austritt von Makrophagen/Monozyten ins Gewebe resultiert [Kaneto et al., 1994; Morrissey and Klahr, 1999].

Zentrale Komponenten des RAAS (Angiotensin II, Angiotensinrezeptoren Typ 1 (AT1-R)/ Typ 2 (AT2-R) und Angiotensin-Converting Enzym (ACE)) sind aber auch in anderen Geweben, beispielsweise in humanen arteriosklerotischen Läsionen vermehrt exprimiert [Diet et al., 1996; de Gasparo et al., 2000; Schieffer et al., 2000]. Kürzlich konnten direkte, blutdruckunabhängige Effekte von Angiotensin II in der Gefäßwand nachgewiesen werden. Die Infusion von Angiotensin II in Apolipoprotein E-defiziente Mäuse führte zu einer massiven Verstärkung der Entstehung arteriosklerotischer Plaques [Daugherty et al., 2000]. Die Angiotensin II Dosis hatte keinen Einfluss auf den Blutdruck der Tiere. Parallel wurde in mehreren Studien eine pro-inflammatorische Wirkung von Angiotensin II beobachtet, und es wird spekuliert, dass Angiotensin II über die Stimulation der vaskulären Inflammation die Entstehung der Atherosklerose fördert. Bisherige Studien konzentrierten sich überwiegend auf pro-inflammatorische Effekte von Angiotensin II in vaskulären Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC). In Endothelzellen stimuliert Angiotensin II die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle (E-Selektin, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), was zu einer verstärkten Anheftung von Leukozyten an die Gefäßwand führt [Grafe et al., 1997; Pastore et al., 1999; Pueyo et al., 2000]. In glatten Muskelzellen induziert Angiotensin II das Chemokin MCP-1, ein weiterer wichtiger pro-inflammatorischer Faktor in der Gefäßwand [Chen et al., 1998]. Zusätzlich wurde in verschiedenen Tiermodellen demonstriert, dass ACE-Inhibitoren und AT1-R-Blocker die Entstehung von arteriosklerotischen Gefäßwandläsionen abschwächen [Hayek et al., 1999; Chobanian and Hill, 2000].

In neueren Studien wurden der AT1-R und der AT2-R auf Monozyten identifiziert [Okamura et al., 1999]. Es konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II in Monozyten die Abgabe proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 $\beta$  und TNF-alpha stimuliert [Hahn et al., 1994; Dorffel et al., 1999]. Kintscher et al. haben nachgewiesen, dass Angiotensin II nach Bindung an den AT1-R über Aktivierung spezifischer zytoplasmatischer Signalwege die Migration von Monozyten als direkter Chemotaxisfaktor induziert [Kintscher et al., 2001].

Angiotensin II fördert die interstitielle Fibrose, wobei die profibrotischen Wirkungen durch den Angiotensin-Rezeptor Typ 1 vermittelt werden [Ishidoya et al., 1995], während der Angiotensin-Rezeptor Typ 2 vermutlich gegenregulatorische Funktionen besitzt [Morrissey and Klahr, 1999].

In den Untersuchungen von Pimentel et al. findet sich in den ligierten Nieren nach UUO eine Hochregulation von Renin, Renin-m-RNA, ACE-Aktivität und Angiotensin II Konzentration, während die AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Transkription abfällt. In der kontralateralen Niere ist die Renin-m-RNA und ACE-Aktivität herunterreguliert [Pimentel et al., 1995]. In einer anderen Studie vermindert der ACE-Hemmer Enalapril die tubulointerstitielle Fibrose in Nieren mit UUO durch eine Reduktion des Kollagens Typ IV [Kaneto et al., 1994].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einem signifikanten Blutdruckanstieg nach UUO im Vergleich zur Scheinoperation kommt. Die unilaterale Ureterligatur führt zu einer einseitigen Harnstauung und damit zu einer verminderten Durchblutung der betroffenen Niere [Hsu et al., 1977; Chevalier et al., 2002]. Reaktiv wäre mit einer Ausschüttung von Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat und damit einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zu rechnen. Dieser Mechanismus bewirkt eine periphere Vasokonstriktion (Angiotensin II Wirkung) sowie eine Natrium-/Wasserretention (Aldosteronwirkung); es kommt zum arteriellen Hypertonus. In den vorliegenden Daten zeigt sich jedoch zu allen 3 Zeitpunkten eine Reduktion der PRA nach UUO, wobei das Ausmaß im zeitlichen Verlauf abnimmt (Abbildung 11). In der Literatur sind widersprüchliche Daten in Bezug auf die PRA nach UUO zu finden. Während Pimentel et al. einen Anstieg der PRA 24 Stunden nach UUO fanden [Pimentel et al., 1994], zeigten El-Dahr eine erniedrigte PRA 4 Wochen nach UUO [El-Dahr et al., 1990].

Da die PRA durch hohe Angiotensin II-Spiegel im Sinne eines negativen Feed-back-Mechanismus unterdrückt werden kann, ist eine, durch die lokale Angiotensin II-Synthese vermittelte Senkung der Renin-Produktion denkbar. Die lokale Überexpression von Angiotensin II durch ein lokales RAAS wurde in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen [El-Dahr et al., 1993; Pimentel et al., 1995]. Ob es in den ersten Tagen nach UUO zu einer Erhöhung der PRA kommt, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Rosiglitazon bewirkt in unserer Versuchsanordnung weder in der UUO- noch in der scheinoperierten Gruppe eine Blutdruckveränderung (Abbildung 8). In der

kontrollierten, prospektiven, randomisierten „Proactive Studie“, an der 5238 Patienten teilnahmen, reduzierte Pioglitazon den systolischen Blutdruck geringgradig, während der diastolische Blutdruck unverändert blieb [Dormandy et al., 2005]. In dieser Studie wurden nicht nur die Gesamtmortalität, sondern auch alle nicht letalen Ereignisse wie Myokardinfarkt und Schlaganfall bei Patienten mit makrovaskulären Komplikationen eines Typ II Diabetes mellitus reduziert. Der Blutdruckeffekt der Glitazone ist umstritten und, wenn überhaupt, nur sehr gering ausgeprägt. Dementsprechend verwundert es nicht, dass in unserem Experiment keine Blutdrucksenkung durch Rosiglitazon nachweisbar war.

Die UUO steigerte in einer anderen Studie über die Stimulation von Angiotensin II die Apoptose der zirkulierenden Lymphozyten. Eine anhaltende UUO beeinträchtigte die Lymphozyten-Zellimmunität und die Abwehrmechanismen. Die Behandlung mit Angiotensin II Rezeptor Typ 1 Antagonist (Losartan) oder ACE-Hemmer (Enalapril) konnte die Angiotensin II-stimulierte Apoptose der zirkulierenden Lymphozyten aufheben [Eiam-Ong et al., 2005].

Vor diesem Hintergrund sind die Daten der vorliegenden Arbeit zum Parameter PRA sehr kritisch zu betrachten. Entgegen den Erwartungen war die PRA bei ureterligierten Tieren nicht hoch-, sondern runterreguliert, zumal der Blutdruck bei diesen Tieren leicht erhöht war.

#### **4.4 Urinvolumen**

Bezüglich des Urinvolumens konnte ein tendenzieller Unterschied zwischen ureterligierten und scheinoperierten Tieren, nicht aber zwischen den verschiedenen Medikationen nachgewiesen werden. Die komplette funktionelle Ausschaltung einer Niere durch Ureterligatur führte zu einer überschießenden Harnproduktion der kontralateralen Niere. Dieser Adaptationsmechanismus ist hinsichtlich der für die Entgiftung ausgefallenen einer Niere nicht verwunderlich, da die gleiche Entgiftungsleistung des Organismus mit der halben Nephronenzahl geleistet werden muss. Es kommt kompensatorisch zu einer Hyperperfusion, die u.a. auch zu einer vermehrten Harnproduktion führt. Bleibt dieser Zustand bestehen, kommt es langfristig zu einer Hypertrophie mit Größenzunahme der intakten Niere.

Da die Harnproduktion im Versuchszeitraum sowohl bei den scheinoperierten als auch bei den ureterligierten Tieren anstieg, ist dieser Effekt auf die Gewichtszunahme der

noch im Wachstum befindlichen Tiere und nicht auf die Versuchsanordnung zurückzuführen.

#### **4.5 Blutzucker**

Die diabetische Nephropathie ist ein Problem von zunehmender gesundheitspolitischer Bedeutung. In Deutschland entwickeln jährlich etwa 15.000 Menschen ein terminales Nierenversagen. Davon sind zwischen 36 und 49 Prozent Diabetiker. In 90 Prozent der Fälle handelt es sich dabei um einen Typ-2-Diabetes. Frühestes klinisches Zeichen einer diabetischen Nephropathie ist eine Mikroalbuminurie. Diese korreliert mit einer endothelialen Dysfunktion und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko. Das Risiko für Auftreten und Progression einer diabetischen Nephropathie wird durch eine gute Blutzuckereinstellung vermindert [Scherbaum und Ritz, 2005].

Das Risiko der Nephropathie ist beim Typ-1- und Typ-2-Diabetes gleich hoch. Wegen der größeren Häufigkeit des Typ-2-Diabetes steht die Nephropathie bei dieser Patientengruppe zahlenmäßig im Vordergrund.

Zwischen 1991 und 1999 stieg die Zahl der dialysepflichtigen Diabetiker in allen europäischen Ländern, für die entsprechende Daten vorliegen, kontinuierlich an. Vorwiegend sind ältere Patienten betroffen. In Deutschland wurde vom nationalen Register für das Jahr 2001 [Schober-Halstenberg Jahresbericht 2001 QuaSi-Niere] eine Inzidenz von vier Prozent von dialysepflichtigen Typ-1- und 32 Prozent dialysepflichtigen Typ-2-Diabetikern berichtet. Daten aus Heidelberg [Schwenger et al., 2003] belegen, dass diese Zahlen zu tief gegriffen sind. Die Autoren haben ermittelt, dass 49 Prozent aller Patienten, die zur Nierenersatztherapie kommen, einen Diabetes aufweisen. Davon haben 6,6 Prozent einen Typ-1- und 93,4 Prozent einen Typ-2-Diabetes. Im Raum Heidelberg werden jährlich 98 Diabetiker pro Millionen Einwohner dialysepflichtig; dies ergäbe, hochgerechnet auf Deutschland, etwa 8.000 Patienten pro Jahr.

Für die Behandlung des Diabetes werden seit wenigen Jahren auch Glitazone benutzt, für deren Beurteilung der Verträglichkeit mittlerweile Therapieerfahrungen von weltweit circa zehn Millionen Patienten vorliegen.

Neue Studien zeigen, dass Rosiglitazon die erste effektive orale Substanz ist, um einen Posttransplantationsdiabetes zu vermeiden. Die Mehrheit der Patienten mit Posttransplantationsdiabetes kann sicher mit Rosiglitazon +/- Sulfonylhurea behandelt

werden. Die Wirkung von Rosiglitazon tritt mit einer 3-6 wöchigen Verzögerung nach Gabe ein und bewahrt die meisten Patienten mit Posttransplantationsdiabetes vor einer Langzeit-Insulintherapie. Ein leichtes Ödem trat bei 13 Prozent der Patienten auf, jedoch keine Gewichtszunahme [Villanueva and Baldwin, 2005].

Rosiglitazon ist in Verbindung mit Metformin ein effektives und gut toleriertes Medikament bei schlecht eingestelltem Diabetes mellitus Typ II.

In der vorliegenden Arbeit hatte Rosiglitazon keinen Einfluss auf den Blutzuckerspiegel. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass bei den Ratten kein Diabetes bestand. Kintscher et al. konnten keine signifikanten Änderungen von metabolischen Parametern, wie Cholesterin, Triglyzeride, Insulin und Glukose bei Rosiglitazongabe feststellen [Kintscher et al., 2005]. Sie zeigten in ihrer Studie, dass Rosiglitazon die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen in der Aorta um 61 Prozent reduzierte. Dass bei nichtdiabetischen Tieren unter Therapie mit Glitazonen keine Hypoglykämie zu befürchten ist, wird auch durch Stevenson et al. belegt [Stevenson et al., 1991]. Diese Tatsache, die auch in unserer Arbeit untermauert wird, könnte dazu beitragen, dass der Einsatz der TZD auch auf primär arteriosklerotischen Erkrankungen, unabhängig vom Vorliegen eines Diabetes mellitus, erweitert werden kann.

Die tendenziell niedrigeren Blutzuckerwerte der ligierten Tiere in der vorliegenden Arbeit lassen sich auf den vermehrten Stress, dem die Tiere durch die induzierte Erkrankung ausgesetzt waren, erklären.

#### **4.6 PPAR-gamma**

Seit der Markteinführung in Deutschland im Jahr 2000 haben sich die Glitazone als wirksame und gut verträgliche orale Antidiabetika etabliert. Auch die aktuelle Datenlage zur kardiovaskulären Protektion mit Glitazonen ist vielversprechend.

Die vorwiegend tierexperimentell nachgewiesenen günstigen vaskulären und kardialen Effekte müssen noch klinisch bestätigt werden. Die Frage, in welchem Ausmaß Glitazone die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität positiv beeinflussen, lässt sich nur über große Endpunktstudien klären. Solche Studien wurden bereits gestartet (zum Beispiel PROactive, ADOPT, BARI 2D, VADT, ACCORD, DREAM, RECORD: zusammen mehr als 30.000 Patienten). Mit evidenzbasierten Ergebnissen zum Thema kardiovaskuläre Protektion unter Glitazonen kann daher in ein bis zwei Jahren gerechnet werden.

Wenn sich die pathophysiologischen Vorstellungen als wahr erweisen, wären Glitazone nicht nur zur Senkung von Blutzucker und HbA1c geeignet, sondern auch und besonders, um die wesentlichen Risiken des Diabetikers – die kardiovaskulären Komplikationen – zu reduzieren.

Die nachgewiesene PPAR-gamma-Expression in Nierengewebe lässt ebenfalls bei Nierenerkrankungen einen protektiven Effekt erhoffen, speziell wenn es sich um Erkrankungen handelt, die sich an Nierengefäßen manifestieren.

In der vorliegenden Arbeit kann eine gesteigerte PPAR-gamma-Expression nach UUO nicht bestätigt werden. Ebenso gibt es keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Fibrose und der PPAR-gamma-Expression. Die PPAR-gamma-Expression war unabhängig von Medikamentengabe und Operationsart. Es zeigte sich jedoch eine verminderte Expression des Rezeptors nach 8 Tagen, die nach 25 Tagen wieder den Ausgangswert erreichte.

Einen ähnlichen Verlauf in der Expression von PPAR-gamma fanden Vidal-Puig et al. [Vidal-Puig et al., 1996]. Sie untersuchten die PPAR-gamma-Expression abhängig von der Nahrungsaufnahme (Abbildung 19) und zeigten, dass die Expression von PPAR-gamma-1 und -2 m-RNA und des PPAR-gamma Proteins im Fettgewebe gemeinsam mit Leptin durch Fasten supprimiert wird.

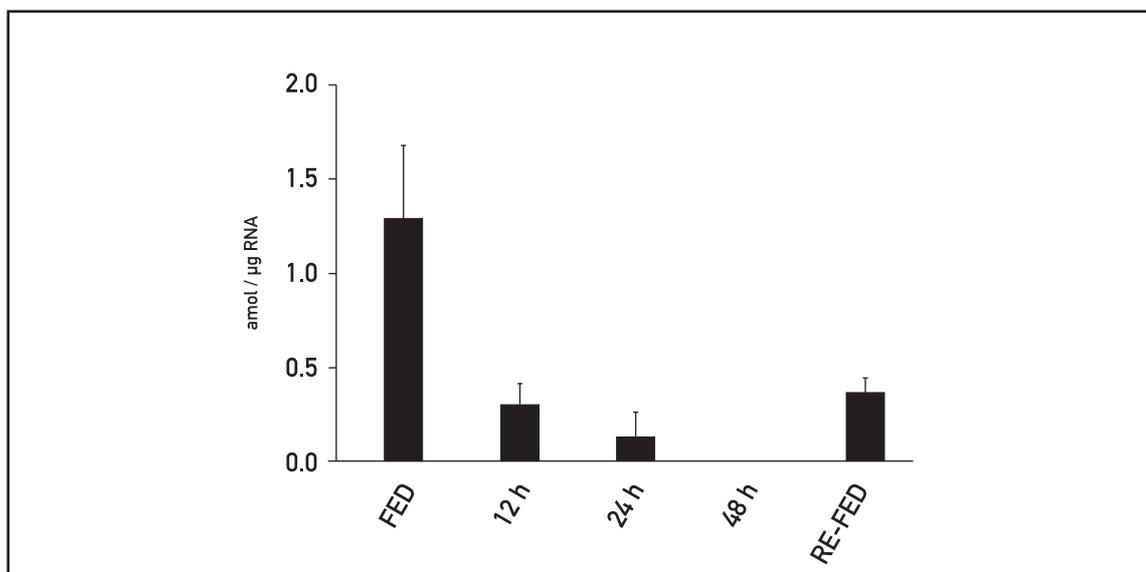


Abbildung 19: PPAR-gamma-Expression 12, 24 und 48 Stunden nach Fütterung (FED) [Vidal-Puig et al., 1996]

In der vorliegenden Arbeit erhielten die Tiere bis zur Operation bzw. Organentnahme Futter ad libitum. Der durchschnittliche Blutzuckerspiegel ergab keinen Hinweis auf

eine Hungerperiode der Tiere. Da junge Tiere verwendet wurden, könnte eine erniedrigte PPAR-gamma-Expression Hinweis auf eine Regulation des Rezeptors in Abhängigkeit von der Wachstumsphase sein.

Interaktionen zwischen dem profibrotischen Angiotensin II und anti-fibrotisch wirkenden PPARs sind bisher nur unvollständig aufgeklärt. Die Kenntnisse dieser Interaktionen könnte von klinischer Bedeutung sein, da ACE-Inhibitoren bzw. AT1-R-Antagonisten und PPAR-Liganden häufig zur Behandlung von kardiovaskulären Risikopatienten eingesetzt werden. Hierbei wären synergistische Interaktionen von großer Bedeutung. So kommt es nach Behandlung mit PPAR-gamma-Liganden zur Repression des AT1-R-Genexpression in glatten Gefäßmuskelzellen [Takeda et al., 2000]. Zusätzlich beeinflussen PPAR-gamma-Liganden die AT1-R-vermittelte Signaltransduktion in vaskulären Zellen [Goetze et al., 1999].

#### **4.7 Die Zelluläre Proliferation und das p27<sup>Kip1</sup>**

Die zelluläre Proliferation wird durch Zellzyklusproteine sowie CDK-Inhibitoren kontrolliert [Shankland et al., 1999, 2000]. Morrissey et al. untersuchten als erste Zellzyklus-Regulatorproteine in Nieren von Ratten mit unilateraler Ureterobstruktion [Morrissey et al., 1996]. Sie haben einen Anstieg des CDK-Inhibitors p21<sup>Kip1</sup> schon 24 Stunden nach Ligatur mit einem Maximum am achten Tag nachweisen können. Ein Jahr später belegten sie durch weitere Experimente am gleichen Modell eine TGF- $\beta_1$  vermittelte Erhöhung der p21<sup>Kip1</sup>-Expression. Diese korrelierte mit einer gesteigerten Bildung von Bindegewebsmatrix. Eine Behandlung der ligierten Tiere mit ACE-Hemmern unterdrückte sowohl die gesteigerte Expression dieses CDK-Inhibitors [Morrissey et al., 1997] als auch die Bildung von Interzellularsubstanz [Ishidoya et al., 1995].

Es wurde gezeigt, dass p27<sup>Kip1</sup> nicht nur bei der Suppression der Zellproliferation eine wichtige Rolle spielt [Polyak et al., 1994], sondern auch bei der Arretierung des Zellzyklus in der späten G<sub>1</sub>-Phase, in welcher es für die zelluläre Hypertrophie und unter bestimmten Bedingungen für die Apoptose verantwortlich ist [Shankland, 2000]. Bei der tubulointerstitiellen Fibrose sind sowohl Proliferation als auch Apoptose tubulärer Zellen und tubulointerstitiell infiltrierende Monozyten/Makrophagen charakteristische Merkmale [Truong et al., 1996, 1998].

Hiromura et al. gehen von einem Schutz der Zelle gegenüber der Apoptose durch Kontrolle der CDK2-Aktivität via p27<sup>Kip1</sup> aus [Hiromura et al., 1999]. Sie fanden in Fibroblasten und Mesangiumzellen von p27<sup>KIP</sup>-knock-out Tieren erstaunlich hohe Apoptoseraten, wenn die Wachstumsfaktoren eliminiert sind. Diese Wirkung wird über Aktivierung des Cyclin A CDK2-Komplexes erreicht, aber nicht über den Cyclin E CDK2-Komplex.

Aus der Literatur ist eine Blockade der Zellzyklusprogression durch PPAR-gamma-Liganden infolge Inhibierung der Cyclin D1- und Cyclin E-abhängigen Kinaseaktivitäten, bekannt. Diese Kinaseaktivitäten werden massgeblich durch Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren reguliert [Morgan et al., 1995]. Die mitogene Induktion des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p21<sup>Kip1</sup> ist für die Zellzyklusprogression und nachfolgende Proliferation erforderlich [Weiss et al., 2000].

Studien zeigen, dass die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren innerhalb Stunden oder einiger Tage nach Ligatur ihren Höchststand erreicht und danach konstant abnimmt [Marshall et al., 1991]. Durch Infusion von Wachstumsfaktoren wird die tubuläre Apoptose bei Ratten nach UUO unterdrückt [Kennedy et al., 1997]. In Anwesenheit von Wachstumsfaktoren in der frühen Phase können „sensibilisierte“ Zellen proliferieren, während das Fehlen von Wachstumsfaktoren später zur Apoptose führt. Für beide Vorgänge ist die p27<sup>Kip1</sup>-Suppression eine Voraussetzung.

Das erhöhte Apoptose- und Proliferationsraten auch in Gegenwart einer erhöhten p27<sup>Kip1</sup>-Expression zu finden sind, liegt in erster Linie an der unterschiedlichen zellulären Expression von p27<sup>Kip1</sup>. Während in einzelnen Zellpopulationen eine schwächere p27<sup>Kip1</sup>-Expression vorliegt, kommt es in anderen zu einer massiven Überexpression. p27<sup>Kip1</sup> könnte hochreguliert werden als Reaktion auf lokal aktive Stimuli, z.B. Angiotensin II und dadurch Zellen, die p27<sup>Kip1</sup> exprimieren, daran hindern aus der G<sub>1</sub>-Phase in die nächste Phase des Zellzyklus überzutreten. Dies würde den konstanten Anstieg von p27<sup>Kip1</sup> bis zum 25 Tag nach UUO erklären. p27<sup>Kip1</sup>-exprimierende Zellen könnten im späten Stadium der UUO zu der Matrixproduktion beitragen. Die in der vorliegenden Untersuchung verwendete Immunoblot-Technik zeigte eine bis zum 8,5-fachen erhöhte p27-Expression nach Ligatur mit einem Maximum 25 Tage nach Ligatur.

Die Verabreichung der verschiedenen Konzentrationen von Rosiglitazon mit der Nahrung führt zu keiner signifikanten Veränderung der p27-Expression. Somit kann ein

Einfluss des PPAR-gamma Agonisten Rosiglitazon auf die p27<sup>Kip1</sup>-Expression nicht nachgewiesen werden.

## 5 Zusammenfassung

Ein pathogenetischer Hauptfaktor von Nierenerkrankungen, der in hohem Maß mit der Nierenfunktion korreliert, ist die interstitielle Nierenfibrose. Bei der Ausbildung der Fibrose kommt es, ähnlich wie bei anderen chronischen Entzündungsprozessen, zunächst zur Invasion entzündlicher Zellen mit nachfolgenden Proliferationsvorgängen tubulointerstitieller Zellen und vermehrter Bildung sowie vermindertem Abbau extrazellulärer Matrix.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Rosiglitazon, einem PPAR-gamma-Liganden, auf die interstitielle Fibrose im Modell der unilateralen Ureterligatur untersucht. Das Hauptanliegen der Arbeit war es, einen protektiven Effekt von Rosiglitazon auf den Verlauf einer nichtdiabetischen Nierenerkrankung zu untersuchen. Weiterhin sollte der Einfluss des Medikaments auf die Expression der Proteine MCP-1 und p27<sup>Kip1</sup> sowohl in der frühen, wie auch in der späten Phase des Fibrosierungsprozesses untersucht werden. Es sollte herausgefunden werden, ob die MCP-1- und p27<sup>Kip1</sup>-Expression mit dem Grad der Fibrosierung korreliert, und ob diese sich durch Gabe von 0,5 bzw. 10 mg Rosiglitazon/kg Kg supprimieren lassen.

Als Ergebnis der vorliegenden Arbeit kann festgestellt werden:

1. Die interstitielle Fibrose, die mittels Hydroxyprolinegehalt der Nieren gemessen wurde, ist 25 Tage nach Operation am ausgeprägtesten. Gegenüber der kontralateralen Seite der operierten Tiere zeigen scheinoperierte Tiere eine gewisse Fibrosierungstendenz.
2. Die MCP-1- und p27<sup>Kip1</sup>-Expression ist 8 Tage, vor allem aber 25 Tage nach der Operation erhöht. Diese Tatsache spricht für eine entzündliche Reaktion auf die Ureterligatur im Fibrosierungsprozess und für eine Hemmung der Zellproliferation. Die Expression von MCP-1- und p27<sup>Kip1</sup> korreliert gut mit dem Grad der Fibrosierung.
3. Die Therapie mit Rosiglitazon zeigte weder einen signifikanten Effekt auf die Ausbildung der Nierenfibrose noch auf die MCP-1 und p27<sup>Kip1</sup>-Expression.

4. Die Expression von PPAR-gamma war am 8. postoperativen Tag vermindert und kann als Hinweis auf eine besondere Stoffwechsellage während des Wachstums gedeutet werden. Daraus ergeben sich neue Ansatzpunkte in der Betrachtung dieses Rezeptors. Weitere Studien müssen die Expression in Abhängigkeit des Wachstums darstellen. Glitazone könnten daher in bestimmten Altersgruppen besonders wirksam sein.
5. Die Plasma-Renin-Aktivität zeigte sich nach UUO deutlich erniedrigt. Tendenziell zeigte sich eine Abhängigkeit der Plasmareninaktivität von der Rosiglitazongabe; inwiefern ein Zusammenhang besteht, bleibt spekulativ und muss anhand weiterführender Untersuchungen überprüft werden.

Die erarbeiteten Daten weisen darauf hin, dass die Induktion von MCP-1 und p27<sup>Kip1</sup> im Modell der UUO eine intrinsische Antwort tubulärer, interstitieller Zellen auf die „Verletzung“ darstellt. Es konnte kein Zusammenhang zwischen erhöhter Expression von MCP-1 und p27<sup>Kip1</sup> sowie der Rosiglitazongabe hergestellt werden. Keine der eingesetzten Dosierungen des Medikaments hat die Fibrose in den Nieren mit unilateraler Ureterligatur verhindern bzw. abschwächen können.

Weitere Studien werden benötigt, um die genaue Rolle von PPAR-gamma, MCP-1 und p27<sup>Kip1</sup> in der Pathogenese akuter und chronischer Nierenschädigungen, sowie bei der Modulation des programmierten Zelltodes zu bestimmen.

## 6 Literaturverzeichnis

Ahnoff M, Grundevik I, Arfwidsson A, Fonselius J and Persson BA. (1981) Derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan for liquid chromatographic determination of hydroxyproline in collagen hydrolysate. *Anal Chem.* 53:485-9.

Akanuma Y, Kosaka K and Kuzuya T. (1993) Clinical evaluation of a new oral hypoglycemic agent CS-045 in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus poorly controlled by sulphonylureas: A dose finding by dose increasing method. *J. Clin. Ther. Med.* 9 (suppl 3):39-60.

Asano T, Wakisaka M, Yoshinari M, Iino K, Sonoki K, Iwase M and Fujishima M. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPAR-gamma1) expresses in rat mesangial cells and PPAR-gamma agonists modulate its differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1497:148-54.

Auwerx J. (1999) PPAR-gamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia.* 42:1033-49.

Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M and Draetta G. (1993) Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* 7:812-21.

Blaschke F, Bruemmer D and Law RE. (2004) Will the potential of peroxisome proliferator-activated receptor agonists be realized in the clinical setting? *Clin Cardiol.* 27(7 Suppl 4):IV3-10.

Bohle A, Strutz F and Muller GA. (1994) On the pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulopathies: a view from the interstitium. *Exp Nephrol.* 2:205-10.

Bohle A, Kressel G, Muller CA and Muller GA. (1989) The pathogenesis of chronic renal failure. *Pathol Res Pract.* 185:421-40.

Bohle A, Muller GA, Wehrmann M, Mackensen-Haen S and Xiao JC. (1996) Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies, and chronic interstitial nephritides. *Kidney Int.* 54:S2-9.

Brown KK, Henke BR, Blanchard SG, Cobb JE, Mook R, Kaldor I, Kliewer SA, Lehmann JM, Lenhard JM, Harrington WW, Novak PJ, Faison W, Binz JG, Hashim MA, Oliver WO, Brown HR, Parks DJ, Plunket KD, Tong WQ, Menius JA, Adkison K, Noble SA and Willson TM. (1999) A novel N-aryl tyrosine activator of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma reverses the diabetic phenotype of the Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes.* 48:1415-24.

- Buckingham RE, Al-Barazanji KA, Toseland CD, Slaughter M, Connor SC, West A, Bond B, Turner NC and Clapham JC. (1998) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, protects against nephropathy and pancreatic islet abnormalities in Zucker fatty rats. *Diabetes*. 47:1326-34.
- Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW and Medford RM. (1998) Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 83:952-9.
- Cheng J, Diaz Encarnacion MM, Warner GM, Gray CE, Nath KA and Grande JP. (2005) TGF-beta1 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression in mesangial cells through a phosphodiesterase isoenzyme 4-dependent process. *Am J Physiol Cell Physiol*. 289:C959-70.
- Chevalier RL, Thornhill BA, Chang AY, Cachat F and Lackey A. (2002) Recovery from release of ureteral obstruction in the rat: relationship to nephrogenesis. *Kidney Int*. 61:2033-43.
- Chobanian AV and Hill M. (2000) National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop on Sodium and Blood Pressure : a critical review of current scientific evidence. *Hypertension*. 35:858-63.
- Chun OY, Ning JP and Zhou QL. (2004) Expression and significance of monocyte chemoattractant protein-1 in rat kidney with unilateral ureteral obstruction. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 29:558-61.
- Coleman TR and Dunphy WG. (1994) Cdc2 regulatory factors. *Curr Opin Cell Biol*. 6:877-82.
- Crisman JM, Richards LL, Valach DP, Franzoni DF and Diamond JR. (2001) Chemokine expression in the obstructed kidney. *Exp Nephrol*. 9:241-8.
- Daugherty A, Manning MW and Cassis LA. (2000) Angiotensin II promotes arteriosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest*. 105:1605-12.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW and Unger T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 52:415-72.
- Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH and Dzau VJ. (1996) Increased accumulation of tissue ACE in human arteriosclerotic coronary artery disease. *Circulation*. 94:2756-67.
- Döhler G und Zink J. (1983) Trennung von o-Phthalaldehyd-Derivaten freier Aminosäuren aus Mikroorganismen-Extrakten mittels HPLC. *Beckman Instr. Reports* 1: 5-7

Dorffel Y, Latsch C, Stuhlmüller B, Schreiber S, Scholze S, Burmester GR and Scholze J. (1999) Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. *Hypertension*. 34:113-7.

Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM, Tan MH, Lefebvre PJ, Murray GD, Standl E, Wilcox RG, Wilhelmsen L, Betteridge J, Birkeland K, Golay A, Heine RJ, Koranyi L, Laakso M, Morkan M, Norkus A, Pirags V, Podar T, Scheen A, Scherbaum W, Schernthaner G, Schmitz O, Skrha J, Smith U, Taton J and PROactive investigators. (2005) Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitazone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet*. 366:1279-89.

Draetta G. (1993) Cdc2 activation: the interplay of cyclin binding and Thr161 phosphorylation. *Trends Cell Biol*. 3:287-9.

Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G and Wahli W. (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 68:879-87.

Eblen ST, Fautsch MP, Burnette RJ, Joshi P and Leof EB. (1994) Cell cycle-dependent inhibition of p34cdc2 synthesis by transforming growth factor beta 1 in cycling epithelial cells. *Cell Growth Differ*. 5:109-16.

Eddy AA. (1996) Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 7:2495-508.

Eddy AA and Giachelli CM. (1995) Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. *Kidney Int*. 47:1546-57.

Eiam-Ong S, Udom J, Sueblinvong T and Eiam-Ong S. (2005) Apoptosis of circulating lymphocyte in rats with unilateral ureteral obstruction: role of angiotensin II. *Nephrology (Carlton)*. 10:464-9.

el-Dahr SS, Gomez RA, Khare G, Peach MJ, Carey RM and Chevalier RL. (1990) Expression of renin and its m-RNA in the adult rat kidney with chronic ureteral obstruction. *Am J Kidney Dis*. 15:575-82.

el-Dahr SS, Gee J, Dipp S, Hanss BG, Vari RC and Chao J. (1993) Upregulation of renin-angiotensin system and downregulation of kallikrein in obstructive nephropathy. *Am J Physiol*. 264:F874-81.

Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushima H, Kato J and Livingston DM. (1993) Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell*. 73:487-97.

Fern RJ, Yesko CM, Thornhill BA, Kim HS, Smithies O and Chevalier RL. (1999) Reduced angiotensinogen expression attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy in mice. *J Clin Invest*. 103:39-46.

Frei U und Schober-Halstenberg HJ. (2003/2004) Nierenersatztherapie in Deutschland: Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland. QuaSi Niere, Druck Dezember 2004; ISBN 3-9809996-O-2

Fujii M, Takemura R, Yamaguchi M, Hasegawa G, Shigeta H, Nakano K and Kondo M. (1997) Troglitazone (CS-045) ameliorates albuminuria in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism*. 46:981-3.

Geng Y and Weinberg RA. (1993) Transforming growth factor beta effects on expression of G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:10315-9.

Girard MT, Matsubara M and Fini ME. (1991) Transforming growth factor-beta and interleukin-1 modulate metalloproteinase expression by corneal stromal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 32:2441-54.

Goetze S, Xi XP, Graf K, Fleck E, Hsueh WA and Law RE. (1999) Troglitazone inhibits angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 nuclear translocation and activation in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 452:277-82.

Guan Y and Breyer MD. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney Int*. 60:14-30.

Grafe M, Auch-Schwelk W, Zakrzewicz A, Regitz-Zagrosek V, Bartsch P, Graf K, Loebe M, Gaehtgens P and Fleck E. (1997) Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin. *Circ Res*. 81:804-11.

Hahn AW, Jonas U, Buhler FR and Resink TJ. (1994) Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett*. 347:178-80.

Halabi CM and Sigmund CD. (2005) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma and its Agonists in Hypertension and Atherosclerosis : Mechanisms and Clinical Implications. *Am J Cardiovasc Drugs*. 5:389-98.

Hannken T, Schroeder R, Stahl RA and Wolf G. (1998) Angiotensin II-mediated expression of p27Kip1 and induction of cellular hypertrophy in renal tubular cells depend on the generation of oxygen radicals. *Kidney Int*. 54:1923-33.

Hatsukari I, Hitosugi N, Dinda A, Maddula RR, Tan R and Singhal PC. (2005) Morphine modulates monocyte-macrophage conversion phase: implications in obstructive nephropathy. *J Leukoc Biol*. 1:620-650

- Hayek T, Attias J, Coleman R, Brodsky S, Smith J, Breslow JL and Keidar S. (1999) The angiotensin-converting enzyme inhibitor, fosinopril, and the angiotensin II receptor antagonist, losartan, inhibit LDL oxidation and attenuate arteriosclerosis independent of lowering blood pressure in apolipoprotein E deficient mice. *Cardiovasc Res.* 44:579-87.
- Hengst L and Reed SI. (1996) Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science.* 271:1861-4.
- Hiomura K, Pippin JW, Fero ML, Roberts JM and Shankland SJ. (1999) Modulation of apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *J Clin Invest.* 103:597-604.
- Hsu CH, Kurtz TW, Rosenzweig J and Weller JM. (1977) Intrarenal hemodynamics and ureteral pressure during ureteral obstruction. *Invest Urol.* 14:442-5.
- Imano E, Kanda T, Nakatani Y, Nishida T, Arai K, Motomura M, Kajimoto Y, Yamasaki Y and Hori M. (1998) Effect of troglitazone on microalbuminuria in patients with incipient diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 21:2135-9.
- Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R and Klahr S. (1996) enalapril halts tubulointerstitial fibrosis in rats with obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 49:1110-9.
- Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Reyes A and Klahr S. (1995) Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 47:1285-94.
- Issemann I and Green S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 347:645-50.
- Ishii K, Yamagami S, Tanaka H, Motoki M, Suwa Y and Endo N. (1995) Full active baculovirus-expressed human monocyte chemoattractant protein 1 with the intact N-terminus. *Biochem Biophys Res Commun.* 206:955-61.
- Itoh H, Doi K, Tanaka T, Fukunaga Y, Hosoda K, Inoue G, Nishimura H, Yoshimasa Y, Yamori Y and Nakao K. (1999) Hypertension and insulin resistance: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 26:558-60.
- Jiang C, Ting AT and Seed B. (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 391:82-6.

- Johnson RJ, Iida H, Alpers CE, Majesky MW, Schwartz SM, Pritzl P, Gordon K and Gown AM. (1991) Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. Alpha-smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation. *J Clin Invest.* 87:847-58.
- Kaneto H, Morrissey J, McCracken R, Reyes A and Klahr S. (1994) Enalapril reduces collagen type IV synthesis and expansion of the interstitium in the obstructed rat kidney. *Kidney Int.* 45:1637-47.
- Kato JY and Sherr CJ. (1993) Inhibition of granulocyte differentiation by G1 cyclins D2 and D3 but not D1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:11513-7.
- Klahr S and Morrissey JJ. (1997) Comparative study of ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in interstitial scarring. *Kidney Int Suppl.* 63:S111-4.
- Klahr S and Morrissey J. (2002) Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283:F861-75.
- Klahr S, Ishidoya S and Morrissey J. (1995) Role of angiotensin II in the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 26:141-6.
- Kennedy WA 2nd, Buttyan R, Garcia-Montes E, D'Agati V, Olsson CA and Sawczuk IS. (1997) Epidermal growth factor suppresses renal tubular apoptosis following ureteral obstruction. *Urology.* 49:973-80.
- Kintscher U and Unger T. (2005) Vascular protection in diabetes: a pharmacological view of angiotensin II type 1 receptor blockers. *Acta Diabetol.* 42 (Suppl 1):S26-32.
- Kintscher U, Wakino S, Kim S, Fleck E, Hsueh WA and Law RE. (2001) Angiotensin II induces migration and Pyk2/paxillin phosphorylation of human monocytes. *Hypertension.* 37:587-93.
- Koo JW, Kim Y, Rozen S and Mauer M. (2003) Enalapril accelerates remodeling of the renal interstitium after release of unilateral ureteral obstruction in rats. *J Nephrol.* 16:203-9.
- Krishnamurti CR, Heindze AM and Galzy G. (1984) Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with o-phthalaldehyde for the quantitative analysis of amino acids in adult and fetal sheep plasma, animal feeds and tissues. *J Chromatogr.* 315:321-31.
- Lee K and Garcia-Lopez JS. (1990) Non-everted oxygenated rat intestinal segments as a measure of neutral detergent fiber effects on iron absorption. *J Nutr Biochem.* 1:648-52.

- Lenda K and Svenneby G. (1980) Rapid high-performance liquid chromatographic determination of amino acids in synaptosomal extracts. *J Chromatogr.* 198:516-9.
- Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman BE, Herren B, Orth K, Roberts JM and Ross R. (1998) Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell.* 1:553-63.
- Liu M, Wikonkal NM and Brash DE. (1999) Induction of cyclin-dependent kinase inhibitors and G(1) prolongation by the chemopreventive agent N-acetylcysteine. *Carcinogenesis.* 20:1869-72.
- Liu ZG, Haelens A, Wuys A, Struyf S, Pang XW, Proost P, Chen WF and van Damme J. (1996) Isolation of a lymphocyte chemotactic factor produced by the murine thymic epithelial cell line MTEC1: identification as a 30 kDa glycosylated form of MCP-1. *Eur Cytokine Netw.* 7:381-8.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL and RANDALL RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-75.
- Luster AD. (1998) Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 338:436-45.
- Ma LJ, Marcantoni C, Linton MF, Fazio S and Fogo AB. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist troglitazone protects against nondiabetic glomerulosclerosis in rats. *Kidney Int.* 59:1899-910.
- Makino H, Kashihara N, Sugiyama H, Kanao K, Sekikawa T, Shikata K, Nagai R and Ota Z. (1995) Phenotypic changes of the mesangium in diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications.* 9:282-4.
- Margeli A, Kouraklis G and Theocharis S. (2003) Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands and angiogenesis. *Angiogenesis.* 6:165-9.
- Marshall SM, Flyvbjerg A, Frystyk J, Korsgaard L and Orskov H. (1991) Renal insulin-like growth factor I and growth hormone receptor binding in experimental diabetes and after unilateral nephrectomy in the rat. *Diabetologia.* 34:632-9.
- Matsushima K and Oppenheim JJ. (1989) Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine.* 1:2-13.
- McCarthy KJ, Routh RE, Shaw W, Walsh K, Welbourne TC and Johnson JH. (2000) Troglitazone halts diabetic glomerulosclerosis by blockade of mesangial expansion. *Kidney Int.* 58:2341-50.

- Meikrantz W and Schlegel R. (1995) Apoptosis and the cell cycle. *J Cell Biochem.* 58:160-74
- Modi KS, Morrissey J, Shah SV, Schreiner GF and Klahr S. (1990) Effects of probucol on renal function in rats with bilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 38:843-50.
- Morgan DO. (1995) Principles of CDK regulation. *Nature.* 374:131-4.
- Moriyama T, Kawada N, Nagatoya K, Takeji M, Horio M, Ando A, Imai E and Hori M. (2001) Fluvastatin suppresses oxidative stress and fibrosis in the interstitium of mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 59:2095-103.
- Morrissey JJ and Klahr S. (1997) Rapid communication. Enalapril decreases nuclear factor kappa B activation in the kidney with ureteral obstruction. *Kidney Int.* 52:926-33.
- Morrissey JJ and Klahr S. (1999) Effect of AT2 receptor blockade on the pathogenesis of renal fibrosis. *Am J Physiol.* 276:F39-45
- Morrissey JJ, Ishidoya S, McCracken R and Klahr S. (1996) The effect of ACE inhibitors on the expression of matrix genes and the role of p53 and p21 (WAF1) in experimental renal fibrosis. *Kidney Int Suppl.* 54:S83-7.
- Nagle RB, Bulger RE, Cutler RE, Jervis HR and Benditt EP. (1973) Unilateral obstructive nephropathy in the rabbit. I. Early morphologic, physiologic, and histochemical changes. *Lab Invest.* 28:456-67.
- Naito J, Kaji H, Sowa H, Hendy GN, Sugimoto T and Chihara K. (2004) Menin suppresses osteoblast differentiation by antagonizing the AP-1 factor, JunD. *J Biol Chem.* 15:5634-73.
- Newton CR and Graham A. (1994) PCR, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford, ISBN 3-8274-0190-9
- Nitta K, Horita S, Honda K, Uchida K, Watanabe T, Nihei H and Nagata M. (1999) Glomerular expression of cell-cycle-regulatory proteins in human crescentic glomerulonephritis. *Virchows Arch.* 435:422-7.
- Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR and Roberts JM. (1994) Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature.* 372:570-3.
- Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM and Pagano M. (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol.* 15:2612-24.

- Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, Yanagitani Y, Takiuchi S, Moriguchi K, Fennessy PA, Higaki J and Ogihara T. (1999) Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J Hypertens.* 17:537-45.
- Ophascharoensuk V, Pippin JW, Gordon KL, Shankland SJ, Couser WG and Johnson RJ. (1998) Role of intrinsic renal cells versus infiltrating cells in glomerular crescent formation. *Kidney Int.* 54:416-25.
- Ouali F, Djouadi F, Merlet-Benichou C and Bastin J. (1998) Dietary lipids regulate beta-oxidation enzyme gene expression in the developing rat kidney. *Am J Physiol.* 275:F777-84.
- Pagano M, Draetta G and Jansen-Durr P. (1992) Association of cdk2 kinase with the transcription factor E2F during S phase. *Science.* 255:1144-7.
- Pagano M, Pepperkok R, Lukas J, Baldin V, Ansorge W, Bartek J and Draetta G. (1993) Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol.* 121:101-11.
- Palmerini CA, Fini C, Floridi A, Morelli H and Vedovelli A. (1985) High-performance liquid chromatographic analysis of free hydroxyproline and proline in blood plasma and of free and peptide-bound hydroxyproline in urine. *J Chromatogr.* 339:285-92.
- Panzer U, Schneider A, Wilken J, Thompson DA, Kent SB and Stahl RA. (1999) The chemokine receptor antagonist AOP-RANTES reduces monocyte infiltration in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 56:2107-15.
- Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, Toniato E, Alesse E, Bravi MC, Ferri C, Desideri G, Gulino A and Santucci A. (1999) Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation.* 100:1646-52.
- Pestell RG, Albanese C, Reutens AT, Segall JE, Lee RJ and Arnold A. (1999) The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocr Rev.* 20:501-34.
- Pimentel JL Jr, Wang S and Martinez-Maldonado M. (1994) Regulation of the renal angiotensin II receptor gene in acute unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 45:1614-21.
- Pimentel JL Jr, Montero A, Wang S, Yosipiv I, el-Dahr S and Martinez-Maldonado M. (1995) Sequential changes in renal expression of renin-angiotensin system genes in acute unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 48:1247-53.

- Pine R and Darnell JE Jr. (1989) In vivo evidence of interaction between interferon-stimulated gene factors and the interferon-stimulated response element. *Mol Cell Biol.* 9:3533-7.
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM and Koff A. (1994) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 8:9-22.
- Portilla D, Dai G, Peters JM, Gonzalez FJ, Crew MD and Proia AD. (2000) Etomoxir-induced PPAR-alpha-modulated enzymes protect during acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 278:F667-75.
- Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF and Michel JB. (2000) Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:645-51.
- Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF and Sherr CJ. (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev.* 7:1559-71.
- Qureshi GA, Fohlin L and Bergstrom J. (1984) Application of high-performance liquid chromatography to the determination of free amino acids in physiological fluids. *J Chromatogr.* 297:91-100.
- Reaven GM. (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 37:1595-607.
- Reddy JK, Azarnoff DL and Hignite CE. (1980) Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens. *Nature.* 283:397-8.
- Reyes AA, Porras BH, Chasalow FI and Klahr S. (1994) L-arginine decreases the infiltration of the kidney by macrophages in obstructive nephropathy and puromycin-induced nephrosis. *Kidney Int.* 45:1346-54.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ and Glass CK. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 391:79-82.
- Risdon RA, Sloper JC and De Wardener HE. (1968) Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet.* 2:363-6.
- Ritz E, Rychlik I, Locatelli F and Halimi S. (1999) End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis.* 34:795-808.

- Rollins BJ, Walz A and Baggiolini M. (1991) Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood*. 78:1112-6.
- Rovin BH, Harris KP, Morrison A, Klahr S and Schreiner GF. (1990) Renal cortical release of a specific macrophage chemoattractant in response to ureteral obstruction. *Lab Invest*. 63:213-20.
- Schainuck LI, Striker GE, Cutler RE and Benditt EP. (1970) Structural-functional correlations in renal disease. II. The correlations. *Hum Pathol*. 1:631-41.
- Scherbaum W und Ritz E. (2005) Prävention und Therapie der diabetischen Nephropathie *Deutsches Ärzteblatt* 102, Ausgabe 3, Seite A-137 / B-113 / C-109 MEDIZIN
- Schieffler B, Schieffler E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J and Harringer Wand Drexler H. (2000) Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary arteriosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation*. 101:1372-8.
- Schober-Halstenberg HJ: Jahresbericht 2001 QuaSi-Niere, <http://www.quasi-niere.de/deutsch/bericht/01/world.html> 2002.
- Schreiner GF, Harris KP, Purkerson ML and Klahr S. (1988) Immunological aspects of acute ureteral obstruction: immune cell infiltrate in the kidney. *Kidney Int*. 34:487-93.
- Schwenger V, Hofmann A, Khalifeh N, Meyer T, Zeier M, Horl WH und Ritz E. (2003) Urämische Patienten – späte Überweisung, früher Tod. *Dtsch Med Wochenschr*. 128:1216–20
- Sewing A, Burger C, Brusselbach S, Schalk C, Lucibello FC and Muller R. (1993) Human cyclin D1 encodes a labile nuclear protein whose synthesis is directly induced by growth factors and suppressed by cyclic AMP. *J Cell Sci*. 104:545-55.
- Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B and Weinstein IB. (2000) Multiple functions of p27(Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol*. 183:18-27.
- Sommer M and Funfstuck R. (1997) Pathogenesis of interstitial kidney fibrosis. Studies in the rat model of unilateral ureteral obstruction *Med Klin (Munich)*. 92:582-8.
- Sommer M, Eismann U, Gerth J and Stein G. (2002) Interleukin 4 co-stimulates the PDGF-BB- and bFGF-mediated proliferation of mesangial cells and myofibroblasts. *Nephron*. 92:868-80.

- Sommer M, Schaller R, Funfstuck R, Bohle A, Bohmer FD, Muller GA and Stein G. (1999) Abnormal growth and clonal proliferation of fibroblasts in an animal model of unilateral ureteral obstruction. *Nephron*. 82:39-50.
- Shankland SJ and Al'Douahji M. (1999) Cell cycle regulatory proteins in glomerular disease. *Exp Nephrol*. 7:207-11.
- Shankland SJ and Wolf G. (2000) Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 278: F515-F529,
- Shankland SJ, Eitner F, Hudkins KL, Goodpaster T, D'Agati V and Alpers CE. (2000) Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in human glomerular disease: role in podocyte proliferation and maturation. *Kidney Int*. 58:674-83.
- Shankland SJ, Pippin J, Flanagan M, Coats SR, Nangaku M, Gordon KL, Roberts JM, Couser WG and Johnson RJ. (1997) Mesangial cell proliferation mediated by PDGF and bFGF is determined by levels of the cyclin kinase inhibitor p27Kip1. *Kidney Int*. 51:1088-99.
- Sharma AK, Mauer SM, Kim Y and Michael AF. (1993) Interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int*. 44:774-88.
- Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM and Clurman BE. (1997) Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev*. 11:1464-78.
- Sherr CJ. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell*. 73:1059-65.
- Sherr CJ. (1995) Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc Assoc Am Physicians*. 107:181-6
- Stein G, Sperschneider H, Funfstuck R and Haufe C. (1996) Nephrology update-I. Causes and possibilities of modifying the progression of chronic renal failure. *Med Klin (Munich)*. 91 (Suppl 1):153-8.
- Stevenson RW, McPherson RK, Genereux PE, Danbury BH and Kreutter DK. (1991) Antidiabetic agent englitazone enhances insulin action in nondiabetic rats without producing hypoglycemia. *Metabolism*. 40:1268-74.
- Strutz F, Zeisberg M, Hemmerlein B, Sattler B, Hummel K, Becker V and Muller GA. (2000) Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney Int*. 57:1521-38.

- Takeda M, Babazono T, Nitta K and Iwamoto Y. (2001) High glucose stimulates hyaluronan production by renal interstitial fibroblasts through the protein kinase C and transforming growth factor-beta cascade. *Metabolism*. 50:789-94.
- Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Funakoshi Y, Iino N, Hirano K, Kanaide H and Takeshita A. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators downregulate angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 102:1834-9.
- Tam FW, Sanders JS, George A, Hammad T, Miller C, Dougan T, Cook HT, Kallenberg CG, Gaskin G, Levy JB and Pusey CD. (2004) Urinary monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is a marker of active renal vasculitis. *Nephrol Dial Transplant*. 19:2761-8.
- Truong LD, Foster SV, Barrios R, D'Agati V, Verani RR, Gonzalez JM and Suki WN. (1996) Tenascin is an ubiquitous extracellular matrix protein of human renal interstitium in normal and pathologic conditions. *Nephron*. 72:579-86.
- Truong LD, Sheikh-Hamad D, Chakraborty S and Suki WN. (1998) Cell apoptosis and proliferation in obstructive uropathy. *Semin Nephrol*. 18:641-51.
- Truong LD, Choi YJ, Tsao CC, Ayala G, Sheikh-Hamad D, Nassar G and Suki WN. (2001) Renal cell apoptosis in chronic obstructive uropathy: the roles of caspases. *Kidney Int*. 60:924-34.
- Vaughan ED Jr, Marion D, Poppas DP and Felsen D. (2004) Pathophysiology of unilateral ureteral obstruction: studies from charlottesville to new york. *J Urol*. 172:2563-9.
- Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS and Moller DE. (1996) Regulation of PPAR-gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest*. 97:2553-61.
- Villanueva G and Baldwin D. (2005) Rosiglitazone therapy of posttransplant diabetes mellitus. *Transplantation*. 80:1402-5.
- Villiger PM, Terkeltaub R and Lotz M. (1992) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression in human articular cartilage. Induction by peptide regulatory factors and differential effects of dexamethasone and retinoic acid. *J Clin Invest*. 90:488-96.
- Watanabe Y and Imai K. (1982) Precolumn labeling for HPLC of amino acids with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole and application to protein hydrolysates. *J. Chrom.* F239:723-732

- Weiss RH, Joo A and Randour C. (2000) p21(Waf1/Cip1) is an assembly factor required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem.* 275:10285-90.
- Wendt T, Zhang YM, Bierhaus A, Kriegsmann J, Deng Y, Waldherr R, Teske T, Luther T, Funfstuck R and Nawroth PP. (1995) Tissue factor expression in an animal model of hydronephrosis. *Nephrol Dial Transplant.* 10:1820-8.
- Wenzel U, Dominiak P, Neumayer HH und Wolf G. (2003) Hemmung der Progression von chronischen Nierenerkrankungen: Therapie durch Blockierung des Renin-Angiotensin-Systems. *Deutsches Ärzteblatt* 100, Ausgabe 31-32, Seite A-2072 / B-1725 / C-1629MEDIZIN
- Wolf G. (1998) Angiotensin II is involved in the progression of renal disease: importance of non-hemodynamic mechanisms. *Nephrologie.* 19:451-6.
- Wolf G and Stahl RA. (1996) Angiotensin II-stimulated hypertrophy of LLC-PK1 cells depends on the induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Kidney Int.* 50:2112-9.
- Wolf G, Schroeder R, Ziyadeh FN, Thaiss F, Zahner G and Stahl RA. (1997) High glucose stimulates expression of p27Kip1 in cultured mouse mesangial cells: relationship to hypertrophy. *Am J Physiol.* 273:F348-56.
- Won KA, Xiong Y, Beach D and Gilman MZ. (1992) Growth-regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:9910-4.
- Xiong Y, Zhang H and Beach D. (1992) D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell.* 71:505-14.
- Yang T, Michele DE, Park J, Smart AM, Lin Z, Brosius FC 3rd, Schnermann JB and Briggs JP. (1999) Expression of peroxisomal proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the kidney. *Am J Physiol.* 277:F966-73.
- Yoshimoto T, Naruse M, Nishikawa M, Naruse K, Tanabe A, Seki T, Imaki T, Demura R, Aikawa E and Demura H. (1997) Antihypertensive and vasculo- and renoprotective effects of pioglitazone in genetically obese diabetic rats. *Am J Physiol.* 272:E989-96.
- Zafiriou S, Stanners SR, Saad S, Polhill TS, Poronnik P and Pollock CA. (2005) Pioglitazone inhibits cell growth and reduces matrix production in human kidney fibroblasts. *J Am Soc Nephrol.* 16:638-45.

Zhang H, Zhang A, Kohan DE, Nelson RD, Gonzalez FJ and Yang T. (2005) Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks thiazolidinedione-induced fluid retention. Proc Natl Acad Sci U S A. 102:9406-11.

## 7 Daten

### 7.1 Mittlerer systolischer Blutdruck

Tabelle 2: Darstellung der Blutdruckmittelwerte [mmHg]

	Keine UO			UO		
	3 Tage	8 Tage	25 Tage	3 Tage	8 Tage	25 Tage
<b>Placebo</b>	129	131	119	148	146	131
<b>0,5 Rosi</b>	119	150	121	144	136	130
<b>10 Rosi</b>	118	132	118	135	138	142

### 7.2 Zucker

Tabelle 3: Darstellung der Blutzuckermittelwerte [mmol/l]

	Keine UO			UO		
	3 Tage	8 Tage	25 Tage	3 Tage	8 Tage	25 Tage
<b>Placebo</b>	7,46	6,26	8,08	6,92	7,50	5,98
<b>0,5 Rosi</b>	7,92	7,26	7,92	7,17	8,26	6,64
<b>10 Rosi</b>	8,64	8,58	7,02	6,65	7,47	5,78

### 7.3 Urin

Tabelle 4: Darstellung der Urinvolumenmittelwerte [ml]

	Keine UO			UO		
	3 Tage	8 Tage	25 Tage	3 Tage	8 Tage	25 Tage
<b>Placebo</b>	2,8	8,5	7,8	5,2	8,4	8,2
<b>0,5 Rosi</b>	4,8	4,8	8,2	7,6	9,5	10,5
<b>10 Rosi</b>	5,5	9,8	9,0	6,5	10,4	8,4

## 7.4 Plasma-Renin-Aktivität

Tabelle 5: Darstellung der Plasma-Renin-Aktivität-Mittelwerte [ng/ml/Stunde]

	Keine UUO			UUO		
	3 Tage	8 Tage	25 Tage	3 Tage	8 Tage	25 Tage
<b>Placebo</b>	10,7	29,6	14,0	2,03	5,98	12,28
<b>0,5 Rosi</b>	16,3	23,4	10,1	1,9	7,9	8,5
<b>10 Rosi</b>	18,8	18,2	8,2	6,5	9,3	4,0

## 7.5 Hydroxyprolin

Tabelle 6: Darstellung der Hydroxyprolinmittelwerte [ng/ml]

	keine UUO			linke Niere UUO			rechte Niere UUO		
	3 Tage	8 Tage	25 Tage	3 Tage	8 Tage	25 Tage	3 Tage	8 Tage	25 Tage
<b>Placebo</b>	379,4	672,5	214,8	141,4	312,2	683,7	140,6	112,7	148,1
<b>0,5 Rosi</b>	388,5	290,9	242,2	154,5	490,2	695,4	164,4	242,4	182,8
<b>10 Rosi</b>	367,3	265,5	166,0	115,1	456,5	1190,7	150,6	337,1	109,9

## 7.6 MCP-1 Western Blot

Tabelle 7: Darstellung der Western Blot Ergebnisse des MCP-1 [Grauwert]

	keine UUO			linke Niere UUO			rechte Niere UUO		
	3 Tage	8 Tage	25 Tage	3 Tage	8 Tage	25 Tage	3 Tage	8 Tage	25 Tage
<b>Placebo</b>	1,00	1,00	1,00	1,75	3,36	5,91	1,47	1,73	1,88
<b>0,5 Rosi</b>	1,48	1,63	1,63	2,46	1,44	6,85	1,83	1,91	1,50
<b>10 Rosi</b>	1,86	0,97	1,63	1,69	2,46	4,31	0,90	1,09	1,73

## 7.7 MCP-1 PCR

Tabelle 8: Darstellung der PCR Ergebnisse des MCP-1 [Grauwert]

	Keine UO			UO		
	3 Tage	8 Tage	25 Tage	3 Tage	8 Tage	25 Tage
<b>Placebo</b>	0,07	0,27	0,34	0,24	0,34	0,78
<b>0,5 Rosi</b>	0,03	0,18	0,07	0,34	1,15	0,56
<b>10 Rosi</b>	0,12	0,22	0,03	0,38	1,25	0,45

## 7.8 p27<sup>Kip1</sup> Western Blot

Tabelle 9: Darstellung der p27<sup>Kip1</sup>-Mittelwerte [Grauwert]

	keine UO			linke Niere UO			rechte Niere UO		
	3 Tage	8 Tage	25 Tage	3 Tage	8 Tage	25 Tage	3 Tage	8 Tage	25 Tage
<b>Placebo</b>	1,00	1,00	1,00	2,02	2,26	6,51	1,47	1,35	1,18
<b>0,5 Rosi</b>	0,95	1,23	1,56	2,25	2,60	7,14	1,59	1,37	1,09
<b>10 Rosi</b>	0,61	1,09	2,43	1,41	2,61	8,50	1,30	2,32	1,47

## 7.9 PPAR-gamma

Tabelle 10: Darstellung der PPAR-gamma-Mittelwerte [Grauwert]

	Keine UO			UO		
	3 Tage	8 Tage	25 Tage	3 Tage	8 Tage	25 Tage
<b>Placebo</b>	0,019	0,004	0,029	0,017	0,004	0,023
<b>0,5 Rosi</b>	0,019	0,003	0,025	0,016	0,006	0,023
<b>10 Rosi</b>	0,023	0,006	0,031	0,024	0,006	0,024

## 8 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die durch ihre Hilfe und Geduld zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. G. Stein, der mir das Thema der vorliegenden Dissertation überließ, mir gleichzeitig die Möglichkeit zur experimentellen Untersuchung verschaffte, mich dabei auf vielfältige Weise förderte und mit stetigem Interesse zum Fortgang der Arbeit anspornte.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. J. Gerth. Er hat mich bei der praktischen Durchführung der Untersuchungen wie auch bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse maßgeblich unterstützt und stand immer als kompetenter Ansprechpartner bei Fragen zur Verfügung.

Außerdem bedanke ich mich recht herzlich bei:

Herrn Dr. Schubert und Frau Dr. Wicher für die Anleitung und Beratung beim tiereperimentellen Teil, Herrn Dr. Müller für die Hilfe bei der Hydroxyprolinbestimmung, Frau Schönfelder, die nicht nur das Labor mit mir teilte, sondern auch bei der PCR sehr hilfreich war und Frau Dr. Heuer, die mich in statistischen Fragen beriet. Nicht zuletzt möchte ich mich bei dem gesamten nephrologischen und rheumatologischen Team für die freundliche Aufnahme und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Vielen Dank auch meinem lieben Ehemann für die geduldige Hilfe bei Computerfragen und das Drucken dieser Arbeit und natürlich meinen Eltern, für die vielfältige Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit und weit darüber hinaus.

## 9 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt wurde,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials, sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Herr Prof. Dr. med. Stein und Dr. med. Gerth,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 31.03.2006

Regina Rusch