

**Der Einfluss eines chronischen
Stickstoffmonoxid (NO)-Defizits auf das
strukturelle und funktionelle Remodeling der Niere**

Jan-Christian Müller



INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Der Einfluss eines chronischen
Stickstoffmonoxid (NO)-Defizits auf das
strukturelle und funktionelle Remodeling der Niere**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Müller, Jan-Christian
aus Göttingen

Gießen 2018

Aus dem Physiologischen Institut
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Schulz

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter
2. Gutachter: Prof. Dr. Rolf Weimer

Tag der Disputation: 08.10.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie, Definition und Einteilung der Hypertonie	1
1.2 Ätiologie und Pathophysiologie der hypertensiven Nephropathie	2
1.3 Stickstoffmonoxid (NO)	3
1.4 Protein-Nitro-Tyrosin	6
1.5 Transforming growth factor-β (TGF-β)	6
1.6 Kollagen 1, Fibronectin, Decorin, Biglycan und Laminin	7
1.7 Ornithin-Decarboxylase (ODC)	8
1.8 Parathyroid hormone related peptide (PTHrP)	9
1.9 Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase (NOX) und Superoxiddismutase (SOD)	10
1.10 Zielsetzung der Arbeit	11
2. Material	13
2.1 Tierkollektiv	13
2.2 Haltung	13
2.3 Geräte und Labormaterial	13
2.3.1 Allgemein verwendete Geräte	13
2.3.2 Polymerase chain reaction (PCR)	13
2.3.3 Western Blot	14
2.3.4 Blood urea nitrogen (BUN)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	14
2.3.5 Plasma-Elektrolytbestimmung	14
2.3.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	14
2.4 Verbrauchsmaterial	14
2.5 Chemikalien	15
2.6 Primer	17
2.7 Antikörper	18
2.7.1 Primäre Antikörper	18
2.7.2 Sekundäre Antikörper	18
2.8 Elektronische Datenverarbeitung (EDV) und Statistik	19

3. Methoden	20
3.1 Studiendesign	20
3.2 Messung des systolischen Blutdrucks (P_{sys})	21
3.3 Medikamentengabe	21
3.4 Organpräparation	22
3.5 Polymerase chain reaction (PCR)	22
3.5.1 Ribonucleic acid (RNA)-Isolation	22
3.5.2 Ribonucleic acid (RNA)-Quantifizierung	23
3.5.3 Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA)-Synthese	23
3.5.4 Deoxyribonucleic acid (DNA)-Amplifikation	24
3.6 Gelelektrophoretischer Proteinnachweis	25
3.6.1 Vorbereitung der Probe	25
3.6.2 Gelelektrophorese	26
3.6.3 Western Blot	27
3.7 Detektion der Proteine	27
3.8 Blutgasanalyse des Plasmas	28
3.9 Blood urea nitrogen (BUN)	29
3.10 Protein-Nitro-Tyrosin	29
4. Ergebnisse	30
4.1 Adaptationsvorgänge bei NO-Defizienz nach vier Wochen	30
4.1.1 Systolischer Blutdruck (P_{sys})	30
4.1.2 Nierengewicht (NW)	30
4.1.3 Blood urea nitrogen (BUN)	31
4.1.4 Plasma-Elektrolytzusammensetzung	31
4.1.5 Biglycan	32
4.1.6 Parathyroid hormone related peptide (PTHrP)	34
4.1.7 Ornithin-Decarboxylase (ODC)	35
4.1.8 Transforming growth factor- β -1 (TGF- β -1), Kollagen 1, Fibronectin, Decorin, Biglycan und Laminin	37
4.1.9 Protein-Nitro-Tyrosin	38
4.2 Adaptationsvorgänge bei NO-Defizienz nach sechs Monaten	40
4.2.1 Systolischer Blutdruck (P_{sys})	40
4.2.2 Nierengewicht (NW)	41
4.2.3 Blood urea nitrogen (BUN)	41
4.2.4 Plasma-Elektrolytzusammensetzung	42
4.2.5 Parathyroid hormone related peptide (PTHrP)	44

4.2.6	Ornithin-Decarboxylase (ODC).....	45
4.2.7	Transforming growth factor- β -1 (TGF- β -1), Kollagen 1, Fibronectin	47
4.2.8	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase (NOX) und Superoxiddismutase (SOD).....	49
5.	Diskussion der Befunde	52
5.1	Hauptbefunde.....	52
5.2	Einflussmöglichkeiten auf den Blutdruck bei Stickstoffmonoxid (NO)-Defizienz	53
5.3	Nierenfunktion	53
5.4	Plasma-Elektrolytzusammensetzung	54
5.5	Nierengewicht (NW) und Polyaminstoffwechsel	55
5.6	Renale Fibrose.....	56
5.7	Parathyroid hormone related peptide (PTHrP).....	57
5.8	Oxidativer Stress.....	58
5.9	Schlussfolgerung.....	60
6.	Zusammenfassung	61
7.	Summary	63
8.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	65
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	65
8.2	Tabellenverzeichnis	66
9.	Literaturverzeichnis	67
10.	Erklärung zur Dissertation	82
11.	Danksagung	83

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
≥	größer oder gleich
<	kleiner
α	alpha
Abb.	Abbildung
a.b.	zweifach destilliertes Wasser
ANOVA	analysis of varianz
AU	Extinktionseinheit
β	beta
BUN	blood urea nitrogen
BPB	Bromphenolblau
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	cyclic adenosine monophosphat
C-Gruppe	Captoprilgruppe
cm	Zentimeter
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cGMP	cyclic Guanosinmonophosphat
dl	Deziliter
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDV	elektronische Datenverarbeitung
EIA	enzyme-immunoassay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale NOS
Fab-Fragment	Antigen-bindendes Fragment
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fc-Fragment	kristallisierendes Fragment
FW	forward
G	Stadium der Nierenfunktionseinschränkung
g	Gramm
<i>g</i>	mittlere Erdbeschleunigung
γ	gamma
GFR	glomeruläre Filtrationsrate

H ⁺	Proton
HCl	Salzsäure
H-Gruppe	Hydralazingruppe
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICD	international classification of diseases
iNOS	induzierbare NOS
IgG	Immunglobulin der Klasse G
K ⁺	Kalium
K-Gruppe	Kontrollgruppe
KIDGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
kg	Kilogramm
l	Liter
LAP	latency-associated peptide
L-Gruppe	L-NAME-Gruppe
LC-Gruppe	L-NAME+Captorpil-Gruppe
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginin-methyl-ester
LTBP	latent transforming growth factor-β-binding protein
LT-Gruppe	L-NAME+Tempol-Gruppe
M	Molarität
m	Meter
m ²	Quadratmeter
MCP 1	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M-MLV RT	moloney murine Leukämia virus reverse transkriptase
mmol	Millimol
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid
n	number of experimental animals

Na ⁺	Natrium
NADP ⁺	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
Net OD	optische Dichte, um den Leerwert bereinigt
NCBI	National Center for Biotechnology Information
n.d.	nicht definiert
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
nNOS	neuronale NOS
NOS	NO-Synthase
NOX	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat- Oxidase
N-Terminus	Amino-Ende in Peptiden oder Proteinen
NW	Nierengewicht in g
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid
ODC	Ornithin-Decarboxylase
Oligo dt	Oligo-desoxy-Thymidin
p	Signifikanzwert
PCR	polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P _{dia}	diastolischer Blutdruck
PTH	Parathormon
PTHrP	parathyroid hormone related peptide
P _{sys}	systolischer Blutdruck
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA _{sin}	Ribonuklease Inhibitor
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per min
RW	reverse
RT	rw transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat

sGC	soluble guanylyl cyclase
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TBS	tris-buffered saline
TGF- β	transforming growth factor- β
TI	Tibialänge
tRNA	transfer ribonucleic acid
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaureat
μ l	Mikroliter
U	Enzymeinheit
V	Volt
vs.	versus
WHO	world health organization
X°C	Annäherungstemperatur nach Angaben des Herstellers
x	fach (bezogen auf die Konzentration)
x-fach	mehrfach (bezogen auf die Kontrollen)

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie, Definition und Einteilung der Hypertonie

Die Hypertonie stellte im Jahr 2015 eine Erkrankung mit einer weltweiten Prävalenz von 20 Prozent (%) bei der weiblichen und 24% bei der männlichen Bevölkerung ab 18 Jahren dar [1]. In der Bundesrepublik Deutschland wurde im Jahr 1998 mit zunehmendem Alter eine steigende Prävalenz der Hypertonie beobachtet [2]. So waren in der Altersgruppe zwischen 70 und 79 Jahren 85,7% der Frauen und 88,4% der Männer hyperten [2]. Insgesamt lagen systolische als auch diastolische Blutdruckwerte in allen Altersgruppen bei Männern höher als bei Frauen [2]. Die world health organization (WHO) definiert Bluthochdruck als einen systolischen Blutdruck (P_{sys}) über 140 Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) oder einen diastolischen Blutdruck (P_{dia}) über 90mmHg [2,3]. Diese Definition wurde von der „Deutschen Hochdruckliga“ übernommen und um eine Schweregrad-Klassifikation ergänzt (siehe Tabelle (Tab.1)) [2,4]. Die meisten Menschen leiden unter keinen Symptomen bei Bluthochdruck [2,3]. Gelegentlich kann es jedoch zu Kopfschmerzen, Brustschmerzen, Palpationen, Nasenbluten oder Kurzatmigkeit kommen [3]. Zu den langfristigen Folgen eines unbehandelten Bluthochdrucks zählen Herzinfarkte, Arteriosklerose, Schlaganfälle und Nierenschäden [2,5,6].

Die Hypertonie wird klinisch in eine primäre und eine sekundäre Hypertonie eingeteilt [2]. Für die Pathogenese der primären Hypertonie wird von einem Zusammenwirken erblicher Anlagen und weiterer Risikofaktoren ausgegangen [2]. Bei der sekundären Form der Hypertonie sind eindeutige Ursachen wie Nierenerkrankungen oder Medikamente feststellbar [2]. Die primäre Hypertonie war im Jahr 1998 in der Bundesrepublik Deutschland mit einer Prävalenz von 90 bis 95% die häufigste Hypertoniediagnose [2]. Die Einteilung der primären Hypertonie erfolgt nach der international classification of diseases (ICD) 10: I10.- [7].

Kategorie	P_{sys} in mmHG		P_{dia} in mmHG
optimal	kleiner (<)120	und	<80
normal	120 bis 129	und/oder	80 bis 84
hochnormal	130 bis 139	und/oder	85 bis 89
Hypertonie Grad 1	140 bis 159	und/oder	90 bis 99
Hypertonie Grad 2	160 bis 179	und/oder	100 bis 109
Hypertonie Grad 3	größer oder gleich (≥)180	und/oder	110
isolierte systolische Hypertonie	≥140	und	<90

Tab.1: Einteilung der Hypertonie nach der „Deutschen Hochdruckliga“ [2,3]

1.2 Ätiologie und Pathophysiologie der hypertensiven Nephropathie

In der Bundesrepublik Deutschland erhielten im Jahr 1998 nur 23,8% der diagnostizierten Hypertoniker eine ausreichende Therapie [3]. Eine langanhaltende Hypertonie kann zur Entstehung einer hypertensiven Nephropathie führen [7,8]. Die hypertensive Nephropathie stellt einen Endorganschaden dar [7,8]. Histologisch besteht bei einer hypertensiven Nephropathie eine irreversible fibrotische arterioläre Degeneration in der Niere [10]. Die ischämisch-bedingte glomeruläre Fibrose mit mitochondrialen tubulärer Fragmentation endet in einer Atrophie des Nierenparenchyms [10]. Laborchemisch bestehen bei einer hypertensiven Nephropathie eine Mikroproteinurie und erhöhte Nierenretentionswerte [8]. Patienten mit höherer Mikroproteinurie zeigten auch höhere Blutdruckwerte und eine stärkere linksventrikuläre Hypertrophie, so dass die Mikroproteinurie als Marker für weitere Endorganschäden diskutiert wird [11].

Nach 15-20 Jahren führt die hypertensive Nephropathie oft zur chronischen Niereninsuffizienz [12]. Dieser Übergang verläuft zunächst klinisch ohne körperliche Symptome [12]. Im Jahr 2009 stellte die Hypertonie bei chronisch niereninsuffizienten Patienten den zweithäufigsten Grund für eine Dialyse in der Bundesrepublik Deutschland dar [9]. Als Ursache der chronischen Niereninsuffizienz werden zwei verschiedene Hypothesen vertreten [13]. Zum einen die Überlastungshypothese, bei der es durch eine verminderte Anzahl der funktionsfähigen Nephrone zu einer kompensatorischen Mehrbelastung der verbliebenen Nephrone mit allmählicher Funktionsabnahme kommt [13]. Zum anderen die Fibrosehypothese, bei welcher ein

inflammatorisches Geschehen zum tubulären Funktionsverlust führt [13]. Beide Wege sind nicht monopathogenetisch und können nebeneinander auftreten [13].

Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz werden neben einem Anstieg der harnpflichtigen Stoffe wie Harnstoff, Harnsäure und Kreatinin auch Natrium (Na⁺) und Kalium (K⁺) vermindert ausgeschieden [14,15]. Hormone, welche die Niere bildet, werden nur vermindert hergestellt [14,15]. Hierzu zählen Colecalciferol und Erythropoetin [14,15].

Die chronische Niereninsuffizienz wird entsprechend der Empfehlung der deutschen Gesellschaft für Nephrologie und der Gesellschaft Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KIDGO) in fünf Stadien eingeteilt [16,17]. Die Einteilung erfolgt entsprechend der glomerulären Filtrationsrate (GFR) wie in Tab.2 abgebildet [16,17].

GFR in Milliliter (ml)/Minute (min) pro 1,73 Quadratmeter (m²) Körperoberfläche	Stadium der Nierenfunktions-einschränkung (G)	Funktionseinschränkungen
≥90	G1	keine
60-89	G2	geringfügige
45-59	G3a	gering- bis mittelgeradige
30-44	G3b	mittel- bis hochgeradige
15-29	G4	hochgeradige
<15	G5	Nierenversagen

Tab.2: Stadieneinteilung der Niereninsuffizienz nach den KIDGO-Leitlinien [16,17]

1.3 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) wird konsekutiv in der Niere synthetisiert [18]. Hierfür sind im Wesentlichen drei Enzymsysteme verantwortlich [18]. Zum einen die endotheliale NO-Synthase (eNOS), welche hauptsächlich im Endothel lokalisiert ist, aber auch in verschiedenen anderen Geweben vorkommt, wie Fibroblasten, Lymphozyten und Eosinophilen [18,19,20]. Zum anderen die neuronale NOS (nNOS), welche unter anderem in Neuronen, der Macula densa, dem tubulären Epithel, Mastzellen, Neutrophilen und vaskulären Muskelzellen exprimiert wird [18,19,20]. Darüber hinaus sind verschiedene Spleißvarianten für nNOS bekannt [18,19]. Es liegen unterschiedliche Forschungsergebnisse für die Niere hinsichtlich der konsekutiven Expression der induzierbaren NOS (iNOS) vor. Einige Autoren konnten keine iNOS messenger ribonucleic acid (mRNA)-Expression in der gesunden Niere nachweisen,

während andere Autoren eine konsekutive mRNA-Expression für iNOS beschrieben [18,19,20]. Diese Unsicherheit mag auch mit zwei verschiedenen iNOS Isoformen zusammenhängen, welche bei der Ratte in der Niere nachgewiesen werden konnten [18].

NO entsteht aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff (O_2) in einer enzymatischen Reaktion [20]. Kofaktoren der Reaktion sind Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Flavin-Adenin-Dinukleotid, Flavinmononukleotid und Tetrahydrobiopterin [20,21]. Zur Aktivierung der nNOS wird Kalzium (Ca^{2+}) benötigt, während die iNOS Ca^{2+} unabhängig arbeitet. Für die eNOS wurde zudem ein Ca^{2+} abhängiger und Ca^{2+} unabhängiger Aktivierungsweg beschrieben [19,20,22,23].

In kleinen Caveola der Plasmamembran von Endothelzellen ist die eNOS lokalisiert [24]. Sie wird durch Scherspannung aktiviert [24]. Es sind drei Signalwege zur Aktivierung beschrieben worden. Eine Aktivierung der Proteinkinasen B mit Phosphorylierung an Serin 1177, ein Ca^{2+} -Influx oder eine Aktivierung über die Proteinkinase A [18,22,23,24,34]. Durch Scherspannung kommt es durch den Ca^{2+} -Influx zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im Endothel [23,25].

Ein wesentlicher Signalweg für NO bildet die Aktivierung der im Zytosol lokalisierten „soluble guanylyl cyclase“ (sGC) [22]. Diese besteht aus einer alpha (α) und beta (β) Untereinheit und stellt den intrazellulären sekundären Botenstoff cyclic Guanosinmonophosphat (cGMP) her [22]. Darüber hinaus sind zwei Isoformen jeder Untereinheit (α -1, α -2, β -1 und β -2) beschrieben worden [22]. Nur sGC (α -1) (β -1) und sGC (α -2) (β -1) scheinen eine Funktion im lebenden Organismus zu haben [22]. cGMP führt zu Interaktionen mit verschiedenen Effektorproteinen [22]. Hierzu gehören cGMP abhängige Proteinkinasen, cGMP regulierte Phosphodiesterasen und Ionenkanäle [22].

NO bildet einen wesentlichen Regulator für die Blutdruckregulation und wird in der Literatur als ein endothelium-derived relaxing factor beschrieben [25]. Im Endothel wird NO über die eNOS gebildet [25]. Seine Wirkung im Gefäßbett wird via cGMP vermittelt und führt zu Relaxation in der glatten Muskulatur, woraus wiederum eine Abnahme des Gefäßwiderstandes resultiert [25]. Unter Gabe von eNOS Hemmern wird die Bildung von NO vermindert, dies führt zur Entwicklung einer Hypertonie in vivo [25]. In der Niere führt die Reduktion von NO ebenfalls zu einer Zunahme des oxidativen Stresses mit Verstärkung der Vasokonstriktion [25,26]. Zudem wurden vasokonstriktorische Mechanismen von Superoxiden (O_2^-) beschrieben [26,27]. Durch die Vasokonstriktion

wurde eine verminderte GFR beobachtet [22,28]. Darüber hinaus inhibiert NO die Kollagen- und deoxyribonucleic acid (DNA)-Synthese sowie die Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen im Gefäßbett [29,30,31].

Weitere vasokonstriktorische Effekte in der Niere werden durch die Enzyminhibition von perivasalen nNOS haltigen Nervenendigungen an den Nierenhilus, den interlobulären Gefäßen, der Nierenkapsel, den interlobulären Arterien und am Anfang der afferenten Arteriolen erzeugt [32]. Stimuliert man diese Nervenendigungen via Elektrizität oder Nikotin zeigt sich eine Vasodilatation [32]. Durch die Einnahme von N^G-Nitro-L-Arginin-methyl-ester (L-NAME) wird dies verhindert, da L-NAME das enzymatische Zentrum der NOS blockiert [32]. Die entstandene Blockade kann wiederum durch die Gabe von L-Arginin, nicht D-Arginin aufgehoben werden [32]. Als Folge wurde ein erhöhter Widerstand in den glomerulären Vas afferens und Vas efferens beschrieben. Einige Autoren berichteten hingegen nur über eine Zunahme des Widerstandes des Vas afferens in vivo [20]. Die nNOS scheint wesentlich für die medulläre Perfusion in der Niere zu sein, während eNOS den basalen Blutfluss reguliert [28].

Diurese und Drucknatriurese werden in der Niere ebenfalls NO-abhängig reguliert [18,20]. Es gibt jedoch widersprüchliche Aussagen bezüglich für die Auswirkungen von NO auf den Wasser- (H₂O)- und Na⁺-Transport im proximalen Tubulus [18]. Einige Autoren gehen von einer Hemmung des Na⁺-Transportes durch NO aus, andere wiederum von einer Zunahme des Transportes [18,33]. Es wurde jedoch nur ein hemmender Effekt auf die Na⁺-K⁺-ATPase beschrieben [20, 33]. Eine Erklärung hierfür könnten direkte hemmende Effekte von NO auf die Na⁺-Resorption in dem proximalen Tubulus sein, während es sympatische Nervenendigungen gibt die über NO stimulierend auf den Na⁺-Transport wirken [18]. Für NO ist eine zunehmende Evidenz in der Regulation der Reninfreisetzung und in der Regulation des tubuloglomerulären Feedbacks beschrieben worden. Andere Autoren konnten jedoch keine signifikante Veränderung in der Reninfreisetzung unter NO-Defizienz beobachten [18,34,35]. Unter der Gabe von L-NAME konnte das tubuloglomeruläre Feedback abgeschwächt werden [18].

In der Niere konnte für eine chronische Anwendung von NOS Inhibitoren eine Proteinurie und glomeruläre Sklerose nachgewiesen werden [36].

1.4 Protein-Nitro-Tyrosin

Das gebildete Protein-Nitro-Tyrosin korreliert mit der Menge des gebildeten Peroxynitrits und dient als Marker des nitrosativen Stresses in Geweben [19,21]. Peroxynitrit wird vermehrt unter pathophysiologischen Bedingungen bei der Hypertonie gebildet [21]. In niedrigen Konzentrationen vermittelt NO über ein freies Elektron antioxidative Eigenschaften, indem es mit Radikalen eine kovalente Bindung eingeht [21]. In höheren Konzentrationen ist die Bildung von Peroxynitrit bei gleichzeitigem Vorliegen von O_2^- , wie bei der Hypertonie, erhöht [21]. Somit entsteht im Gewebe nitrosativer Stress [21]. In der Inflammation wird Peroxynitrit vermehrt durch Makrophagen, welche nach Aktivierung der Promotorregionen für iNOS [37] NO und ebenfalls O_2^- generieren, gebildet [18,20,37].

Peroxynitrit entsteht aus einer Reaktion zwischen NO und O_2^- [21]. Es bildet ein starkes Oxidans, welches durch Zellmembranen diffundieren und Proteine nitrosylieren kann [21]. Dabei werden Nitrothiole, Nitrosamine, Nitrotyrosin und Nitrotryptophan gebildet. Nitrotyrosin erweist sich als stabiler, weshalb seine Bestimmung vorrangig beachtet wird [21]. Peroxynitrit kann mit metallhaltigen Proteinen wie Hämoglobin, Aminosäuren, Lipiden und Nukleinsäuren chemische Redox-Reaktionen eingehen und so die Zellstrukturen schädigen [21].

1.5 Transforming growth factor- β (TGF- β)

Der Begriff transforming growth factor- β (TGF- β) beschreibt eine Superfamilie, die circa 30 Proteine umfasst. Hierzu gehören TGF- β Isoformen, knochenmorphogenetische Proteine, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren [38,39]. Drei Isoformen TGF- β -1, TGF- β -2 und TGF- β -3, bilden die Prototypen für die TGF- β Superfamilie [38,39], von denen TGF- β -1 am häufigsten im Gewebe vorkommt [38]. TGF- β Isoformen werden vermehrt in der Fibrose gebildet und tragen wesentlich zum Gewebeumbau bei [38,39,40].

TGF- β -1 kann von jeder Zelle in der Niere synthetisiert werden [39]. Es wird als inaktive Form mit latency-associated peptide (LAP) freigesetzt [39]. Auf der Zelloberfläche bindet es an latent transforming growth factor- β -binding protein (LTBP) [39,40]. Durch verschiedene Stimuli wie reactive oxygen species (ROS), Plasmin oder Säure kann sich TGF- β -1 von LAP und LTBP lösen [38,39]. TGF- β -1 bindet als freies Signalmolekül an den TGF- β -1- und den TGF- β -2 Rezeptor [38,39]. Der TGF- β -2

Rezeptor besitzt eine konsekutive Kinaseaktivität [39] und phosphoryliert den TGF- β -1 Rezeptor [38,39]. Der TGF- β -1 Rezeptor wird durch die Phosphorylierung aktiviert und phosphoryliert in der Folge selbst Rezeptor-regulierte Smads, die weitere Signalwege aktivieren [38,39,40].

Die Effekte von TGF- β Isoformen sind äußerst vielfältig [38,39,40]. Sie beinhalten apoptotische Wirkungen auf Zellen, die Bildung und Rekrutierung von Myofibroblasten sowie eine Zunahme der extrazellulären Matrixmoleküle wie Kollagen, Fibronectin und Laminin [38,39,40]. Darüber hinaus erhöhen TGF- β Isoformen die ROS im Gewebe und senken den Gluthationspiegel in den Zellen [41]. TGF- β -1 vermittelt die Angiotensin 2 induzierte Proliferation glatter Muskelzellen [41,42,43]. Zudem führt die Bildung von TGF- β -1 zu einem reduzierten Aldosteronspiegel in vivo [43].

1.6 Kollagen 1, Fibronectin, Decorin, Biglycan und Laminin

Bei der Fibrose wird Kollagen 1 vermehrt gebildet [44]. Kollagen 1 ist das erste entdeckte Kollagen [44]. Im Gewebe liegt es als quartäre Struktur vor, die als Fibrille bezeichnet wird [45]. Dabei sind drei Peptidketten umeinander verschlungen [45]. Die Peptidketten bestehen aus zwei α -1 und einer α -2 Kette [45]. Diese sind leicht versetzt zueinander angeordnet [45]. Es findet sich eine repetitive Aminosäuresequenz aus Glycin und zwei weiteren Aminosäuren im Kollagen 1 [45]. Im Gewebe kann Kollagen mit Fibronectin eine Bindung eingehen und hat hierüber eine stabilisierende Funktion [45]. Zudem kann Kollagen 1 über Rezeptoren mit den Zellen kommunizieren [45].

Neben protektiven Funktionen, wie der Wundheilung, wird Fibronectin vermehrt in der Fibrose gebildet [40,44,46,47]. Fibronectin wird aus zwei gleichen Proteinketten gebildet, welche über Disulfidbrücken verbunden sind [44]. Es wird zwischen löslichem Fibronectin und im Gewebe gebundenem Fibronectin unterschieden, welche sich in der Aminosäuresequenz und post-translationalen Modifikationen unterscheiden [44]. Für Fibronectin existiert nur ein Gen [44]. Fibronectin ist in der perizellulären Matrix lokalisiert und bildet Fibrillen zur Verankerung der Zellen an Kollagenen aus [48]. In der Niere findet sich Fibronectin in der mesangialen und glomerulären extrazellulären Matrix sowie im renalen Interstitium und den arteriellen Blutgefäßen [49,50].

Decorin und Biglycan gehören zu der Gruppe der leucinhaltigen Proteoglycane und sind Bestandteil der extrazellulären Matrix [51,52]. TGF- β Isoformen induzieren die Bildung des extrazellulären Matrixmoleküles Decorin und die Bildung des

Membranproteoglycans Biglycan in den glomerulären epithelialen und mesangialen Zellen [53,54,55]. Für beide Proteoglycane wird eine modulierende Funktion für die Aktivität von TGF- β Isoformen postuliert [54,51]. Sie sind wesentlich an der Pathogenese von fibrotischen Nierenerkrankungen beteiligt [55]. Decorin und Biglycan sind in der Lage, TGF- β -1 in vitro zu binden und seine Aktivität zu inhibieren [51]. Die systemische Gabe von Decorin konnte die Entwicklung einer Glomerulonephritis im Tiermodell verhindern [53]. In einer weiteren Studie wurde über eine antifibrotische Wirkung durch die Gabe von Decorin in vivo berichtet [56].

Decorin und Biglycan wurden in der gesunden Niere im renalen Interstitium sowie in den Glomerula nachgewiesen [52]. In den Tubuli und Sammelrohren wurde Biglycan gefunden, jedoch nur punktuell Decorin [52].

Decorin und Biglycan interagieren mit Kollagenfibrillen [56]. Für beide Proteoglycane werden ähnliche Bindungsstellen an Kollagen 1 postuliert, um die Decorin und Biglycan konkurrieren [57]. Decorin könnte als Platzhalter beim Kollagenzusammenbau fungieren [58]. Für Biglycan wird eine wesentliche Funktion bei der Organisation der extrazellulären Matrix angenommen [57].

Laminin bildet eine Glycoproteinfamilie, die aus zwölf verschiedenen Heterotrimeren besteht [59]. Diese sind zusammengesetzt aus einer α , einer β und einer gamma (γ) Proteinkette [59]. Fünf verschiedene α -Ketten (α -1-5), drei verschiedene β -Ketten (β -1-3) und drei verschiedene γ -Ketten (γ -1-3) sind beschrieben worden [59].

Laminin ist in der Lage ein maschenähnliches Netz für die Basalmembran auf der Zelloberfläche zu Formieren und mit Integrinen, Kollagenen und Dystroglycanen Bindungen einzugehen [59]. Zudem konnten verschiedene Wirkungen auf die Gewebedifferenzierung nachgewiesen werden [59]. So zeigen zum Beispiel Mäuse ohne eine β -2 Einheit einen normalen Basalmembranaufbau, entwickeln jedoch innerhalb von zwei Wochen eine starke Proteinurie [59]. Des Weiteren zeigte sich bei der Fibrose eine TGF- β -1 abhängige Heraufregulation von Laminin [46,47].

1.7 Ornithin-Decarboxylase (ODC)

Die Ornithin-Decarboxylase (ODC) bildet das für die Polyaminsynthese limitierende Enzym [60,61]. Über die Abspaltung einer Carboxylgruppe mit Hilfe der ODC entsteht in einem ersten Schritt aus der Aminosäure Ornithin das biogene Amin Putrescin [62]. Putrescin bildet das Grundpolyamin aus dem in weiteren Reaktionen Spermidin und Spermin gebildet werden können [62]. Putrescin, Spermidin und Spermin bilden zusammen die Familie der Polyamine [60,61,62]. Alle Polyamine werden in der Zelle

für das Zellwachstum benötigt [60]. Die Inkubation von Zellkulturen mit Putrescin, Spermin und Spermidin führte zu einer Aktivierung des Zellzyklus von der Postmitosephase in die Mitose-Phase [61]. Die vermehrte Bildung von Polyaminen konnte für Fibroblasten in der Mitte des Postmitosezyklus nachgewiesen werden [61]. Ein Höchstwert wurde zu Beginn der Synthesephase festgestellt, welcher zu einer vermehrten DNA-Bildung führte. Nach der Mitose nahm der Polyaminspiegel rapide ab [61]. Eine Inhibition der Polyaminsynthese hatte eine Reduktion des Zellwachstums zur Folge [61].

Durch ihre kationische Ladung können sie mit Makromolekülen wie Nukleinsäuren, Phospholipiden und Proteinen interagieren [62]. Diese Reaktion, welche reversibel ist, führt zu einer Stabilisierung von DNA, transfer ribonucleic acid (tRNA), Membranen und einigen Proteinen [62]. Die ODC besitzt eine kurze Lebensdauer von 10-20min und ihre Expression ist durch trophische Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Medikamente, Hormone und bei der Geweberegeneration gesteigert [61,63]. Oxidativer Stress, generiert durch Eisen (3^+)-2,2',2''-nitrioltriacetat oder L-NAME Gabe, verursachten eine Zunahme der ODC Konzentration in den Zellen [64].

1.8 Parathyroid hormone related peptide (PTHrP)

Als parathyroid hormone related peptide (PTHrP) wird eine Gruppe von Peptidhormonen bezeichnet, welche eine ähnliche Aminosäuresequenz wie Parathormon (PTH) zeigen und sich einen gemeinsamen Rezeptor mit PTH teilen [65]. Eine Erhöhung von PTHrP wird unter verschiedenen kardialen Erkrankungen, wie zum Beispiel bei der Atherosklerose oder der Hypertonie beobachtet [63]. Es bestehen Hinweise, dass die Transkription von PTHrP im Gefäßbett durch mechanische Reize ausgelöst wird [65,66].

Im Menschen werden drei verschiedene Isoformen mit einer Aminosäuresequenzlänge von 139, 141 und 179 hergestellt, während in der Ratte nur die Isoform 141 hergestellt wird [65,67]. Diese Isoformen resultieren durch ein unterschiedliches Spleißen des Transkriptionsproduktes der mRNA [65,67].

Die Aminosäuresequenz von PTHrP ist unter allen Spezies hoch konserviert, was wiederum seine bedeutende Stellung für die Zellfunktion zeigt [67]. PTH wird nur in den glandulären Drüsen der Nebenschilddrüse hergestellt [65,67], während PTHrP in vielen Geweben verbreitet exprimiert wird, unter anderem in Endothelzellen und in glatten Muskelzellen [65,67]. Neben einer systemischen Wirkung, wird für PTHrP eine parakrine oder autokrine Wirkung im Gewebe angenommen [65,68].

Der PTH/PTHrP Rezeptor besteht aus einem klassischen siebenfach membrangängigen Guaninnukleotid-bindendes Protein gekoppelten Rezeptor [65]. Für PTH gibt es darüber hinaus einen spezifischen Rezeptor, an welchen PTHrP nicht binden kann, dieser wird als Typ 2 Rezeptor bezeichnet [65].

Neben seiner Rolle als Hyperkalzämiefaktor bei malignen Geweben, wurde sowohl für PTH als auch für PTHrP eine vasodilatierende Wirkung im Gefäßbett nachgewiesen [66,67,68].

Hieran beteiligt ist sowohl der reduzierte Ca^{2+} -influx in den longlasting-typ Kalziumkanälen unter erhöhten PTHrP Spiegel als auch eine durch cyclic adenosine monophosphat (cAMP) vermittelte Vasodilatation [68].

Bei hydronephrotischen Nieren konnte die höchste vasodilatierende Wirkung in den interlobulären Gefäßen nachgewiesen werden [69]. Im Vas afferens der glomerulären Gefäße kam es ebenfalls zu einer Steigerung des Gefäßdurchmessers, während die unter PTHrP gesteigerte Reninfreisetzung eine Widerstandsabnahme im Vas efferens verhinderte [69]. Interessanterweise erhöhen vasoaktive Peptide wie Endothelin, Thrombin und Angiotensin 2 die PTHrP-Synthese, während TGF- β -1 die Expression von PTHrP hemmt [68,70].

Erhöhte PTHrP Spiegel führen systemisch betrachtet jedoch nicht zu einer Steigerung des Blutflusses in der Niere, da neben einer lokalen, eine systemische Vasodilation auftreten kann [70]. Bezogen auf die Herzmuskulatur vermittelt PTHrP eine Steigerung der Kontraktilität und eine wachstumsfördernde Wirkung [68].

1.9 Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase (NOX) und Superoxiddismutase (SOD)

Sieben Isoformen der Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase (NOX) sind bislang im menschlichen Organismus beschrieben worden [71,72]. Die Isoformen der NOX1-4 beinhalten p22phox als kernkatalytische Einheit [71,72].

NOX1-3 bilden O_2^- , während NOX4 direkt Wasserstoffperoxid bildet [71]. NOX2 ist die erste entdeckte NOX und wurde zuerst in Phagozyten beschrieben [72]. Die Isoform NOX2 besteht aus zwei membrangebundenen Flavocytochromen b_{558} (gp91phox und p22phox), sowie drei zytosolischen Proteinen (p47phox, p67phox und Rac) [71,72,73]. NOX1-2 und NOX4 werden im Endothel und glatten Muskelzellen der Niere synthetisiert [71,72]. NOX4 wird darüber hinaus in Fibroblasten und NOX3 besonders in der fetalen Niere gebildet [71,72].

Alle Isoformen sind membrangebunden und transferieren Elektronen über die Zellmembran um ROS zu generieren [71,72]. Hierzu bindet NADPH an das Carboxy-Ende der NOX [71,72]. Es findet ein Elektronentransfer von NADPH auf O_2 statt [71,72]. Dabei wird NADPH in $NADP^+$ und ein Proton (H^+) umgewandelt [71,72,73].

NOX bilden den Hauptbestandteil der reaktiven O_2^- -Radikale in den Gefäßen [27]. Ein wesentlicher vasokonstriktorischer Mechanismus von O_2^- beruht auf der Reaktion zwischen O_2^- und NO, wodurch die freiverfügbare Menge an NO abnimmt [27,28,71,74]. Weiterhin wurden auch NO-unabhängige vasokonstriktorische Effekte von O_2^- beobachtet [26,27]. Daraus resultiert in der Niere eine Verringerung des afferenten arteriölen Gefäßdurchmessers [72].

Bei chronischen Nierenschäden wird NOX2 herauf reguliert, wodurch O_2^- vermehrt gebildet wird [72]. Es bestehen Hinweise für eine erhöhte NOX2 Expression bei akutem Nierenversagen [72]. Unter L-NAME Gabe wurde eine Heraufregulation von NOX2 und NOX4 in der Niere beschrieben [75].

O_2^- können in der Niere direkt mitochondriale Enzyme inaktivieren, DNA schädigen oder zur Apoptose und zellulären Hypertrophy führen [76]. Eine weitere Zellschädigung kann durch die Reaktion von NO und O_2^- zu Peroxynitrit entstehen, welches ein starkes Oxidans bildet und Zellstrukturen nitrosyliert [76].

Superoxiddismutasen (SOD) bilden ein wesentliches Abwehrsystem gegen O_2^- [77]. Drei Isoformen der SOD sind in vivo beschrieben worden. Diese bestehen aus einer Kupfer-Zink SOD1 im Zytosol, einer manganhaltigen SOD2 in den Mitochondrien und einer extrazellulären SOD3 [77]. Alle drei Isoformen werden in der Niere exprimiert [77].

SODs reduzieren den oxidativen Stress indem sie O_2^- in Wasserstoffperoxid umwandeln, was wiederum zu Wasser (H_2O) und O_2 konvertiert [77]. Verschiedene pharmakologische Medikamente, wie beispielsweise Tempol, imitieren eine ähnliche Wirkung [74]. Diese werden verwendet, da die SODs aufgrund ihrer hohen Molekulargewichte schwer membrangängig sind [74].

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu klären, wie die Niere auf oxidativen Stress, erzeugt durch chronisches NO-Defizit, reagiert. Dazu werden normotensive Ratten für

4 beziehungsweise 16 Wochen mit L-NAME behandelt und anschließend die renale Funktion anhand der Plasmaspiegel an Blood urea nitrogen (BUN) und Creatinin abgeschätzt und die molekularen Anpassungsmechanismen quantitativ durch real time polymerase chain reaction (RT-PCR) und Western Blot Verfahren dokumentiert. Als Zielgene werden die oben genannten Proteine untersucht, die an den Prozessen Blutdruckregulation, Gewebefibrose und parakrine Regulation der renalen Funktion beteiligt sind.

2. Material

2.1 Tierkollektiv

Bei dem Tierkollektiv handelte es sich um drei und zwölf Monate alte weibliche Wistar Hannover Ratten. Alle hier beschriebenen Versuche wurden behördlicherseits vor Versuchsbeginn genehmigt (Tierschutzantrag Nummer: V54-19c 2015 (I) GI 20/1 Nr. 58-2005).

2.2 Haltung

Die Versuchstiere wurden in Polycarbonat-Kunststoffkäfigen gehalten. Die Maße betragen in der Länge 595 Millimeter (mm), in der Breite 380mm und in der Höhe 200mm. Der Gitterdeckel aus Edelstahl war um 70mm erhöht. Die Tiere wurden im Tierstall des physiologischen Instituts gezüchtet und die Elterntiere von Harlan Europe bezogen. Als Nahrungsquelle diente Harlan Teklad Global 18% Protein Rodent Diet und Leitungswasser. Beides war den Tieren frei zugänglich. Im Versuchsaufbau herrschte ein natürlicher Tag-Nacht-Rhythmus sowie eine Temperatur von 23 Grad Celsius (°C) plus/minus 2°C und eine Luftfeuchtigkeit von 50% plus/minus 10%.

2.3 Geräte und Labormaterial

2.3.1 Allgemein verwendete Geräte

Allegra™-25R Centrifuge	Beckman Coulter™, Krefeld
Microfuge 18 Centrifuge	Beckman Coulter™, Krefeld
Minishaker MS2	IKA-Werke GmbH&Co. KG, Staufen
UV Stratalinker® 2400	Stratagene®, La Jolla Kalifornien USA
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

2.3.2 Polymerase chain reaction (PCR)

iCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nano-Drop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Precellys 24	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermo Cycler	Techne, Wertheim-Bestenheid

2.3.3 Western Blot

Enhanced Chemiluminescence Gerät Chemi-Smart-5100	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Glasware	Schott AG, Mainz
Hamiltonspritze 50 Mikroliter (µl)	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz Schweiz
Laborwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Netzgerät	Biometra GmbH, Göttingen
Novex® Mini-Cell Gelkammer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ultraschall Prozessor UP100H	Hielscher Ultrasound Technology, Teltow
Whatman Biometra® Standard- Wipptisch	Whatman, Göttingen

2.3.4 Blood urea nitrogen (BUN)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Reader infinite M200	Tecan® Austria GmbH, Grödig Österreich
---	--

2.3.5 Plasma-Elektrolytbestimmung

Rapidlab 348	Bayer Diagnostics, Fernwald
--------------	-----------------------------

2.3.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Acetylcholinesterase Tracer	Cayman Chemical, Ann Arbor Michigan USA
-----------------------------	---

2.4 Verbrauchsmaterial

Brozell Tücher clear 96 well plates	Brod GmbH&Co. KG, Hanau BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln Ann Arbor, Michigan
Feather Skalpelle	Pfm medical ag, Köln
Filterpapiere	Biotec Fischer GmbH, Reiskirchen
Glaskapillaren	Bayer, USA
Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Bulk bead 1,4mm Zironiumoxide	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Nitra-Tex® Handschuhe	Ansell, Brüssel Belgien
Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman GmbH, Dassel
NuPAGE® Bis-Acetate Mini Gels	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Polystyrol-Reagenzröhrchen	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Mikroplatten	Cayman Chemical, Ann Arbor Michigan USA
0,2ml PCR 8-well tube strips with caps	ABgene®, Hamburg

2.5 Chemikalien

Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Bromophenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Cell Lysis Puffer (10fach (bezogen auf die Konzentration) (x))	Cell Signaling Technology, Danvers USA
Chloroform	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Color Reagent A	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln Ann Arbor Michigan USA
Color Reagent B	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln Ann Arbor Michigan USA
Dithioeitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP's)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Methanol 20%	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
0,1 Millimolare (mM)	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Lösung	
moloney murine Leukämia virus reverse transkriptase (M-MLV RT)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

NuPAGE® 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS) Running Puffer	
NuPAGE® Transfer Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Oligo-desoxy-Thymidin (Oligo dt)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
PeqGold TriFast	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
RNase-ExitusPlus™	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ribonuklease Inhibitor (RNasin)	Promega Corporation, Madison USA
5x reverse (RW) transkriptase (RT)-Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SDS	Merck KGaA, Darmstadt
Super Signal® West Pico Luminol Enhancer Solution	Thermo Scientific, Rockford USA
Super Signal® West Pico Stable Peroxide Solution	Thermo Scientific, Rockford USA
SYBR® Green	ABgene, Hamburg
Tris-hydroxymethylaminomethan hydrochlorid (Tris/HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaureat (Tween-20)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Urea Nitrogen Colometric Detection Kit	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln
Urea Nitrogen Standard	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln
zweifach destilliertes Wasser (a.b.)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ellman´s Reagenz	Cayman Chemical, Ann Arbor Michigan USA
Biochinonsäure	Cayman Chemical, Ann Arbor Michigan USA
enzymatische	Cayman Chemical, Ann Arbor Michigan USA
Immunadsorptionsverfahren (EIA) Puffer	
Waschpuffer	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan
Rainbow-Marker	GE Healthcare, Freiburg
tris-buffered saline (TBS)	VWR International GmbH, Darmstadt

2.6 Primer

Gen	National Center for Biotechnology Information (NCBI)-Referenz	Basen- paare	Sequenz
Aktin	102630	223	forward (FW): GAA GTG TGA CGT TGA CAT CCG reverse (RW): TGC TGA TCC ACA TCT GCT GGA
Biglycan	017087	144	FW: TGA TTG AGA ATG GGA GCC TGA RW: CCT TGG TGA TGT TGT TGG AGT
p22phox	024160	183	FW: CCT CCA CTT ACT GCT GTC CG RW: GTA GGT GGC TGC TTG ATG GT
gp91phox	023965	101	FW: GTT TGC CGG AAA CCC TCC TA RW: CCT TCT GCT GAG ATC GCC AA
Decorin	024129	133	FW: GGC AGT CTG GCT AAT GTT C RW: CTT CGG AGA TGT TGT TGT TAT G
Fibronectin	019143	131	FW: TGG AGC AAG AAG GAC AAC RW: CGG ACA TCT GTG AAG GAG
Kollagen 1	053304	154	FW: GCG AAC AAG GTG ACA GAG RW: CCA GGA GAA CCA GCA GAG
Laminin	012974	116	FW: CGA GGA TGT CAG CGT RW: TCA CAG CCG TCT CCA GTC
ODC	012615	304	FW: GAA GAT GAG TCA AAC GAG CA RW: AGT AGA TGT TTG GCC TCT GG

PTHrP	012636	131	FW: AGC TAC TCC GTG CCC TCC CG RW: AGG AAG AAA CGG CGG CGC AA
SOD1	017050	134	FW: AAG GCC GTG TGC GTG CTG AA RW: ACA TGG AAC CCA TGC TCG CCT
SOD2	017051	169	FW: ATG TTG TGT CGG GCG GCG TG RW: TCG CGT GGT GCT TGC TGT GG
SOD3	012880	163	FW: TGC TGC CTC CCG ATC AGC CA RW: CCC TGG CTC AGG TCC CCG AA
TGF- β -1	021578	117	FW: AAT CCT GGC GTT ACC TTG G RW: CCT GTA TTC CGT CTC CTT GG

2.7 Antikörper

2.7.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Verhältnis	
Aktin	1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Biglycan	1: 2000	Abcam, Cambridge United Kingdom
ODC	1:200	Santa Cruz, Dallas Texas USA und Heidelberg
PTHrP	1:100	Calbiochem, Bad Soden

2.7.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verhältnis	
Sheep Anti-Rabbit IgG	1:2000	Affinity Biologicals, Inc., Kanada
Donkey Anti-Goat IgG- AP:sc-2022	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dianova Hamburg

2.8 Elektronische Datenverarbeitung (EDV) und Statistik

Normalverteilte Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Nicht normalverteilte Daten werden als Median mit den 5%- und 95%-Intervallen als Box-Plot dargestellt. Die Überprüfung der Daten erfolgte mittels Shapiro-Wills-Test. Signifikanzen wurden als T-Test (Zwei-Gruppen-Vergleich) oder Ein-Wege-analysis of variance (ANOVA) mit Student-Newman-Keuls post hoc Analyse berechnet. Die Ablehnung der Null-Hypothese auf dem $p \leq 0.05$ Niveau wird in den Abbildungen und Tabellen mit einem * markiert. Die Daten wurden mittels SPSS 20.0 der Firma IBM kalkuliert.

3. Methoden

3.1 Studiendesign

In den Untersuchungszeitraum von vier Wochen wurden 20 Wistar Hannover Ratten eingebracht. Die Wistar Hannover Ratten waren zu diesem Zeitpunkt drei Monate alt. Die Einteilung der Versuchstiere erfolgte in folgende Gruppen:

L-NAME (L-Gruppe) (number of experimental animals (n) = 5)

L-NAME+Captopril (LC-Gruppe) (n = 5)

L-NAME+Tempol (LT-Gruppe) (n = 5)

Kontrollen (K-Gruppe) (n = 5)

Hierbei erfolgte wöchentlich die Messung des Blutdrucks.

Die Untersuchung der Adaptationsvorgänge der Nieren nach sechs Monaten wurden an 60 Wistar Hannover Ratten durchgeführt. Die Wistar Hannover Ratten waren zu diesem Zeitpunkt zwölf Monate alt. Die Versuchstiere wurden hierfür in folgende Gruppen eingeteilt:

L-Gruppe (n = 12)

LC-Gruppe (n = 12)

L-NAME+Hydralazin (LH-Gruppe) (n = 10)

Captopril (C-Gruppe) (n = 6)

Hydralazin (H-Gruppe) (n = 6)

K-Gruppe (n = 14)

Die Anfütterungsphase mit L-NAME dauerte sechs Wochen, damit sich ein stabiler Bluthochdruck einstellen konnte. Während der Anfütterungsphase und in den ersten sechs Wochen der Therapie wurde der Blutdruck wöchentlich gemessen, im Anschluss daran alle zwei Wochen. Die Tiere wurden wöchentlich gewogen, zudem erfolgte eine Bestimmung des Gesundheitszustandes mit Hilfe eines "Distress Scores", welcher die folgenden Variablen berücksichtigte: Aussehen, klinische Anzeichen, natürliches Verhalten und das Verhalten während des Handlings. Für jede Variable war es möglich 0 bis 3 Punkte zu vergeben. Bei einer Summe von 5 Punkten oder einem zweimaligen Gewichtsverlust von $\geq 10\%$ des Körpergewichts, wurde das Tier aus dem Versuch

genommen. Das Studiendesign der Versuchstiere für den Versuchszeitraum von sechs Monaten wurde in einem vorhergehenden Versuch durchgeführt [78].

3.2 Messung des systolischen Blutdrucks (P_{sys})

Die P_{sys} - und Pulsmessung wurde mittels "Tail-Cuff-Methode" als nicht-invasive Messung an nicht-sedierten Tieren durchgeführt. Um reproduzierbare Werte zu ermitteln, erfolgte die Messung in störungsfreier Umgebung. Zur Minderung des Stresses wurden die Tiere immer paarweise gemessen und über einen Zeitraum von zwei Wochen an das Messverfahren gewöhnt. Um den circadianen Einfluss zu minimieren, fanden die Messungen tagsüber statt.

Für die Messreihen wurden die Versuchstiere in einen Restraîner - eine Plexiglasröhre mit 60mm Durchmesser und 200mm Länge - gesetzt. An der Vorderseite befand sich eine Frontplatte mit einer Atemöffnung, die Rückwand hatte eine Aussparung für den Schwanz. Der Restraîner war in einer beheizten Wärmekammer untergebracht. Diese wies eine Temperatur von 32°C auf, um eine optimale Durchblutung der Schwanzgefäße zu gewährleisten. Für eine auswertbare Pulskurve erfolgte die Messung erst nach 10min. Das Tier erhielt genügend Zeit, um sich an die Temperatur zu adaptieren. Zum Anbringen des Messwerkzeuges wurde die Druckmanschette zuerst auf den Schwanz der Ratte bis zur Schwanzbasis geschoben, im Anschluss daran der mit einem Infrarotsensor ausgestattete Pulsnehmer. Der Sensor hatte einen Mindestabstand von einem Zentimeter (cm) bis zur Druckmanschette.

Unter konstanter Druckerhöhung wurde die Messung durchgeführt. Hierzu waren insgesamt zehn Einzelmessungen vorgesehen. Die Messungen wurden so lange wiederholt, bis sich ein konstanter Wert einstellte. Während des Verlaufs wurden dieselben Einstellungen verwendet (zum Beispiel die Signalschwelle für die Systole: 35%). Anschließend wurden die Tiere in den Restrainern gewogen. Die Messung des P_{sys} der Versuchstiere nach sechs Monaten wurde in einem vorhergehenden Versuch durchgeführt [78].

3.3 Medikamentengabe

Durch die orale Medikamentengabe über das Trinkwasser konnte über den Tag eine kontinuierliche Aufnahme der Wirkstoffe erreicht werden. Um Lichteinflüsse zu vermeiden, wurden die Trinkflaschen mit Aluminiumfolie umwickelt. Den Versuchstieren der LC-Gruppe, LH-Gruppe und LT-Gruppe wurden nach zwei Wochen reiner L-NAME Fütterung die jeweiligen Medikamente hinzugegeben. Zwei

Wochen nach der begonnenen L-NAME Fütterung in den anderen Versuchsgruppen erhielten die C-Gruppe und H-Gruppe ihre Monobehandlungen.

Die Dosierungen für Captopril und L-NAME lagen bei 300 Milligramm (mg)/Liter (l). Die Trinkflaschen wurden täglich neu angesetzt, um die Wirksamkeit der Medikamente sicherzustellen. Bei einem Körpergewicht von 220-250 Gramm (g) und einer Wasseraufnahme von 20-25ml pro Tier/Tag ergab sich eine Aufnahme von 30mg/Kilogramm (kg)/Tag. Bei Hydralazin wurde eine Dosierung von 125mg/ Deziliter (dl) gewählt. Die Tiere nahmen circa 12mg/kg/Tag auf [78].

3.4 Organpräparation

Für die Organentnahme erfolgte die Tötung der Tiere mittels cervikaler Dislokation. Zur Entnahme der Nieren wurde das Abdomen eröffnet, freipräpariert und die Nieren anschließend in flüssigem NO eingefroren. Die Lagerung der Organe erfolgte bei -80°C in Eppendorfgefäßen.

Nach ihrer Freipräparation wurde auch die Tibia gemessen. NW als auch Tibialänge (TI) konnten so in einen Bezug gesetzt werden [78].

3.5 Polymerase chain reaction (PCR)

3.5.1 Ribonucleic acid (RNA)-Isolation

Für die ribonucleic acid (RNA)-Isolation wurde ein 1-Schritt RNA-Extraktionsverfahren mit TRIzol™ verwendet. TRIzol™ verflüssigt die Zellen und Zellkomponenten während es die RNA der Probe erhält. Dieses Verfahren eignet sich sowohl für kleinere Gewebeproben von 50-100mg, als auch für größere Gewebeproben von über 1g [79].

100mg des Nierengewebes wurden mit 1ml TRIzol™ versetzt und mechanisch zerkleinert. Hierfür wurde der Precellys 24 verwendet. Die Homogenisation erfolgte bei 6000 rounds per minute (rpm) mit einem Intervall von zweimal 10 Sekunden. Nach der Homogenisation wurden die Proben mit 100ml Chloroform versetzt, gevortext und 15min bei 12500rpm zentrifugiert.

Hierdurch konnte eine Auftrennung der Probe in eine flüssige und eine feste Phase erfolgen. Die flüssige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß abpipettiert und im Verhältnis von 1:1 mit Isopropanol zur Präzipitation versetzt.

Um die präzipitierte RNA abzutrennen, wurde die Probe erneut bei 12500rpm über 15min erneut zentrifugiert. Hierbei entstand ein Pellet am Boden des Eppendorfggefäßes. Die flüssige Phase wurde verworfen und das Pellet anschließend mit 1ml Ethanol 70% gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurde das Ethanol 70% entfernt und das Pellet eine Stunde an der Luft getrocknet. 500 Mikroliter (ul) des zweifach destilliertem Wasser (a.b.) wurden hinzugefügt und die Probe für vierundzwanzig Stunden eingefroren.

3.5.2 Ribonucleic acid (RNA)-Quantifizierung

Sowohl die Menge der gewonnenen RNA, als auch ihre Integrität sind ein wichtiger Schritt für die cDNA-Synthese. Die Qualität der gewonnenen RNA hat einen Effekt auf deren Amplifikation [80].

In dem Versuch wurde hierzu ein spektrometrisches Verfahren verwendet. Die Messung erfolgte mit den Nano-Drop-1000 zur Beurteilung der Integrität und der Konzentration an RNA in den Proben, angegeben in Nanogramm (ng) / μ l. Mit a.b. erfolgte eine Nullpunktfestlegung. 2 μ l der Probe wurden luftblasenfrei auf den Sensor pipettiert. Abschließend erfolgte mittels a.b. eine Verdünnung auf eine RNA-Konzentration von 200-800ng/ μ l.

3.5.3 Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA)-Synthese

Um die RNA-Expression zu untersuchen musste die RNA in die wesentlich stabilere cDNA umgeschrieben werden, da für die RNA kein Amplifikationsverfahren gegenwärtig existiert [81]. Hierzu wurde die RNA für die cDNA-Synthese vorbereitet und der Thermo Cycler, in welchem die Proben in cDNA umgeschrieben wurden, für 15min auf 60°C erwärmt. Die M-MLV RT wurde verwendet um die komplementäre cDNA-Strang zu generieren. Während der Thermo Cycler aufwärmte, wurde ein Reaktionsmix für die Synthese hergestellt.

Der Reaktionsmix bestand bezogen auf eine Probe aus:

5x RT-Puffer	2µl	
Oligo dt	1µl	(0,1mg/ml)
dNTP`s	1µl	(10 Millimol (mmol) /l Nukleotid)
DTT	0,5µl	(0,1 mol/l)
RNAsin	0,2µl	(25 Enzymeinheiten (U) /µl)
M-MLV RT	0,3µl	(200U/µl)

Im Verhältnis von 1:1 wurde die Probe mit dem Reaktionsmix versetzt. Die Proben wurden im Thermo Cycler eine Stunde bei 37°C erwärmt und anschließend 5min auf 95°C erhitzt um die M-MLV RT zu inaktivieren. Nach der Inaktivierung kühlte der Thermo Cycler die Probe auf 5°C ab.

Aus den Proben wurde eine Verdünnung im Verhältnis von 1:10 für die DNA-Amplifikation hergestellt.

3.5.4 Deoxyribonucleic acid (DNA)-Amplifikation

Von der verdünnten cDNA wurden 3µl in 0,2ml PCR 8-well tube strips with caps vorpipettiert und eine Doppelbestimmung je Probe durchgeführt. In zwei wells der 0,2ml PCR 8-well tube strips with caps wurde a.b. als Leerwert pipettiert.

Anschließend wurde ein PCR-Mix angesetzt aus:

10µl Cyber Green
12µl Primer FW und RW
6,4µl a.b.

Für die DNA-Amplifikation wurden die Primer nach Angaben des Herstellers mit a.b. verdünnt und die Primer FW und RW im Verhältnis 1:1 gemischt. In die wells der 0,2ml PCR 8-well tube strips with caps wurden je wells 17µl des PCR-Mixes und 3µl der Probe pipettiert.

Das Protokoll der DNA-Amplifikation:

1. Zyklus:	Schritt 1	95°C für 15min
2. Zyklus (45 mal):	Schritt 1 (Denaturierung) Schritt 2 (Annäherung)	95°C für 30 Sekunden Annäherungstemperatur nach Angaben des Herstellers (X)°C für 30 Sekunden
	Schritt 3 (Vervielfältigung)	72°C für 30 Sekunden
3. Zyklus (100 mal):	Schritt 1	50°C für 10 Sekunden (Temperaturerhöhung in 0,5°C Schritten bis 100°C)

Als Referenz/Housekeeping Gene innerhalb der Versuchsgruppe wurde Aktin verwendet.

3.6 Gelelektrophoretischer Proteinnachweis

3.6.1 Vorbereitung der Probe

Zur Proteingewinnung erfolgte in einem ersten Schritt die Herstellung der Pufferlösung. Dazu wurden 100µl Cell Lysis Puffer (10x) mit 900µl a.b versetzt und 10µl 0,1mM PMSF Lösung hinzugegeben. In einem Eppendorfgefäß wurde 100mg Nierengewebe aus der gefrorenen Niere hinzugegeben. Dieses Nierengewebe wurde mit 500µl der Pufferlösung versetzt und am Precellys 24 homogenisiert. Über 10min wurden die Proben auf Eis inkubiert und anschließend mit Ultraschall bearbeitet. Eine Zentrifuge trennte die Probe nach ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit auf. Dafür wurde diese bei 14.000 mittlere Erdbeschleunigung (g) 10min lang bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß gefüllt und mit a.b. auf ein Verhältnis von 1:50 verdünnt. Zu 100µl der Probe wurden 40µl Lämmli Puffer hinzugegeben und die Probe bei 95°C für 5min gekocht.

Lämmli Puffer:

SDS	0,2g
DTT	0,154g
Glycerin (100%)	2ml
BPB	0,2ml
Tris/HCl	0,5 Molarität (M)
a.b.	1,8ml
negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration (pH) des Puffers:	6,8

3.6.2 Gelelektrophorese

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde eine Novex® Mini-Cell Gelkammer verwendet. Der Aufbau der Kammer ist in der Herstellerangabe exemplarisch dargestellt [82].

Die NuPAGE® Bis-Acetate Mini Gele wurden entsprechend den Angaben des Herstellers vorbereitet und in die Kammer eingefügt. Die Laufpuffer für die untere und obere Kammer wurden wie nachfolgend beschrieben verwendet. Zum Auftragen der Proben in die Geltaschen wurde eine Hamilton Spritze verwendet. Die erste Laufkammer blieb ohne Probe. Stattdessen wurde ein "Rainbow-Marker" hinzugegeben, mit einem farblich markierten Spektrum von 50-250 Kilodalton.

200 Volt (V) wurden an die Novex® Mini-Cell Gelkammer für 50min angeschlossen. Es erfolgte eine Auftrennung in Banden entsprechend dem Molekulargewicht. Nach Vollendung der 50min wurde der Gleichstromgenerator abgeschaltet und die Gele aus der Kammer entnommen.

Laufpuffer für die untere Kammer:

50x MOPS SDS Running Puffer	50ml
a.b.	950ml

Laufpuffer für die obere Kammer:

1x MOPS SDS Running Puffer	200ml
500µl NuPAGE Antioxidant	200ml

3.6.3 Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierzu wurde die Novex® Mini-Cell Gelkammer nach Angaben des Herstellers verwendet [83].

In einem ersten Vorbereitungsschritt wurde Transferpuffer mit 20% Methanol hergestellt. Dieser diente zur Stabilisierung der Proteine beim Transferprozess.

Transferpuffer:

a.b.	375ml
NuPAGE Transfer Puffer 20x	25ml
Methanol 20%	25ml
NuPAGE Antioxidant	500µl

Anschließend wurde die Transferkammer zusammengefügt. Hierbei wurde stets auf die Vermeidung von Luftblasen geachtet.

Die Außenkammer wurde zur Kühlung mit 600ml a.b. befüllt. Anschließend wurde für eine Stunde 30V Gleichstrom angelegt. Nach Ablauf der Transferzeit konnte die Kammer auseinandergelöst und die Nitrocellulosemembran für 1min in steriles Wasser gelegt werden. Um das Aufnehmen weiterer Fremdproteine aus der Umgebung zu vermeiden, wurden die Membranen mit 5% Albumin Fraktion V in 1x TBS für eine Stunde geblockt.

3.7 Detektion der Proteine

Der Nachweis der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe von Antikörpern. Die Proteine stellten dabei das Antigen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht auf einem Wipptisch in der unten angegebenen Antikörperlösung.

Antikörperlösung:

TBS 1x	9,94ml
0,1% Tween-20	0,01ml
5% Albumin Fraktion V	0,05g

Am Folgetag wurde der Erstantikörper in 1x TBS und 0,1% Tween-20 drei mal 10min lang ausgewaschen.

Waschlösung:

TBS 1x	9,99ml
0,1% Tween-20	0,01ml

Es erfolgt eine weitere Inkubation mit einem Zweitantikörper über den Zeitraum von einer Stunde. Die Inkubation fand in 5% Albumin Fraktion V, 1x TBS und 0,1% Tween-20 statt. Anschließend wurde der Teil des nicht gebundenen zweiten Antikörpers zwei mal 10min in 1x TBS und 0,1% Tween-20 ausgewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgte in 1x TBS ohne 0,1% Tween-20.

Die Auswertung fand mit Hilfe des Enhanced Chemiluminescence Gerät Chemi-Smart-5100, einer Entwicklerlösung bestehend aus Super Signal® West Pico Luminol Enhancer Solution sowie Super Signal® West Pico Stable Peroxide Solution und dem Computerprogramm ChemiCapt statt.

Hierzu wurde der Blot lichtgeschützt in einer kleinen Plastikschaale inkubiert und je 3ml von Color Reagent A und Color Reagent B hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug 2min. Die Nitrocellulosemembran wurde im Anschluss auf eine Glasplatte aufgelegt und lichtgeschützt in den Chemi-Smart-5100 eingebracht. Die Meerrettichperoxidase des zweiten Antikörpers generierte eine Farbreaktion, welche in der Dunkelkammer detektiert werden konnte.

3.8 Blutgasanalyse des Plasmas

Diese erfolgte mittels ionensensitiver Elektroden, welche die Plasma- Na^+ -, Plasma- K^+ - und Plasma- Ca^{2+} -Konzentrationen bestimmten. Das Messprinzip beruhte auf einer Referenzelektrode, welche sich in einem vordefinierten Medium mit bekannter Konzentration befand sowie einer Messelektrode, welche hinter einer Membran in der

zu messenden Probe angelegt war. Die Membran war nur selektiv für das gesuchte Ion. Dieses diffundierte in die Messkammer mit der Elektrode. Durch die unterschiedliche Konzentration der Phasen in der Messkammer und der Messelektrode entstand ein elektrochemischer Gradient, welcher von dem Gerät detektiert werden konnte und Auskunft über die Ionenkonzentration gab.

3.9 Blood urea nitrogen (BUN)

In einem ersten Schritt mussten die Serumproben in einem Verhältnis von 1:20 mit a.b. verdünnt werden. Hierdurch wurden Konzentrationen an Harnstoff im Blut erreicht, in denen das Messkit genau messen konnte. Als zweiter Schritt wurde Urea Nitrogen Standard nach Angaben des Herstellers in sieben wells mit absteigenden Konzentrationen pipettiert [85]. Aus diesen sieben Wells wurde eine Referenzkurve errechnet, um die Konzentration in den Proben bestimmen zu können.

Aufbau des Messkits:

clear 96 well plates	
Urea Nitrogen Standard (100mg/dl Harnstoff)	250µl
Color Reagent A	
Color Reagent B	

Zwei wells wurden mit 50µl a.b. als Leerwert versehen. In die verbleibenden wells wurden je 50µl der Probe pipettiert sowie 75µl des Color Reagent A und 75µl des Color Reagent B hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation über 30min bei Raumtemperatur. Die optische Dichte des Farbreagenzes wurde bei 450 Nanometer (nm) nach 30min gemessen und um den Leerwert korrigiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des ELISA-Reader infinite M200.

3.10 Protein-Nitro-Tyrosin

Diese Untersuchungen wurden im Labor von Prof. Dr. Peter Ferdinandy (Semmelweis-Universität, Budapest, Ungarn) durchgeführt. Der Test beruht auf dem immunbiochemischen Nachweis von Nitrotyrosin mittels ELISA and homogenisierten Gewebeproben der Nieren, die zu diesem Zweck nach Ungarn transgferiert wurden.

4. Ergebnisse

4.1 Adaptationsvorgänge bei NO-Defizienz nach vier Wochen

4.1.1 Systolischer Blutdruck (P_{sys})

Die Entwicklung einer Hypertonie unter NO-Defizienz wurde mittels "Tail-Cuff-Methode" kontrolliert (siehe Abbildung (Abb.1)). Die K-Gruppe zeigte nach vier Wochen einen normotensiven P_{sys} , während in der L- und LT-Gruppe die Versuchstiere hyperten waren. Der P_{sys} konnte in der LC-Gruppe reduziert werden, ein Anstieg in den hochnormalen Bereich war dennoch zu beobachten.

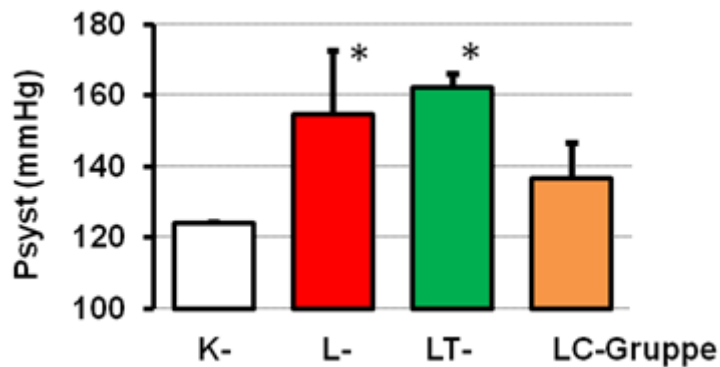


Abb.1: Diagramm der in vivo gemessenen P_{sys} nach vier Wochen in mmHG

Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. K-Gruppe: n = 5, L-Gruppe: n = 5, LT-Gruppe: n = 5, LC-Gruppe: n = 5, * = Signifikanzwert ($p < 0,05$ versus (vs.) K-Gruppe

4.1.2 Nierengewicht (NW)

Die Nieren der Versuchstiere wurden gewogen, um eine Veränderung des NW in den Versuchsgruppen zu ermitteln. Damit Größenunterschiede bei den Versuchstieren nicht zu einem methodischen Fehler führten, wurde das NW auf die TI normiert (siehe Abb.2). In den Versuchsgruppen war kein signifikanter Unterschied des NW/TI nachweisbar. Für die LC-Gruppe wurde keine Messung durchgeführt.

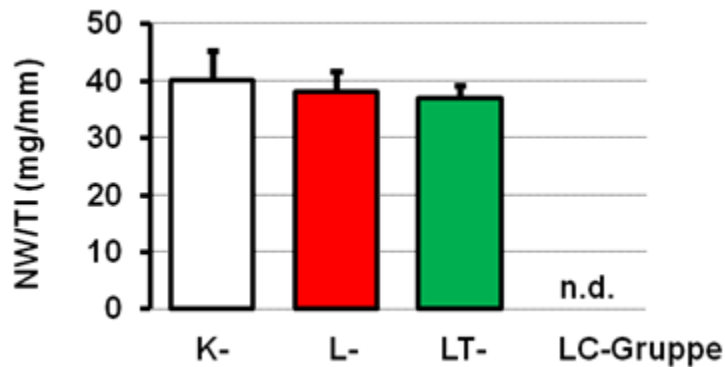


Abb.2: Diagramm der NW normiert auf die TI in mg/mm

Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. Für die LC-Gruppe: n = 5 wurde keine Messung durchgeführt (nicht definiert (n.d.)). K-Gruppe: n = 5, L-Gruppe: n = 5, LT-Gruppe: n = 5

4.1.3 Blood urea nitrogen (BUN)

Als klinischen Parameter für die Nierenfunktionsleistung wurde die blood urea nitrogen (BUN)-Konzentration quantifiziert (siehe Abb.3). In den Versuchsgruppen war kein signifikanter Anstieg der BUN-Konzentration als Marker für die Niereninsuffizienz bei den Versuchstieren zu beobachten.

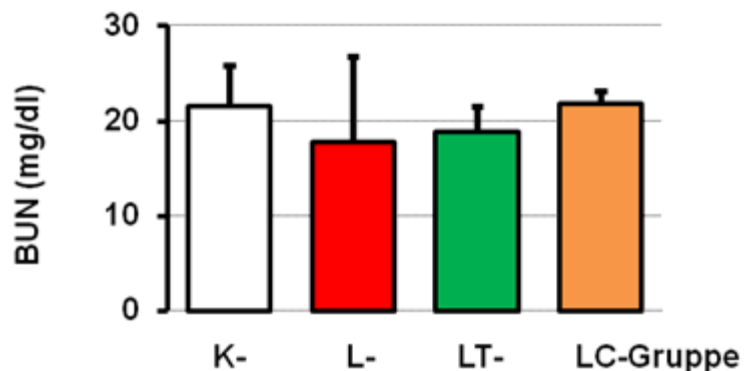


Abb.3: Diagramm der BUN-Konzentrationen in mg/dl

Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. K-Gruppe: n = 5, L-Gruppe: n = 4, LT-Gruppe: n = 5, LC-Gruppe: n = 5

4.1.4 Plasma-Elektrolytzusammensetzung

Die Auswirkungen auf die Plasma-Elektrolytzusammensetzungen wurden mit Hilfe des Rapidlab 348 untersucht (siehe Abb.4). Die K-Gruppe zeigte Normwerte für die Plasma- Na^+ -, Plasma- K^+ - und Plasma- Ca^{2+} -Konzentrationen. In der L-, LC- und LT-Gruppe waren die Plasma- K^+ -Konzentrationen signifikant gegenüber der K-Gruppe erhöht, in der Plasma- Na^+ - und der Plasma- Ca^{2+} -Konzentration zeigte sich keine signifikanten Veränderungen.

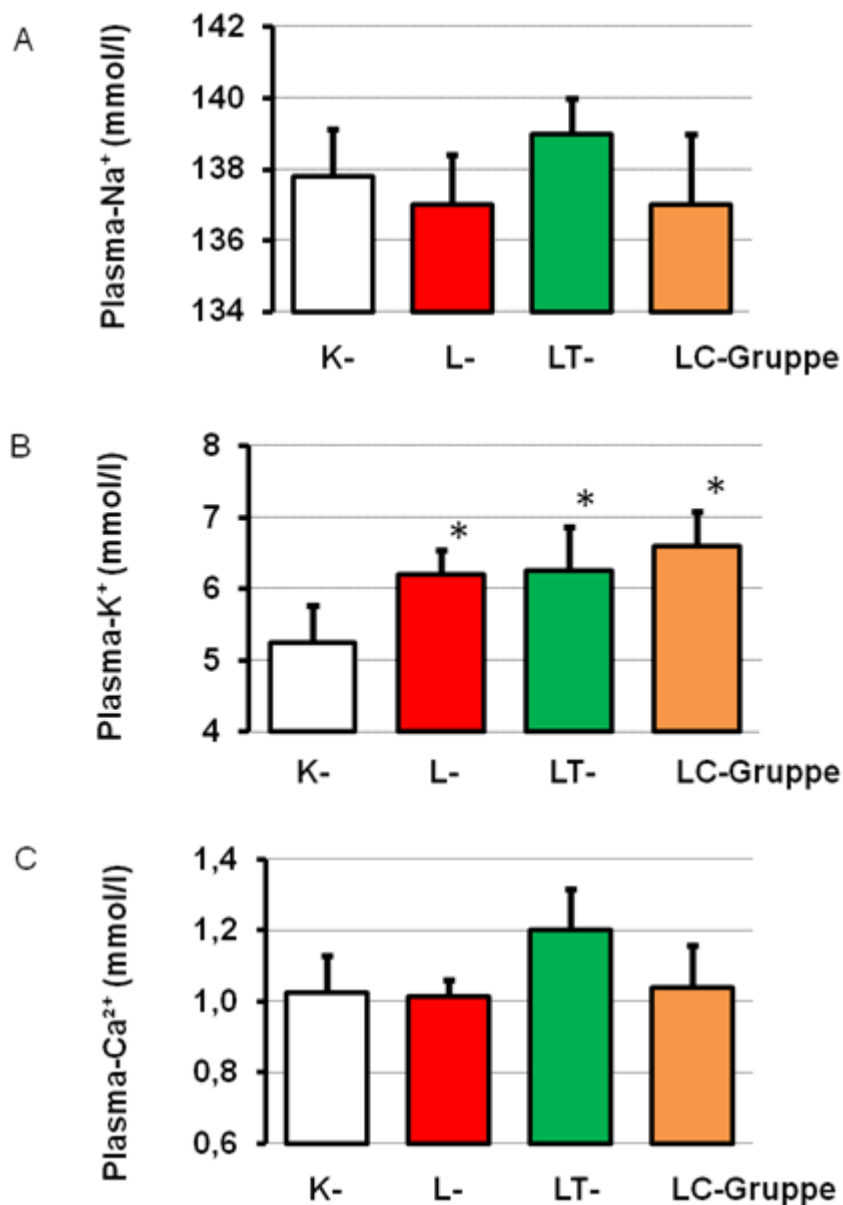


Abb.4: Diagramme der Plasma-Na⁺, Plasma-K⁺- und Plasma-Ca²⁺-Konzentrationen in mmol/l
 Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. K-Gruppe: n = 5, L-Gruppe: n = 5, LT-Gruppe: n = 5, LC-Gruppe: n = 5, * = p<0,05 vs. K-Gruppe

4.1.5 Biglycan

Um eine mögliche fibrotische Adaptation in der Niere beurteilen zu können, wurde die Biglycan Expression auf mRNA-Ebene und Proteinebene ermittelt (siehe Abb.5,6 und 7).

In der L-, LC- und LT-Gruppe kam es zu einer signifikant verminderten Biglycan mRNA-Expression verglichen mit der K-Gruppe.

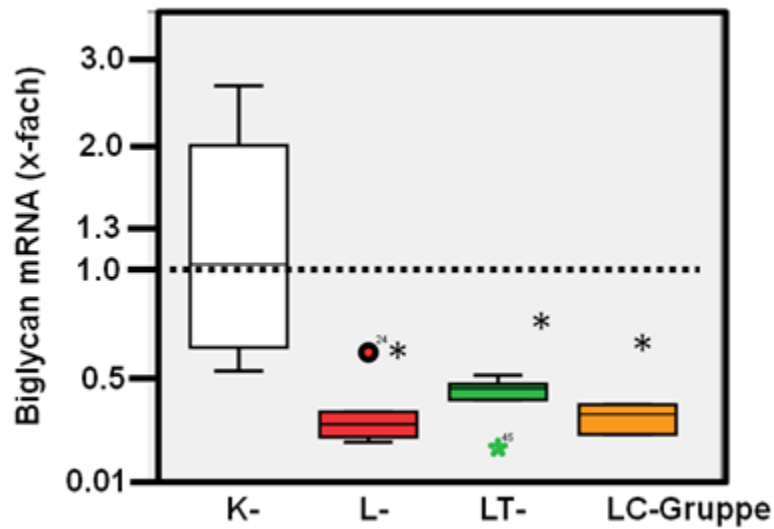


Abb.5: Diagramm der Biglycan mRNA-Expression

Dargestellt sind die Boxplot-Diagramme mit den Medianen, den 5% bis 95% Konfidenzintervallen. K-Gruppe: n = 5, L-Gruppe: n = 5, LT-Gruppe: n = 5, LC-Gruppe: n = 5, * = $p < 0,05$ vs. K-Gruppe

Post-translational zeigte sich keine signifikante Veränderung der Signalstärke für Biglycan in der L-Gruppe und LC-Gruppe in Relation zur K-Gruppe. In der LT-Gruppe erhöhte sich der Proteinanteil an Biglycan sogar gegenüber den anderen Versuchsgruppen. Diese Zunahme war signifikant gegenüber der L-Gruppe.

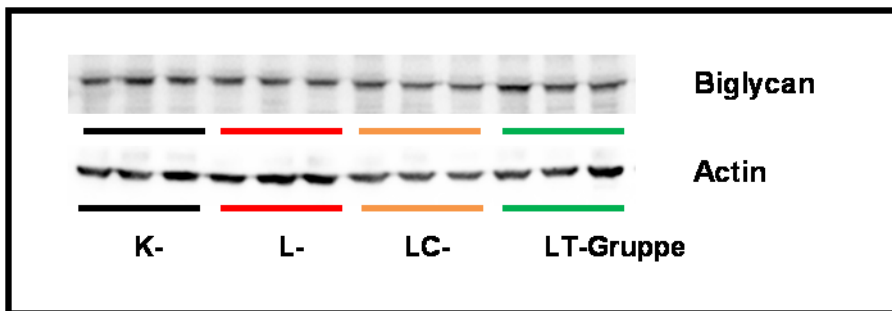


Abb.6: Darstellung des Western Blots zur Ermittlung der Biglycan-Signalstärke

Die Abbildung zeigt die mit Sheep Anti-Rabbit IgG und Anti-Biglycan markierten Banden des Western Blots. K-Gruppe: n = 3, L-Gruppe: n = 3, LC-Gruppe: n = 3, LT-Gruppe: n = 3

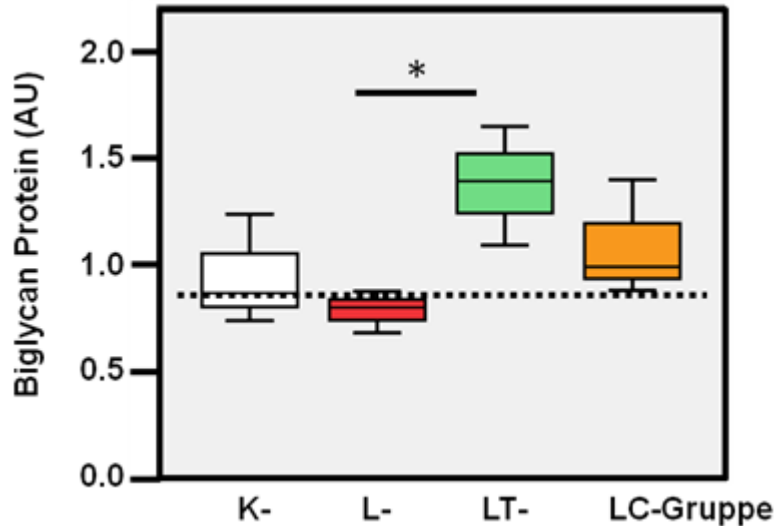


Abb.7: Diagramm der densitometrischen Auswertung des in Abb.6 dargestellten Western Blots
 Dargestellt sind die Boxplot-Diagramme mit den Medianen, den 5 bis 95% Konfidenzintervallen. K-Gruppe: n = 3, L-Gruppe: n = 3, LT-Gruppe: n = 3, LC-Gruppe: n = 3, * = p<0,05

4.1.6 Parathyroid hormone related peptide (PTHrP)

Die PTHrP-Expression wurde auf mRNA- und Proteinebene gemessen (siehe Abb.8,9 und 10).

Eine nicht signifikante Abnahme der PTHrP mRNA-Expression war in der L-, LC- und LT-Gruppe gegenüber der K-Gruppe zu erkennen. Die größte Reduktion der PTHrP mRNA-Expression war in der LC-Gruppe zu beobachten.

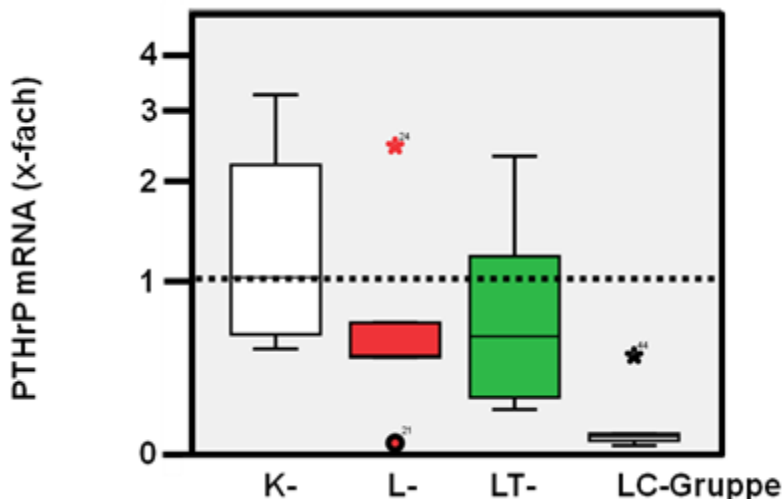


Abb.8: Diagramm der PTHrP mRNA-Expression
 Dargestellt sind die Boxplot-Diagramme mit den Medianen, den 5% bis 95% Konfidenzintervallen. Messwerte außerhalb des 5% bis 95% Konfidenzintervalls der zugehörigen Versuchsgruppe werden gesondert ausgewiesen. K-Gruppe: n = 5, L-Gruppe: n = 5, LT-Gruppe: n = 5, LC-Gruppe: n = 5, * = p<0,05 vs. K-Gruppe

Im Western Blot verminderte sich in der L-Gruppe die PTHrP-Signalstärke nicht signifikant. Diese Reduktion war in der LC-Gruppe reversibel, während in der LT-Gruppe die PTHrP Konzentration sogar signifikant gegenüber der K-Gruppe zunahm.

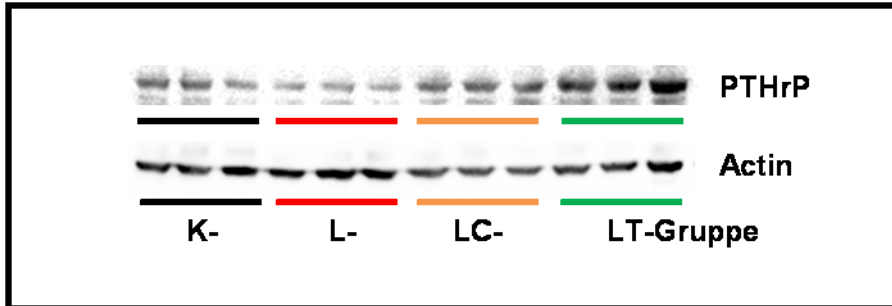


Abb.9: Darstellung des Western Blots zur Ermittlung der PTHrP-Signalstärke
Die Abbildung zeigt die mit Sheep Anti-Rabbit IgG und Anti-PTHrP markierten Banden eines Western Blots. K-Gruppe: n = 3, L-Gruppe: n = 3, LC-Gruppe: n = 3, LT-Gruppe: n = 3

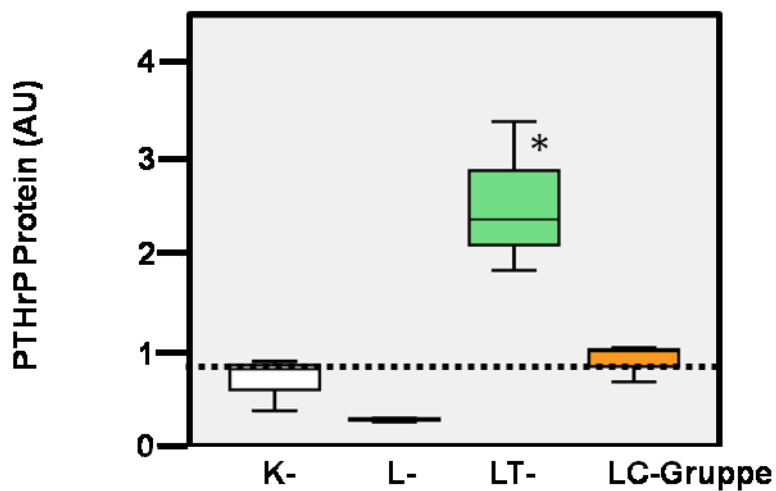


Abb.10: Diagramm der densitometrischen Auswertung des in Abb.9 dargestellten Western Blots
Dargestellt sind die Boxplot-Diagramme mit den Medianen, den 5% bis 95% Konfidenzintervallen. K-Gruppe: n = 3, L-Gruppe: n = 3, LT-Gruppe: n = 3, LC-Gruppe: n = 3, * = $p < 0,05$ vs. K-Gruppe

4.1.7 Ornithindecaboxylase (ODC)

Die Expression (mRNA und Protein) der ODC liefert Hinweise auf die Aktivität des Polyaminstoffwechsels (siehe Abb.11,12 und 13).

In der ODC mRNA-Expression war eine leichte, nicht signifikante Abnahme in der L-, LC- und LT-Gruppe im Vergleich zur K-Gruppe zu beobachten.

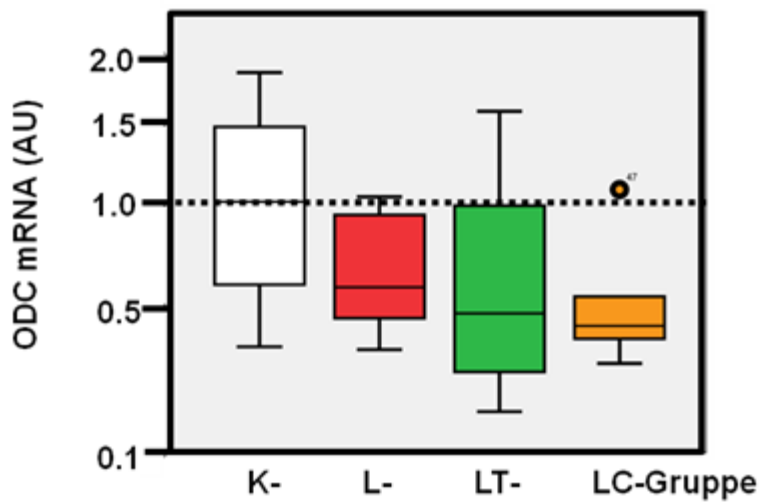


Abb.11: Diagramm der ODC mRNA-Expression

Dargestellt sind die Boxplot-Diagramme mit den Medianen, den 5% bis 95% Konfidenzintervallen. Ein Messwert außerhalb des 5% bis 95% Konfidenzintervalls der zugehörigen Versuchsgruppe wurde gesondert ausgewiesen. K-Gruppe: n = 5, L-Gruppe: n = 5, LT-Gruppe: n = 5, LC-Gruppe: n = 5

Post-translational war nur in der L-Gruppe die ODC Konzentration im Median gegenüber der K-Gruppe erniedrigt, ohne die Signifikanz zu erreichen. In der LC- und LT-Gruppe normalisierte sich der ODC Proteinanteil signifikant bezogen auf die L-Gruppe. Eine leichte Zunahme war in der LT-Gruppe im Vergleich zur K-Gruppe zu beobachten.

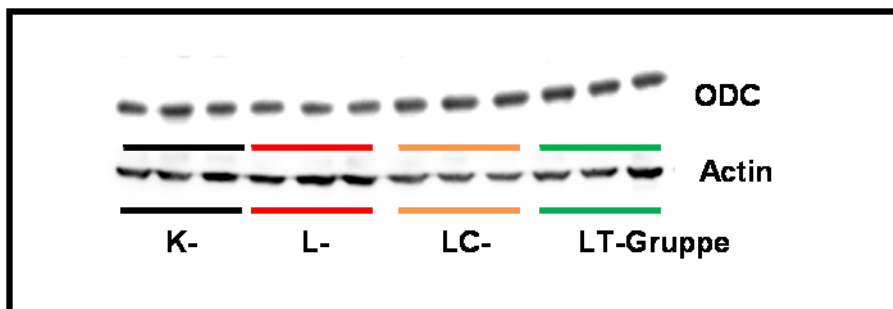


Abb.12: Darstellung des Western Blots zur Ermittlung der ODC-Signalstärke

Die Abbildung zeigt die Darstellung der mit Donkey Anti-Goat IgG und Anti-ODC markierten Banden eines Western Blots. K-Gruppe: n = 3, L-Gruppe: n = 3, LC-Gruppe: n = 3, LT-Gruppe: n = 3

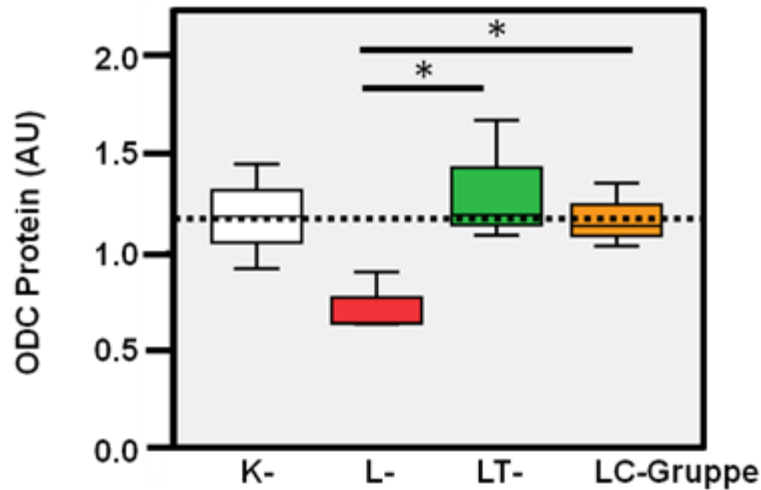
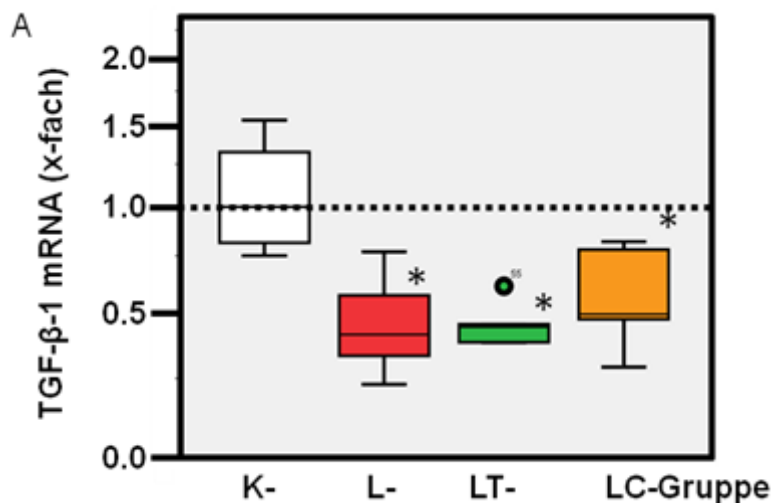


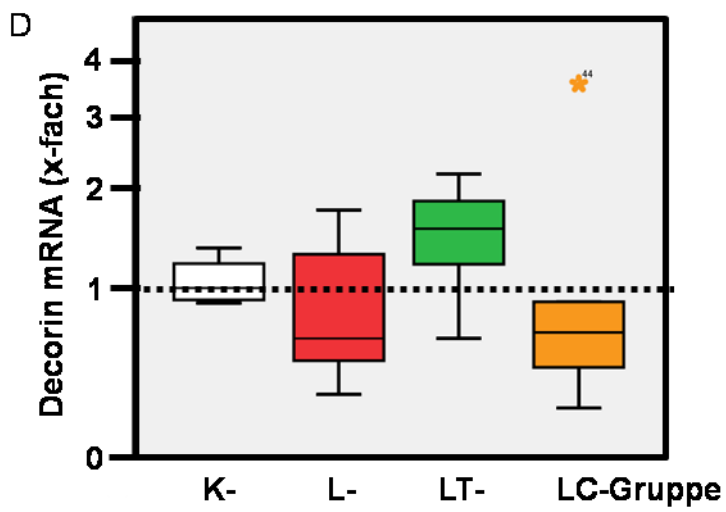
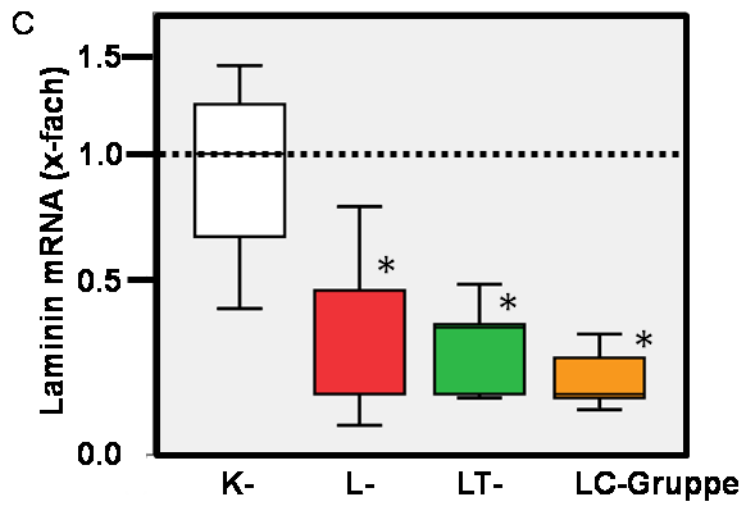
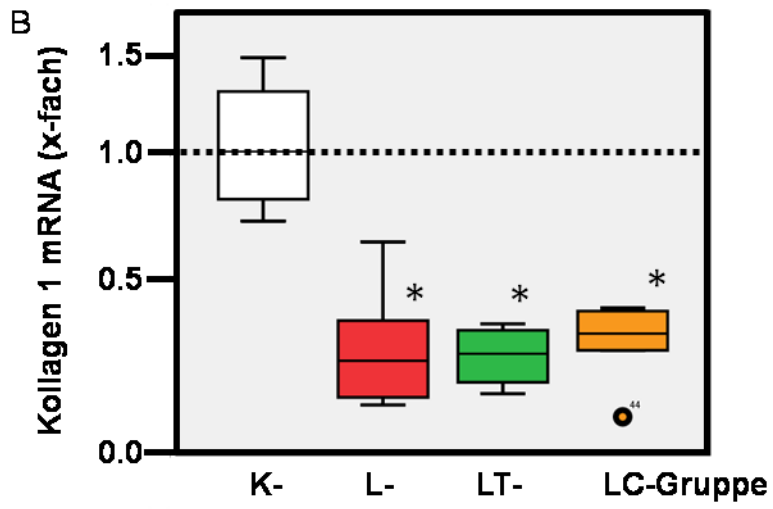
Abb.13: Diagramm der densitometrischen Auswertung des in Abb.12 dargestellten Western Blots
 Dargestellt sind die Boxplot-Diagramme mit den Medianen, den 5% bis 95% Konfidenzintervallen. K-Gruppe: n = 3, L-Gruppe: n = 3, LT-Gruppe: n = 3, LC-Gruppe: n = 3, * = $p < 0,05$

4.1.8 Transforming growth factor- β -1 (TGF- β -1), Kollagen 1, Fibronectin, Decorin, Biglycan und Laminin

Auswirkungen auf den fibrotischen Umbau wurden über die Expression von TGF- β -1, Kollagen 1, Laminin, Decorin und Fibronectin mRNA untersucht (siehe Abb.14).

In der TGF- β -1 mRNA-Expression zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der mRNA-Expression in der L-, LC- und LT-Gruppe bezogen auf die K-Gruppe. Für die Kollagen 1 und Laminin mRNA-Expression war ebenfalls eine Reduktion in der L-, LC- und LT-Gruppe nachweisbar. Für die Decorin- und Fibronectin mRNA-Expression kam es zu keiner signifikanten Veränderung.





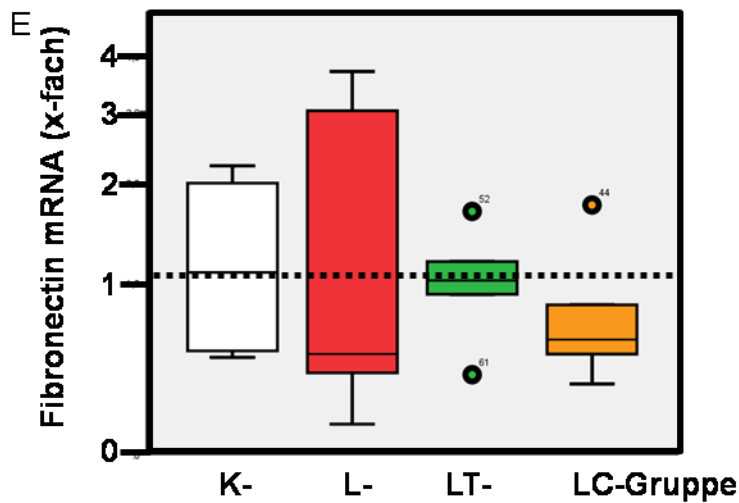


Abb.14: Diagramme der TGF- β -1, Kollagen 1, Laminin, Decorin, Fibronectin mRNA-Expression

Dargestellt sind die Boxplot-Diagramme mit den Medianen, den 5% bis 95% Konfidenzintervallen. Messwerte außerhalb des 5% bis 95% Konfidenzintervalls der zugehörigen Versuchsgruppe werden gesondert ausgewiesen. K-Gruppe: n = 5, L-Gruppe: n = 5, LT-Gruppe: n = 5, LC-Gruppe: n = 5, * = p<0,05 vs. K-Gruppe

4.1.9 Protein-Nitro-Tyrosin

Die Protein-Nitro-Tyrosin Bestimmung wurde durchgeführt, um den nitrosativen Stress in der Niere zu bestimmen (siehe Abb.15).

In der L-Gruppe fand sich ein signifikanter Anstieg der Protein-Nitro-Tyrosin Konzentration gegenüber der K-Gruppe. In der LT- und LC-Gruppe war dieser Effekt teilweise reversibel.

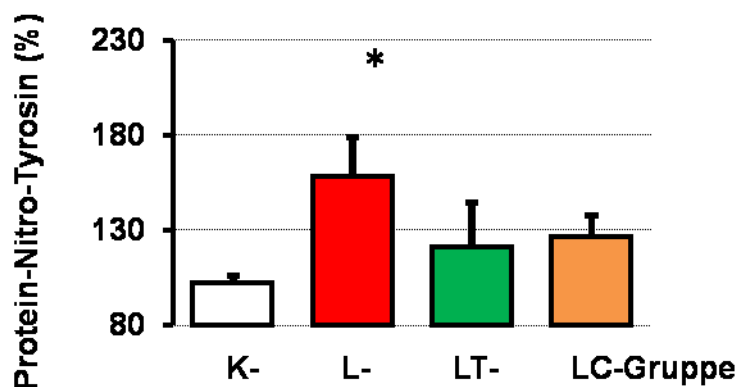


Abb. 15: Diagramm des prozentualen Anteils an Protein-Nitro-Tyrosin bezogen auf die K-Gruppe

Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. K-Gruppe: n = 5, L-Gruppe: n = 5, LT-Gruppe: n = 5, LC-Gruppe: n = 5, * = p<0,05 vs. K-Gruppe

4.2 Adaptationsvorgänge bei NO-Defizienz nach sechs Monaten

4.2.1 Systolischer Blutdruck (P_{sys})

Der P_{sys} wurde mittels "Tail-Cuff-Methode" bestimmt. Dargestellt sind hier die P_{sys} im Versuchstieralter von 13,5, 14 und 18 Monaten für die K-, L-, LC-, LH-Gruppe und im Versuchstieralter von 18 Monate für die C-Gruppe und H-Gruppe (siehe Abb.16). Die K-Gruppe zeigte bei 13,5 Monaten einen normotensiven P_{sys} . In der L-, LC- und LH-Gruppe war der P_{sys} bei 13,5 Monaten signifikant erhöht, die Tiere entwickelten eine Hypertonie. In der K- und L-Gruppe war die Zunahme des P_{sys} von 13,5 bis 18 Monate konstant. In der LC- und LH-Gruppe kam es bei 14 Monaten vorübergehend zur Reduktion des P_{sys} gegenüber den 13,5 Monate alten Versuchstieren. Mit zunehmenden Alter stiegen die P_{sys} in der LC- und LH-Gruppe wieder über die Messwerte bei 13,5 Monaten an. Im Vergleich der LC-Gruppe mit der LH-Gruppe wurde in der LH-Gruppe die größte Blutdrucksenkung erreicht.

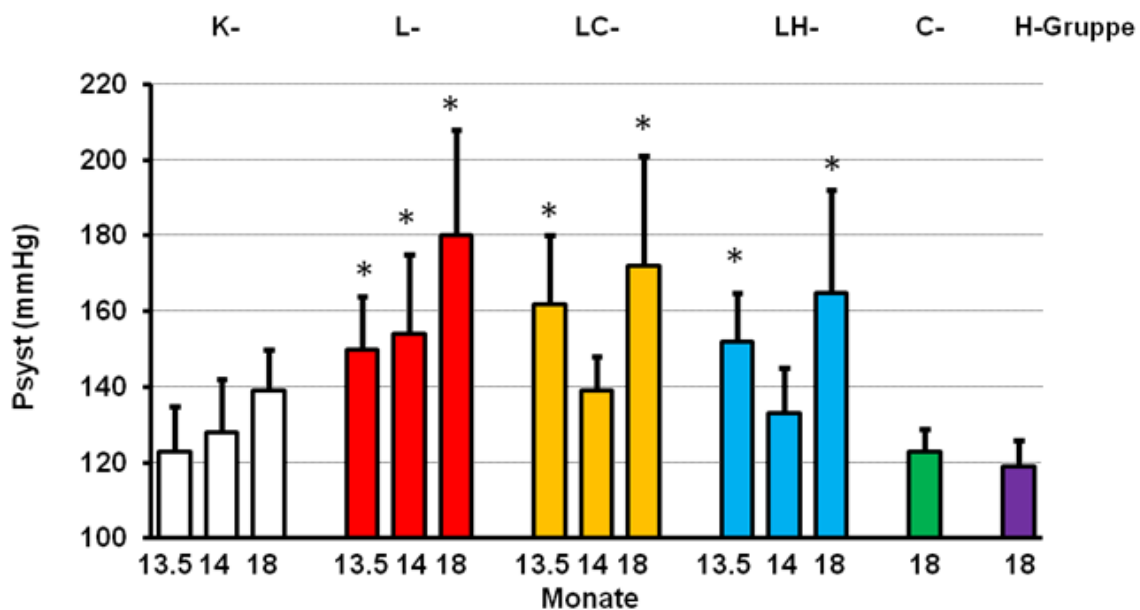


Abb.16: Diagramm der in vivo gemessenen P_{sys} nach 13,5, 14 und 18 Monaten in mmHG

Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. K-Gruppe: n = 14 Tiere, L-Gruppe: n = 12 Tiere im Alter von 13,5 Monaten, n = 11 Tiere im Alter von 14 Monaten und n = 8 Tiere im Alter von 18 Monaten, LC-Gruppe: n = 12 Tiere im Alter von 13,5 Monaten und 14 Monaten, n = 10 Tiere im Alter von 18 Monaten, LH-Gruppe: n = 10 Tiere im Alter von 13,5 Monaten und 14 Monaten, n = 9 Tiere im Alter von 18 Monaten, C-Gruppe: n = 6 Tiere, H-Gruppe: n = 6 Tiere, * = $p < 0,05$ vs. K-Gruppe

4.2.2 Nierengewicht (NW)

Um Veränderungen des NW bei sechsmonatiger NO-Defizienz festzustellen wurde das NW/TI gemessen (Abb.17). In den Versuchsgruppen veränderte sich das NW/TI nicht signifikant zueinander.

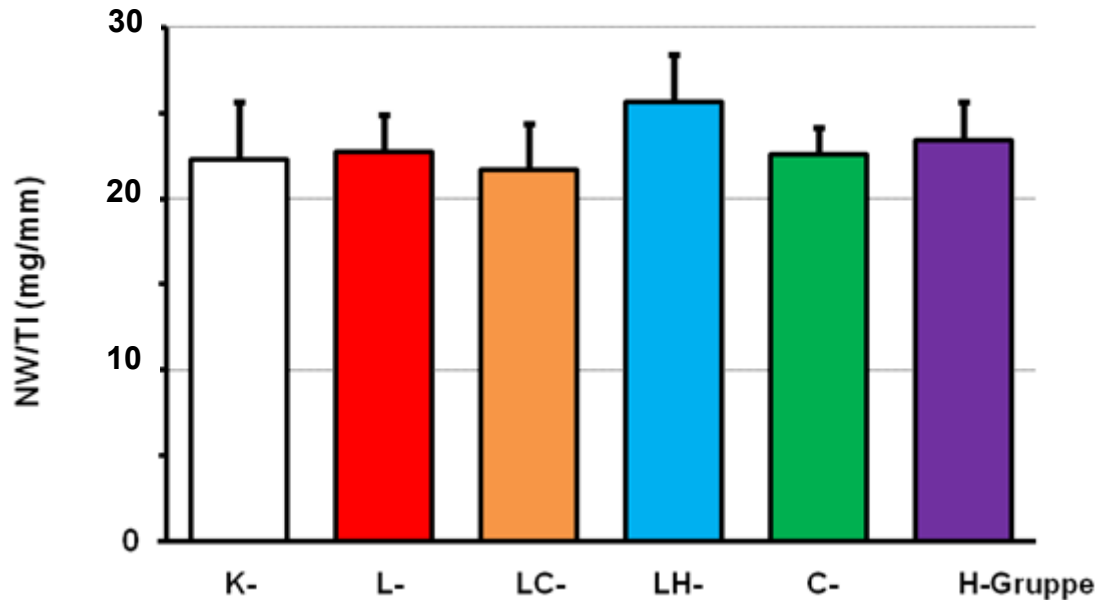


Abb.17: Diagramm der NW normiert auf die TI in mg/mm

Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. K-Gruppe: n = 6 Tiere, L-Gruppe: n = 6 Tiere, LC-Gruppe: n = 6 Tiere, LH-Gruppe: n = 6 Tiere, C-Gruppe: n = 6 Tiere, H-Gruppe: n = 6 Tiere

4.2.3 Blood urea nitrogen (BUN)

Der Einfluss der sechsmonatigen NOS-Inhibition auf die Nierenfunktion wurde über die Quantifizierung des BUN gemessen (siehe Abb.18). In der L- und LH-Gruppe verschlechterte sich die Nierenfunktion signifikant gegenüber der K-Gruppe, messbar an den erhöhten BUN-Konzentrationen. Die größte Zunahme des BUN war in der L-Gruppe zu beobachten. In der C-, H- und LC-Gruppe war keine signifikante Veränderung der BUN-Konzentration nachweisbar.

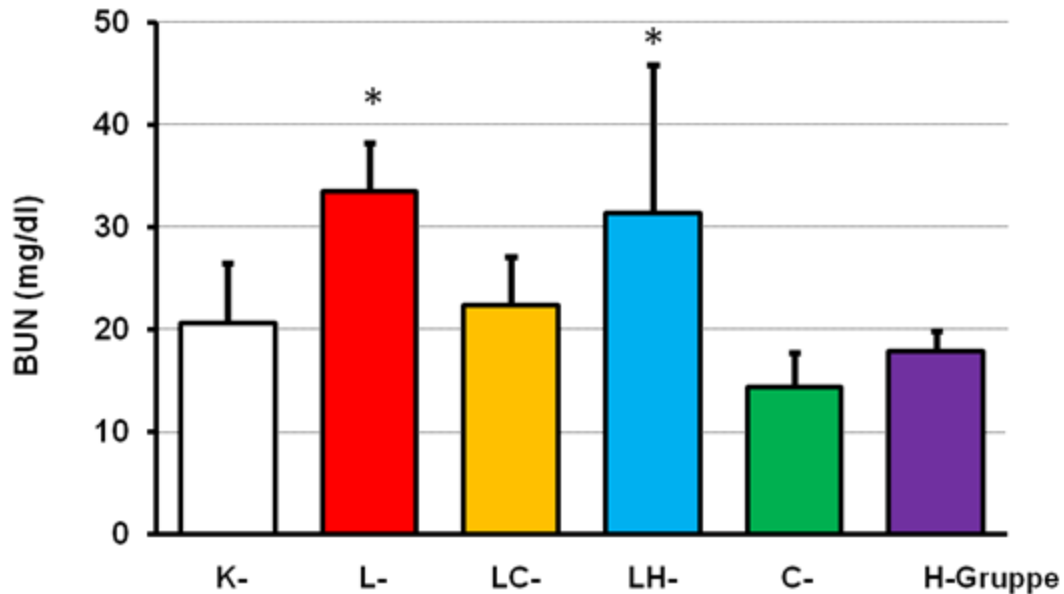


Abb.18: Diagramm der BUN-Konzentrationen in mg/ml

Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. K-Gruppe: n = 10 Tiere, L-Gruppe: n = 10 Tiere, LC-Gruppe: n = 10 Tiere, LH-Gruppe: n = 9 Tiere, C-Gruppe: n = 6 Tiere, H-Gruppe: n = 6 Tiere, * = p < 0,05 vs. K-Gruppe

4.2.4 Plasma-Elektrolytzusammensetzung

Die Plasma- Na^+ -, Plasma- K^+ - und Plasma- Ca^{2+} -Konzentrationen wurde bestimmt (siehe Abb.19).

In der L-, LC-, LH-, C- und H-Gruppe waren die Plasma- Na^+ -Konzentrationen vermindert. Diese Reduktion war in der L-Gruppe signifikant gegenüber der K-Gruppe. Für die Plasma- K^+ -Konzentration kam es in der L-Gruppe zu einer signifikanten Erhöhung in Relation zur K-Gruppe. Diese bestand in den anderen Versuchsgruppen nicht. Die Plasma- Ca^{2+} -Konzentration war in der C- und H-Gruppe signifikant gegenüber der K-Gruppe erhöht, was für die LC- und LH-Gruppe nicht nachgewiesen werden konnte.

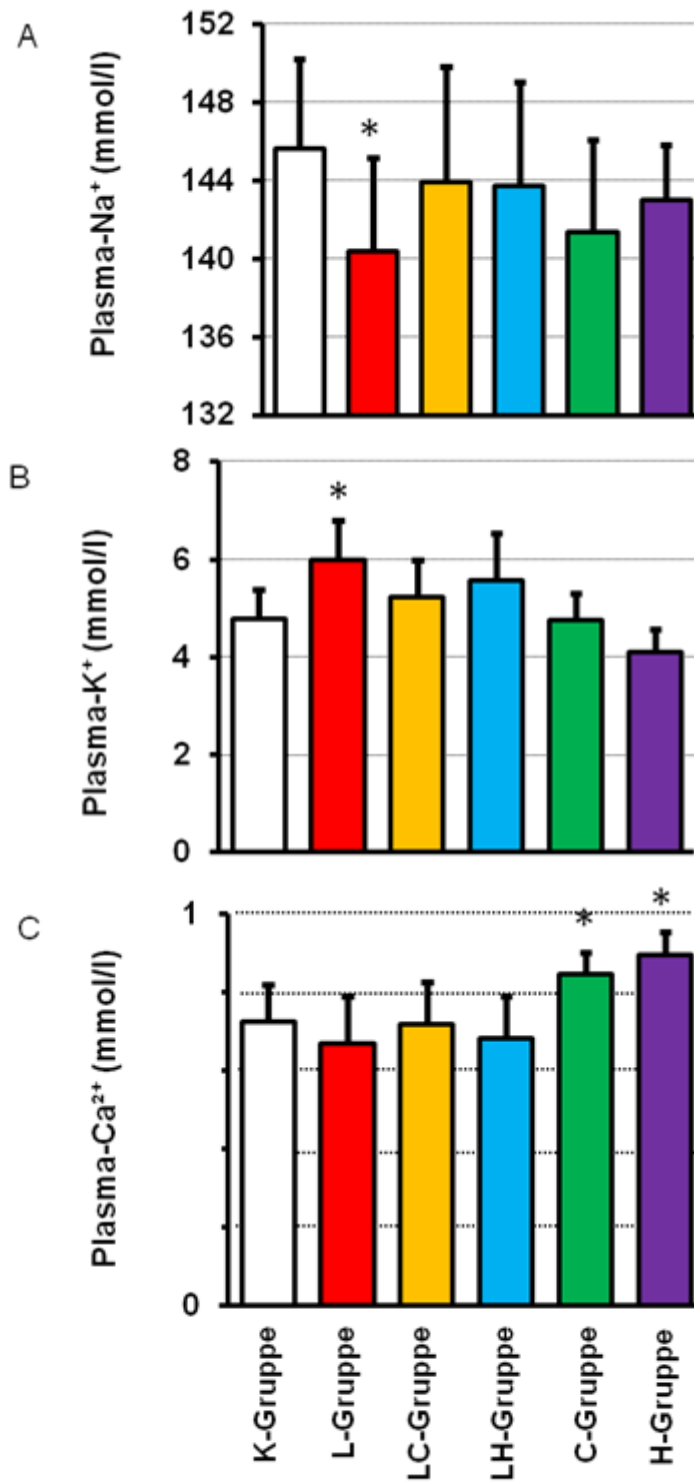


Abb.19: Diagramme der Plasma-Na⁺, Plasma-K⁺ und Plasma-Ca²⁺-Konzentrationen in mmol/l
 Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. K-Gruppe: n = 10 Tiere, L-Gruppe: n = 10 Tiere,
 LC-Gruppe: n = 10 Tiere, LH-Gruppe: n = 10 Tiere, C-Gruppe: n = 6 Tiere, H-Gruppe: n = 6 Tiere, * = p < 0,05 vs.
 K-Gruppe

4.2.5 Parathyroid hormone related peptide (PTHrP)

Der Einfluss der NO-Defizienz auf die PTHrP-Expression in der Niere wurde mittels PCR und Western Blot untersucht (siehe Abb.20,21 und 22).

In der L-Gruppe war die PTHrP mRNA-Expression signifikant gegenüber der K-Gruppe erhöht. Die C-, H-, LC- und LH-Gruppe zeigten keine signifikanten Veränderungen der PTHrP mRNA-Expression.

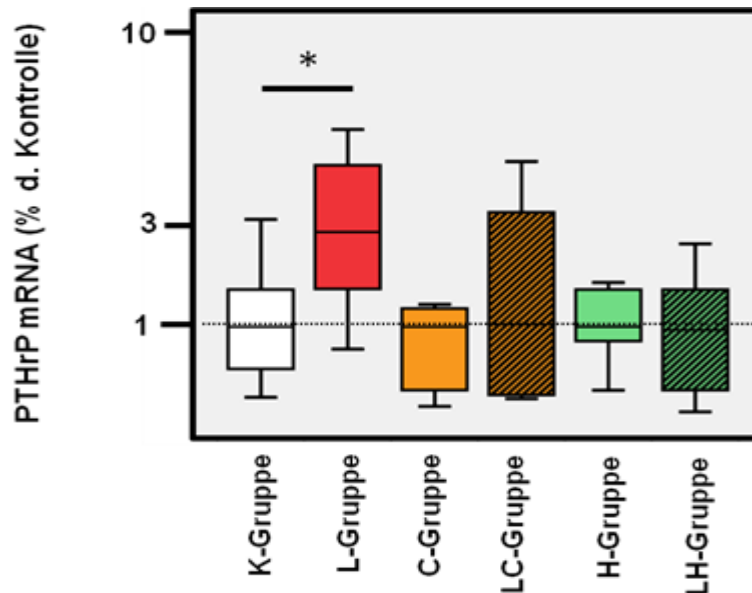


Abb.20: Diagramm der PTHrP mRNA-Expression

Dargestellt sind die Boxplot-Diagramme mit den Medianen, den 5% bis 95% Konfidenzintervallen. K-Gruppe: n = 10 Tiere, L-Gruppe: n = 10 Tiere, C-Gruppe: n = 6 Tiere, LC-Gruppe: n = 10 Tiere, H-Gruppe: n = 6 Tiere, LH-Gruppe: n = 10 Tiere, * = p < 0,05

Auf Proteinebene war die PTHrP Konzentration in der L-Gruppe signifikant gegenüber der K-Gruppe reduziert. In den anderen Versuchsgruppen kam es zu keiner signifikanten Veränderung der PTHrP Konzentration.

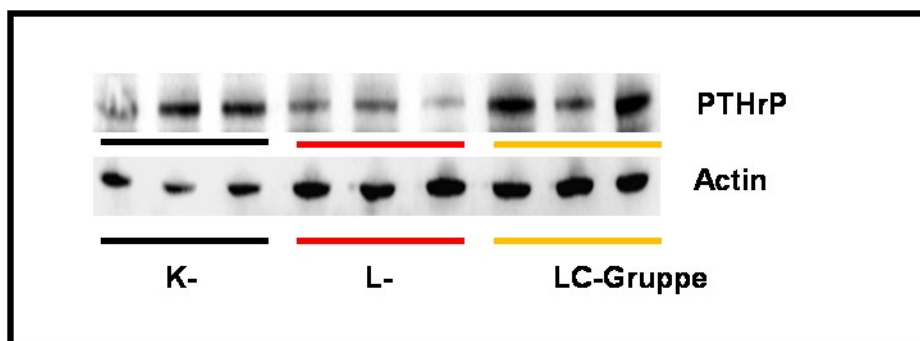


Abb.21: Darstellung des Western Blots zur Ermittlung der PTHrP-Signalstärke

Die Abbildung zeigt die mit Anti-Rabbit IgG und Anti-PTHrP markierten Banden eines Western Blots. K-Gruppe: n = 3 Tiere, L-Gruppe: n = 3 Tiere, LC-Gruppe: n = 3 Tiere

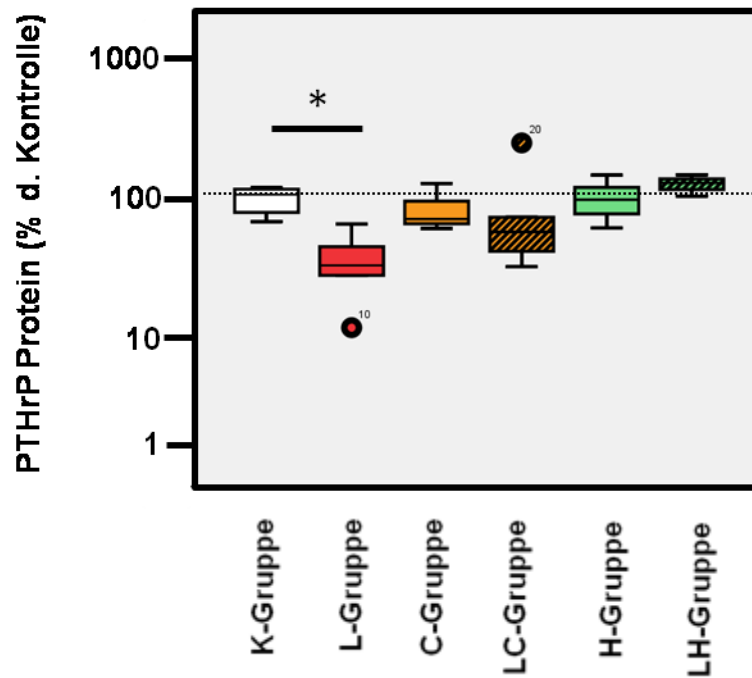


Abb.22: Diagramm der densitometrischen Auswertung des in Abb.21 dargestellten Western Blots
 Dargestellt sind die Boxplot-Diagramme mit den Medianen, den 5% bis 95% Konfidenzintervallen. Messwerte außerhalb des 5% bis 95% Konfidenzintervalls der zugehörigen Versuchsgruppe werden gesondert ausgewiesen. K-Gruppe: n = 10 Tiere, L-Gruppe: n = 10 Tiere, C-Gruppe: n = 6 Tiere, LC-Gruppe: n = 10 Tiere, H-Gruppe: n = 6 Tiere, LH-Gruppe: n = 10 Tiere, * = p < 0,05

4.2.6 Ornithindecaboxylase (ODC)

Die Auswirkungen auf den Polyaminstoffwechsel wurden über die Expression (mRNA und Protein) der ODC dargestellt (siehe Abb.23 und 24).

In der L-Gruppe war die ODC mRNA-Konzentration signifikant gegenüber der K-Gruppe reduziert. Eine weitere signifikante Reduktion der ODC mRNA-Konzentration zeigte sich in der LH-Gruppe bezogen auf die H-Gruppe.

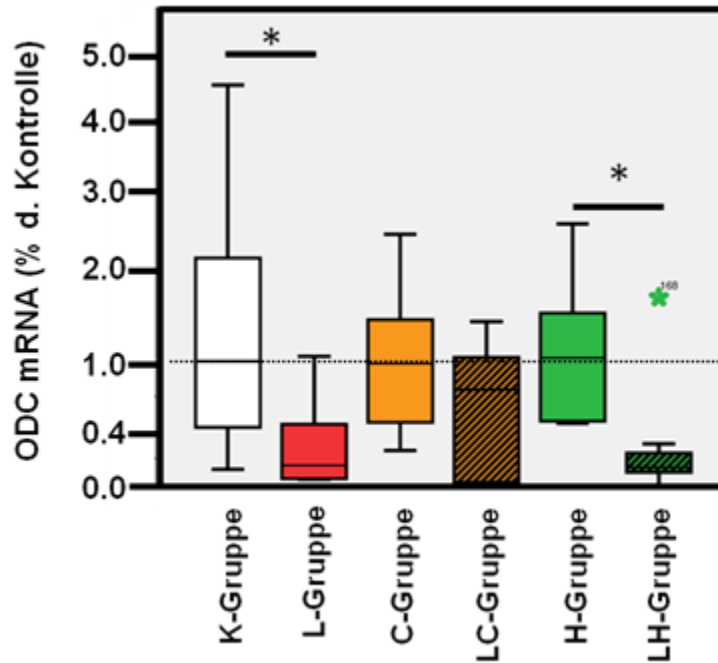


Abb.23: Diagramm der ODC mRNA-Expression

Dargestellt sind die Boxplot-Diagramme mit den Medianen, den 5% bis 95% Konfidenzintervallen. Ein Messwert außerhalb des 5% bis 95% Konfidenzintervalls der zugehörigen Versuchsgruppe wird gesondert ausgewiesen. K-Gruppe: n = 10 Tiere, L-Gruppe: n = 10 Tiere, C-Gruppe: n = 6 Tiere, LC-Gruppe: n = 10 Tiere, H-Gruppe: n = 6 Tiere, LH-Gruppe: n = 10 Tiere, * = p < 0,05

Die Reduktion der ODC mRNA-Konzentration in der L-Gruppe konnte auch post-translational auf Proteinebene bestätigt werden. Diese war signifikant gegenüber der K-Gruppe. In den anderen Versuchsgruppen zeigte sich keine klare Veränderung der ODC Konzentration.

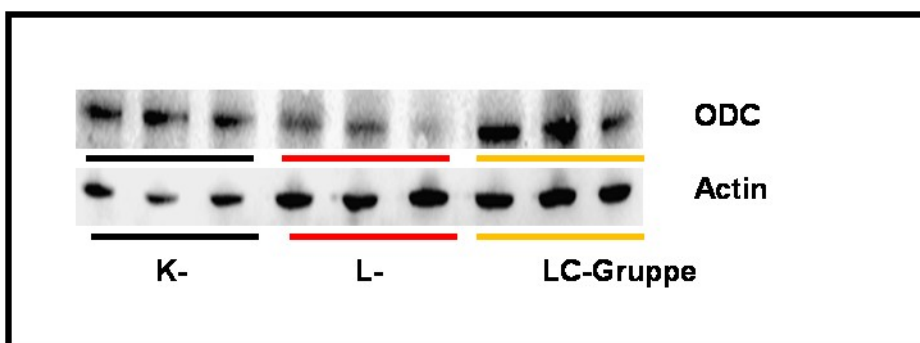


Abb.24: Darstellung des Western Blots zur Ermittlung der ODC-Signalstärke

Die Abbildung zeigt die mit Anti-Rabbit IgG und Anti-Biglycan markierten Banden eines Western Blots. K-Gruppe: n = 3 Tiere, L-Gruppe: n = 3 Tiere, LC-Gruppe: n = 3 Tiere

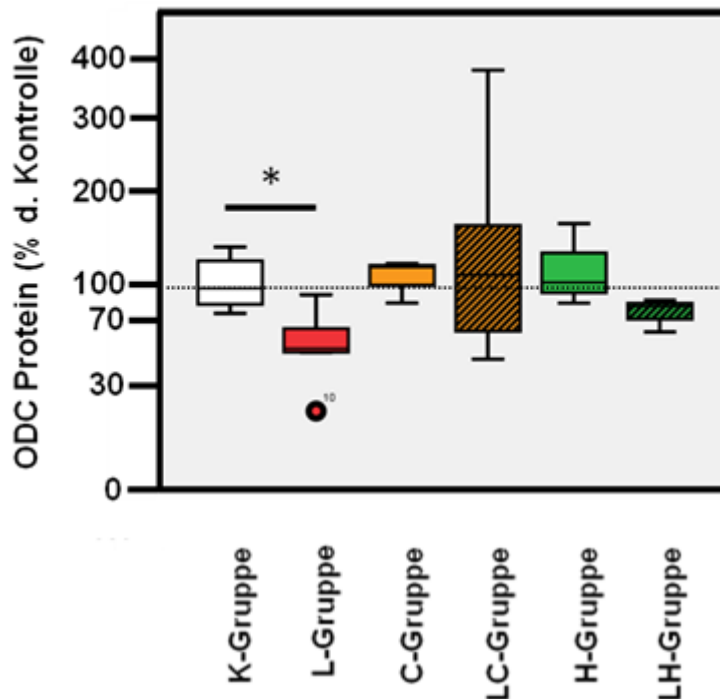


Abb.25: Diagramm der densitometrischen Auswertung des in Abb.24 dargestellten Western Blots. Dargestellt sind die Boxplot Diagramme mit den Medianen, den 5% bis 95% Konfidenzintervallen. Ein Messwert außerhalb des 5% bis 95% Konfidenzintervalls der zugehörigen Versuchsgruppe wird gesondert ausgewiesen. K-Gruppe: n = 10 Tiere, L-Gruppe: n = 10 Tiere, C-Gruppe: n = 6 Tiere, LC-Gruppe: n = 10 Tiere, H-Gruppe: n = 6 Tiere, LH-Gruppe: n = 10 Tiere, * = p < 0,05

4.2.7 Transforming growth factor- β -1 (TGF- β -1), Kollagen 1, Fibronectin

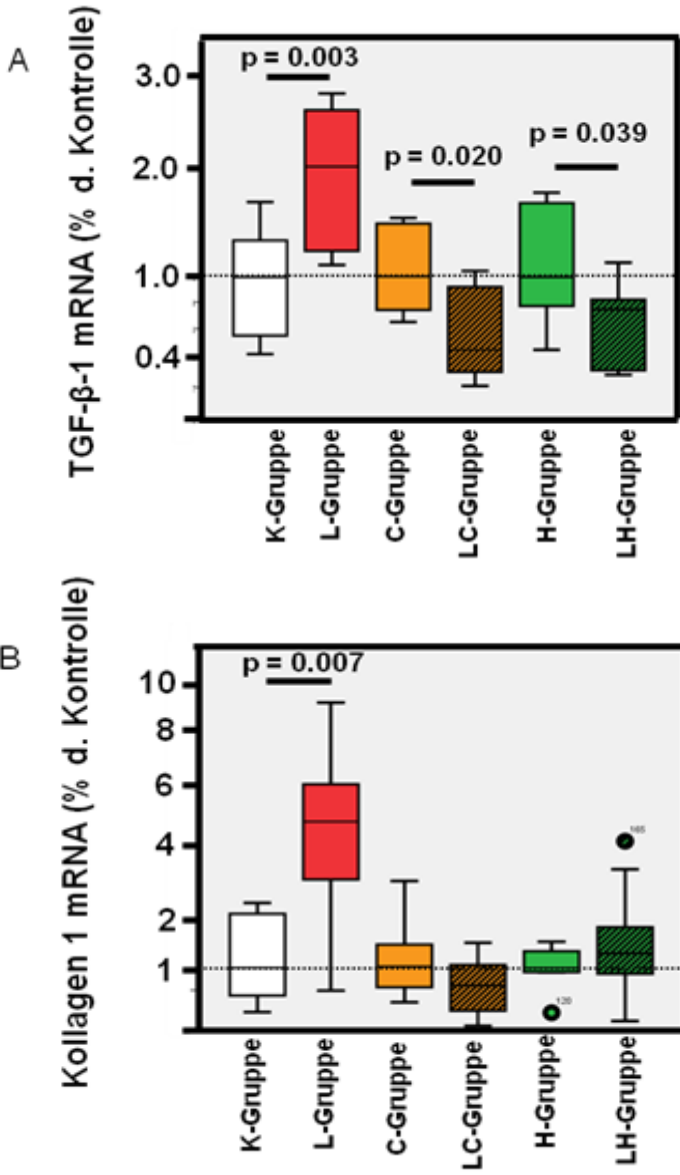
Um die Auswirkungen eines sechs monatigen NO-Defizits auf eine fibrotische Veränderung im Nierengewebe indirekt darzustellen, wurde die mRNA-Konzentration von TGF- β -1, Kollagen 1 und Fibronectin gemessen (siehe Abb.25).

In der L-Gruppe kam es zu einer signifikanten Zunahme der TGF- β -1 mRNA-Konzentration bezogen auf die K-Gruppe. Eine signifikante Reduktion der TGF- β -1 mRNA-Konzentration zeigte sich in der LC-Gruppe bezogen auf C-Gruppe und in der LH-Gruppe bezogen auf die H-Gruppe. Die C-, H-, LC- und LH-Gruppe waren gegenüber der K-Gruppe nicht wesentlich verändert.

In der L-Gruppe kam es im Vergleich zur K-Gruppe zu einer signifikanten Zunahme der Kollagen 1 mRNA-Konzentration. Die Kollagen 1 mRNA-Konzentration der C-, H-, LC- und LH-Gruppe waren nicht deutlich gegenüber der K-Gruppe verändert.

Die Fibronectin mRNA-Konzentration war deutlich erhöht in der L-, LC- und LH-Gruppe gegenüber der K-Gruppe. In der L-Gruppe war die Erhöhung bezogen auf die K-Gruppe signifikant. Für die C- und H-Gruppe bestand keine wesentliche Veränderung

in Relation zur K-Gruppe. In der LC-Gruppe war die Fibronectin mRNA-Konzentration signifikant erhöht gegenüber der C-Gruppe.



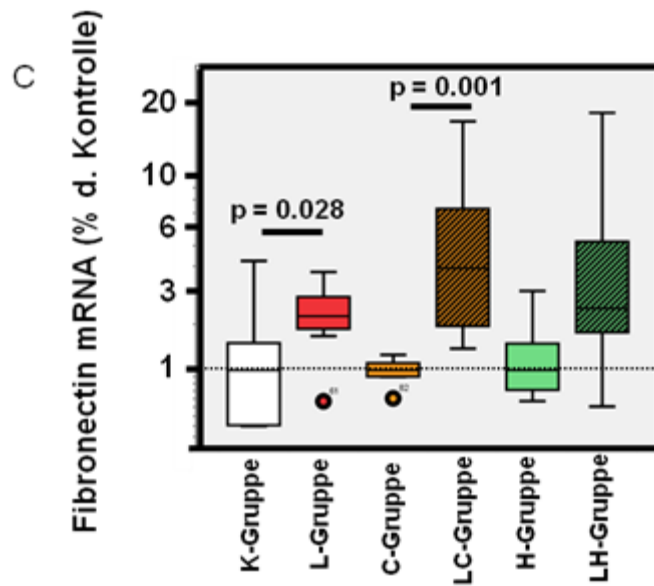


Abb.26: Diagramme der TGF- β -1, Kollagen 1 und Fibronectin mRNA-Expression

Dargestellt sind die Boxplot-Diagramme mit den Medianen, den 5% bis 95% Konfidenzintervallen. Messwerte außerhalb des 5% bis 95% Konfidenzintervalls der zugehörigen Versuchsgruppe werden gesondert ausgewiesen. K-Gruppe: n = 10 Tiere, L-Gruppe: n = 10 Tiere, C-Gruppe: n = 6 Tiere, LC-Gruppe: n = 10 Tiere, H-Gruppe: n = 6 Tiere, LH-Gruppe: n = 10 Tiere

4.2.8 Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase (NOX) und Superoxiddismutase (SOD)

Eine indirekte Beurteilung des oxidativen Stresses fand durch die Messung der mRNA-Konzentrationen von gp91phox und p22phox (siehe Abb.26) statt. Beide bilden Untereinheiten der NOX2.

In der L-Gruppe kam es zu einer signifikanten Zunahme der p22phox mRNA-Konzentration gegenüber der K-Gruppe. Die p22phox mRNA-Konzentration der C-, H-, LC- und LH-Gruppe war nicht signifikant gegenüber der K-Gruppe verändert.

Für die gp91phox mRNA-Konzentration zeigte sich in der C-, H-, L-, LC- und LH-Gruppe keine deutliche Veränderung gegenüber der K-Gruppe. In der LH- bezogen auf die H-Gruppe und die LC- bezogen auf die C-Gruppe zeigte sich eine signifikante Zunahme.

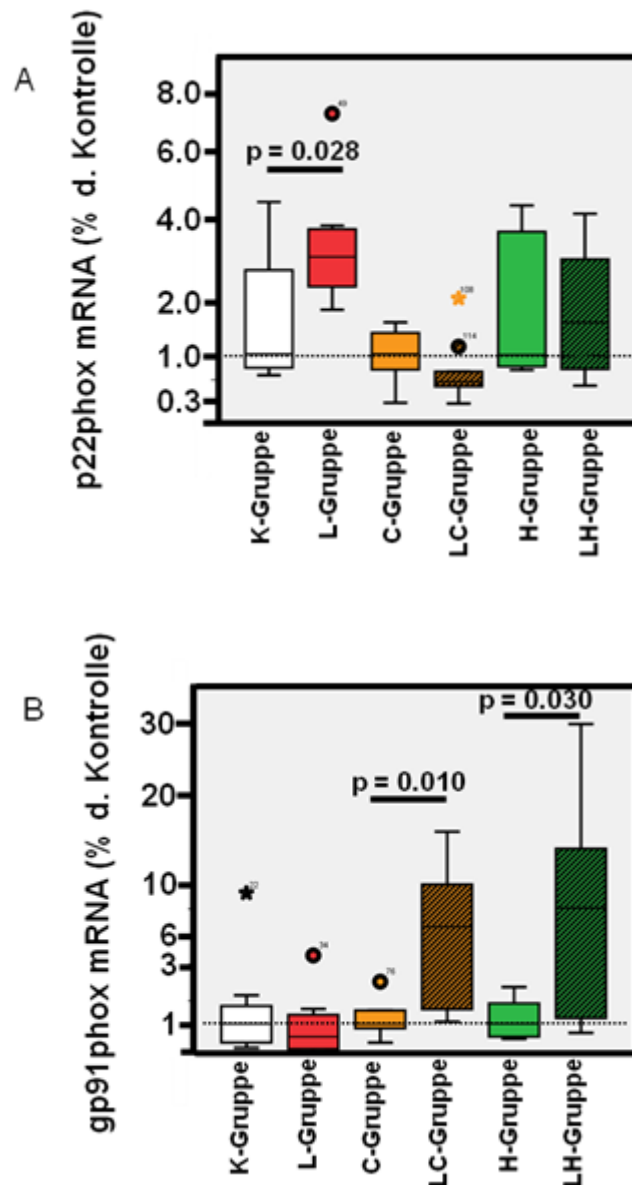


Abb.27: Diagramme der p22phox und gp91phox mRNA-Expression

Dargestellt sind die Boxplot-Diagramme mit den Medianen, den 5% bis 95% Konfidenzintervallen. Messwerte außerhalb des 5% bis 95% Konfidenzintervalls der zugehörigen Versuchsgruppe werden gesondert ausgewiesen. K-Gruppe: n = 10 Tiere, L-Gruppe: n = 10 Tiere, C-Gruppe: n = 6 Tiere, LC-Gruppe: n = 10 Tiere, H-Gruppe: n = 6 Tiere, LH-Gruppe: n = 10 Tiere

In Abb.27 sind die mRNA-Expression für SOD1-3 zu sehen. Es zeigte sich eine Abnahme der mRNA-Konzentration für alle SOD's in der Behandlung mit L-, LC- und LH-Gruppe gegenüber der K-Gruppe. Die Reduktion der SOD3 mRNA war in der L-Gruppe signifikant. Die C- und die H-Gruppe waren in der SOD mRNA-Konzentration nicht deutlich zur K-Gruppe verändert.

Für alle drei hier dargestellten SOD's war in der LH- bezogen auf die H-Gruppe und die LC- bezogen auf die C-Gruppe eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression

festzustellen. Auch in der L-Gruppe kam es zu einer verminderten mRNA-Expression der SOD's. Für SOD3 war diese gegenüber der K-Gruppe signifikant.

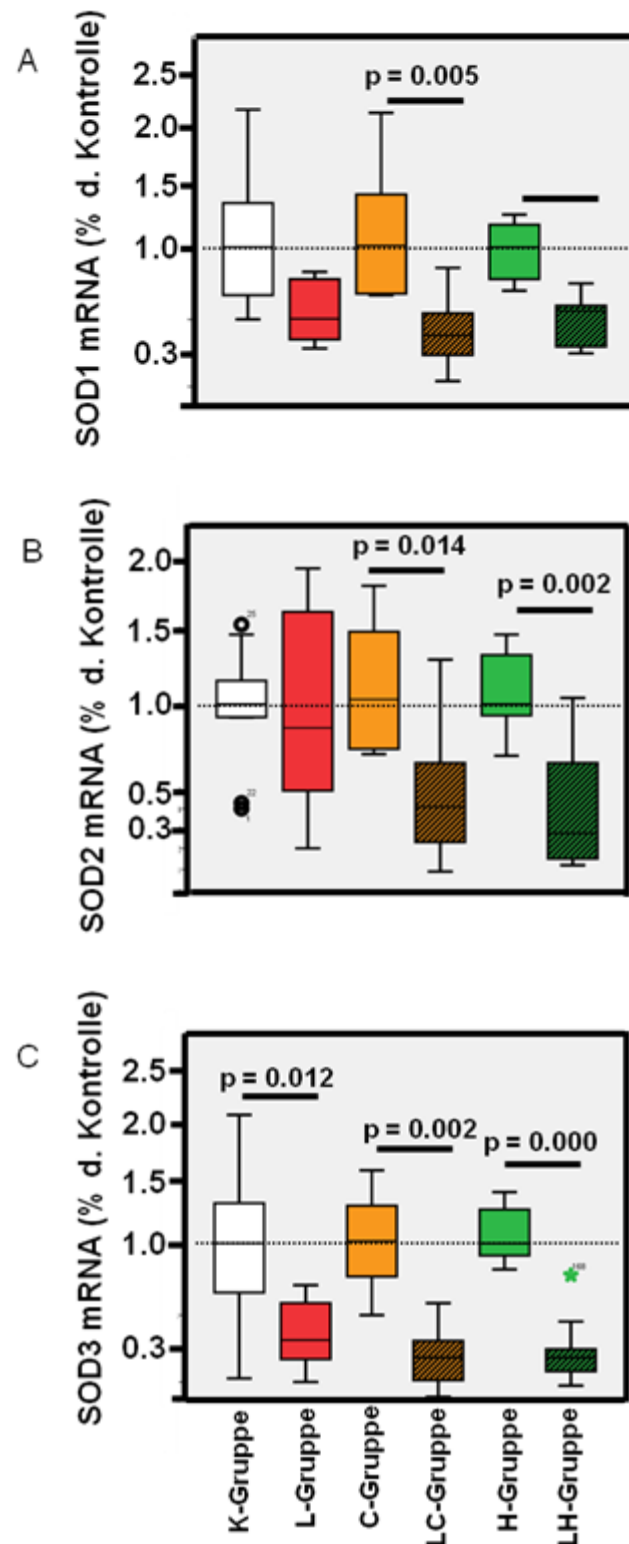


Abb.28: Diagramme der SOD1, SOD2 und SOD3 mRNA-Expression

Dargestellt sind die Boxplot-Diagramme mit den Medianen, den 5% bis 95% Konfidenzintervallen. Messwerte außerhalb des 5% bis 95% Konfidenzintervalls der zugehörigen Versuchsgruppe werden gesondert ausgewiesen. K-Gruppe: n = 10 Tiere, L-Gruppe: n = 10 Tiere, C-Gruppe: n = 6 Tiere, LC-Gruppe: n = 10 Tiere, H-Gruppe: n = 6 Tiere, LH-Gruppe: n = 10 Tiere

5. Diskussion der Befunde

Zu den langfristigen Folgen einer Hypertonie zählen eine hypertensive Nephropathie und eine chronische Niereninsuffizienz [2,5,6]. In dieser Arbeit wurde anhand des L-NAME Tiermodels eine Hypertonie erzeugt, um die Auswirkungen auf das strukturelle und funktionelle Remodeling der Niere sowie die Auswirkungen auf die Plasma-Elektrolytzusammensetzungen zu untersuchen. Es wurden zwei unterschiedliche Behandlungszeiträume ausgewählt. Einmal eine Dauer von vier Wochen und einmal eine Dauer von sechs Monaten. Um die Folgen des oxidativen Stresses, des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des Blutdrucks näher zu untersuchen, wurde Tempol, Captopril oder Hydralazin den Versuchstieren über das Trinkwasser zugefüttert. So konnte eine Aussage über die Wirksamkeit der Therapien für beide Zeiträume getroffen werden.

5.1 Hauptbefunde

Bluthochdruck und NO-Defizienz führten zu folgenden Anpassungsvorgängen in den Nieren:

1. Unter vier wöchiger L-NAME Applikation kam es unabhängig vom RAAS oder dem oxidativen Stress zu keiner Verschlechterung der Nierenfunktion gemessen am BUN.
2. Es stiegen im Plasma-Elektrolythaushalt die Plasma-K⁺-Konzentration unabhängig von einer Zufütterung mit Captopril oder Tempol signifikant an.
3. Die mRNA-Expression profibrotischer Marker war unabhängig vom oxidativen Stress oder dem RAAS reduziert.
4. Nach sechs monatiger L-NAME Applikation konnte die Niere ihre Funktion gemessen am BUN nur durch Hemmung des RAAS aufrecht erhalten.
5. Es blieb jedoch die Plasma-K⁺-Konzentration signifikant erhöht, während sich die Plasma-Na⁺-Konzentration signifikant reduzierte.

6. Durch Zufütterung von Captopril oder Hydralazin war die Veränderung in der Plasma-Elektrolytzusammensetzung durch NO-Defizienz reversibel.
7. Die mRNA-Expressionen profibrotischer Marker waren erhöht, was durch Zufütterung von Captopril oder Hydralazin teilweise reversibel war.

5.2 Einflussmöglichkeiten auf den Blutdruck bei Stickstoffmonoxid (NO)-Defizienz

Nach erfolgreicher Hypertonieentwicklung unter L-NAME Applikation, wurden während eines vier wöchigen Behandlungszeitraums die zusätzlichen Einflüsse des oxidativen Stresses und des RAAS auf den P_{sys} im Tiermodell untersucht. Wie bereits in vorherigen Studien beschrieben, zeigte sich, dass die Reduktion des oxidativen Stresses keinen signifikanten Einfluss auf den Blutdruck nahm [86], während durch die Hemmung des RAAS eine ausreichende Blutdrucksenkung erzielt wurde [85,86,87].

Über einen L-NAME Applikationszeitraum von sechs Monaten wurden die Auswirkungen einer Hemmung des RAAS oder einer unspezifischen Gefäßrelaxation auf den P_{sys} exemplarisch für 13,5, 14 und 18 Monate dargestellt. Durch Captopril oder Hydralazin normalisierte sich der P_{sys} im Alter von 14 Monaten. Eine Blutdrucksenkung in den normotonen P_{sys} war bei den 18 Monate alten Versuchstieren überraschenderweise für beide Medikamente nicht nachweisbar. Eine Hypothese zur Erklärung der unzureichenden antihypertensiven Wirkung in der LC- und LH-Gruppe im Alter von 18 Monaten, könnte die höhere Expression von Endothelin-1 mit zunehmenden Lebensalter sein [88]. Übereinstimmend wurde in einer weiteren Studie ebenfalls ein kontinuierlicher Blutdruckanstieg unter der Gabe von L-NAME und Captopril beobachtet [87].

5.3 Nierenfunktion

In dieser Arbeit wurden die Folgen einer NOS Inhibition für die Nierenfunktion gemessen am BUN und einer adjuvanten Therapie mit Captopril und Tempol für dieses Studiendesign erstmalig untersucht. Die Ergebnisse zeigten unter vierwöchiger NO-Defizienz keine Verschlechterung der BUN Konzentrationen.

Die Datenlage aus der vorherigen Forschung ist uneinheitlich. In anderen Studiendesignen wurde bei der Gabe von L-NAME gemessen am Harnstoff im Plasma über eine Verschlechterung [90,91], als auch über keine Verschlechterung berichtet [89].

Über einen Zeitraum von sechs Monaten konnten die Nieren unter NO-Defizienz und Bluthochdruck ihre Funktion nicht aufrecht erhalten. Es kam zu einem deutlichen Anstieg der Harnstoffkonzentration gemessen am BUN. Dies ist vereinbar mit einer hypertensiven Nephropathie [8]. Durch die Blutdrucksenkung mit Hydralazin ließ sich die Nierenfunktion nicht verbessern, erst durch die spezifische Hemmung des RAAS unter Captopril fand sich ein protektiver Effekt. Diese Beobachtung zeigte die Bedeutung der Regulation des RAAS für die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion.

5.4 Plasma-Elektrolytzusammensetzung

Für dieses Studiendesign wurden erstmals Veränderungen der Plasma-Elektrolytzusammensetzung unter NO-Defizienz für eine adjuvante Therapie mit Captopril und Tempol untersucht. Die hier bestimmten Plasma-Elektrolytzusammensetzungen im Organismus bilden Indikatoren für den H₂O-Haushalt (Na⁺) [92], das Membranpotenzial (K⁺) [93] sowie den Vitamin D₃ Haushalt (Ca²⁺) [94]. Die Zusammensetzung der Plasma-Elektrolyte wird wesentlich durch die Filtration in den Glomeruli und die tubuläre Rückresorption in den Nierentubuli gesteuert [95].

Die Versuchstiere wiesen unter NO-Defizienz und Bluthochdruck nach vier Wochen erhöhte Plasma-K⁺-Konzentration auf. Eine Reduktion des oxidativen Stresses mit Tempol oder eine Blutdrucksenkung und Hemmung des RAAS mit Captopril konnten die Plasma-K⁺-Konzentration nicht wieder normalisieren. Diese Beobachtung zeigte die Bedeutung von NO für den K⁺-Haushalt. Die Ergebnisse deuten auf eine Veränderung der Nierenfunktion mit K⁺-Restriktion hin.

Die Datenlage aus früheren Studien ist uneinheitlich. In einer vorherigen Studie wurde übereinstimmend über eine K⁺-Restriktion unter L-NAME Gabe bei normalen Na⁺-Werten berichtet [96], andererseits wurden keine Unterschiede in einer anderen Studie bei der K⁺-Clearance gemessen und über normale Serumwerte für K⁺ und Na⁺ berichtet [97]. Weiterhin wurde bei einer zweiwöchigen Behandlung mit L-NAME über eine Abnahme des Serum-Na⁺ und Serum-K⁺ berichtet [98]. Dieses deutet auf eine vielfältige Modulation von NO auf den Elektrolythaushalt hin.

Nach sechs Monaten kam es unter NO-Defizienz und Bluthochdruck zu Veränderungen im Na⁺- und K⁺-Haushalt. Die Veränderungen zeigten sich insbesondere in der Gegenläufigkeit der Plasma-Na⁺- und Plasma-K⁺-Konzentration. Es kam zur Reduktion, der für den H₂O-Haushalt wichtigen Na⁺-Ionen und zu einer Erhöhung, der für das Membranpotenzial wichtigen K⁺-Ionen. Die Niere konnte den

Elektrolythaushalt unter L-NAME Gabe nicht mehr regulieren. Ursächlich für die beschriebene Elektrolytveränderung könnte ein hyporenämischer Hypoaldosteronismus als Endorganschaden in der Niere durch L-NAME Gabe sein [99]. Durch adjuvante Therapie mit Captopril oder Hydralazin reduzierte sich die Plasma-K⁺-Konzentration wieder. Die Reduktion war unter Captopriltherapie größer als unter Hydralazintherapie. Dies zeigte, dass neben dem Blutdruck weitere Faktoren wie das RAAS bei der Reduktion Plasma-K⁺-Konzentration eine wesentliche Rolle spielen. Der Abfall der Plasma-Na⁺-Konzentration bei den Versuchstieren unter L-NAME Gabe konnte durch eine Behandlung mit Hydralazin oder Captopril stabilisiert werden. Der Mechanismus hierzu ist bislang unbekannt.

Erstaunlicherweise erhöhten spätere Monobehandlungen mit Hydralazin und Captopril die Ca²⁺-Spiegel im Plasma. Dieser Mechanismus ist bislang ebenfalls unbekannt. Interessanterweise wurde ein Zusammenhang zwischen PTH und dem RAAS nachgewiesen [100].

5.5 Nierengewicht (NW) und Polyaminstoffwechsel

Es wurden mögliche Adaptationsmechanismen der Nieren in Bezug auf das NW normiert auf die TI unter NO-Defizienz untersucht. Zellgewebe können je nach Einfluss von physiologischen und pathologischen Stimuli hypertrophieren oder atrophieren [102]. Bei Bluthochdruck wurden insbesondere Endorganschäden für die Gefäße mit Arteriosklerose beschrieben [102], als Folge können die Nieren je nach betroffenem Gefäßabschnitt nicht mehr ausreichend mit O₂ versorgt werden und atrophieren [103]. Untersuchungen bezogen auf das NW wurden bislang noch nicht für einen Zeitraum von sechs Monaten unter L-NAME Behandlung und Bluthochdruck sowie vier Wochen bei adjuvanter Tempolgabe durchgeführt. Sowohl in der Untersuchung nach sechs Monaten, als auch in der Untersuchung nach vier Wochen, fanden sich unter NO-Defizienz keine Veränderungen in Bezug auf das NW normiert auf die TI im Vergleich zu den Kontrollen. Eine Reduktion des oxidativen Stresses als auch eine Blutdruckregulation veränderten das NW nicht. Andere Autoren berichteten ebenfalls, dass sich das NW unter L-NAME Gabe nicht veränderte [104]. Für männliche Wistar Hannover Ratten wurde über eine Zunahme des NW durch L-NAME Gabe berichtet [105].

Wir überprüften wie sich die Behandlung mit L-NAME und Bluthochdruck auf die ODC als Schlüsselenzym des Polyaminstoffwechsels in der Niere auswirkte. Polyamine sind

wesentlich an der Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum und der Apoptose beteiligt [106]. Sowohl zu hohe, als auch zu niedrige Spiegel an Polyaminen können zur Apoptose führen [107].

Die Behandlung mit L-NAME führte bei den Versuchstieren nach vier Wochen zu einer signifikanten Abnahme der ODC mRNA-Expression in Relation zu den Kontrollen. Eine Reduktion des oxidativen Stress, als auch eine Hemmung des RAAS, führten zu keiner Normalisierung. Dies legte nahe, dass der Effekt abhängig von NO war. Post-translational auf Proteinebene zeigte sich, dass nur bei einer L-NAME Monobehandlung die ODC Konzentration signifikant erniedrigt blieb. Eine Hemmung des RAAS und eine Reduktion des oxidativen Stresses konnten die ODC Konzentration in der Niere wieder normalisieren. Somit scheint eine Hemmung des RAAS und des oxidativen Stresses zu einer deutlichen Verbesserung des Zellstoffwechsels zu führen.

Nach sechs Monaten blieben die ODC mRNA-Expressionen unter L-NAME Monobehandlung erniedrigt. Hydralazin führte nicht zu einer Erhöhung der ODC mRNA-Expression, jedoch ließ sich durch Captopril die ODC mRNA-Konzentration wesentlich normalisieren. Auf Proteinebene blieb nur in der L-NAME Monobehandlung die ODC Konzentration signifikant reduziert. Eine Reduktion des Bluthochdrucks führte zu einer Annäherung der ODC Konzentration an die Kontrollen, die Normalisierung zeigte sich unter Behandlung mit Captopril effektiver, als unter Hydralazin. Die Ergebnisse legen nahe, dass durch eine spezifische Hemmung des RAAS der Zellstoffwechsel besser stabilisiert werden konnte.

In einer früheren Studie über die Auswirkung einer L-NAME Gabe auf die ODC Konzentration in den Blutgefäßen wurde, je nach betroffenem Gefäß, eine leichte bis keine Veränderung auf die ODC Konzentration unter L-NAME Gabe beschrieben [108].

5.6 Renale Fibrose

Die fibrotische Niere ist gekennzeichnet durch eine Zunahme an extrazellulärer Matrix und einer damit verbundenen Reduktion der Nierenfunktion [109]. Die chronische Beanspruchung des RAAS führt zu maladaptiven Prozessen, welche wesentlich durch TGF- β beeinflusst werden [110,111].

Die Ergebnisse dieser Studie legen eine antifibrotische Gegenregulation auf mRNA-Ebene unter L-NAME Applikation über vier Wochen nahe. Diese zeigte sich in einer reduzierten mRNA-Expression von TGF- β -1, Kollagen 1, Laminin und Biglycan gegenüber den Kontrollen. Die reduzierten mRNA-Expressionen waren unabhängig

von einer Reduktion des oxidativen Stresses oder einer Hemmung des RAAS. Für die Decorin mRNA-Konzentration bestand eine leichte Herabregulation, welche sich unter Tempol, nicht aber unter Captopril normalisierte. Für die Fibronectin mRNA-Konzentration war in den Versuchsgruppen keine klare Veränderung in der mRNA-Expression erkennbar. Post-translational erhöhte sich die Biglycan Expression in der Zufütterung mit Captopril oder Tempol gegenüber den Kontrollen und der reinen L-NAME Behandlung. Für Tempol war diese Erhöhung gegenüber der reinen L-NAME Behandlung signifikant. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Reduktion des oxidativen Stresses, aber auch eine Hemmung des RAAS wesentlich für eine antifibrotische Gegenregulation sind.

In einer früheren Studie wurde ebenfalls über eine Heraufregulation von TGF- β und eine Zunahme an Kollagen 1 und Fibronectin im L-NAME Tiermodell in der Niere berichtet, welche sich ebenfalls auf Proteinebene bestätigte [112]. Eine klare TGF- β abhängige Regulation für Fibronectin konnte in dieser Studie nach vier Wochen nicht nachgewiesen werden.

Die Niere konnte nach sechsmonatiger L-NAME Applikation die antifibrotischen Prozesse nicht aufrechterhalten. Die Genexpression für TGF- β und Kollagen 1 waren signifikant erhöht. Für diesen Zeitraum zeigte sich die Blutdrucksenkung als wesentlich für die antifibrotische Gegenregulation. Sowohl unter Hydralazin als auch unter Captopril, war die Niere in der Lage eine antifibrotische Gegenregulation für den Kollagenstoffwechsel aufrecht zu erhalten. Anders als bei Kollagen 1 konnte sowohl eine Hemmung des RAAS als auch eine Blutdruckregulation mit Hydralazin die Heraufregulation von Fibronectin nicht normalisieren. Nach sechs Monaten konnte die in der Literatur beschriebene TGF- β abhängige Regulation von Fibronectin in der Niere nachgewiesen werden [112].

5.7 Parathyroid hormone related peptide (PTHrP)

PTHrP wirkt vasorelaxierend und ist somit gegensätzlich in seiner Wirkung zu L-NAME [65,66,67]. Frühere Studien berichteten in der isolierten Niere über eine signifikante Abnahme der relaxierenden Wirkung im Gefäßbett von PTHrP unter L-NAME Applikation [113,114].

Die Auswirkung einer NO-Defizienz in der Niere auf die PTHrP mRNA- und Proteinkonzentration wurden in dieser Arbeit erstmalig untersucht. In der Niere war nach einer vierwöchigen NO-Defizienz ein verminderter Gehalt an PTHrP mRNA

nachweisbar. Die Applikation von Captopril oder Tempol normalisierten die PTHrP mRNA-Konzentration nicht. Auch auf Proteinebene war durch die L-NAME Behandlung eine Abnahme der PTHrP Konzentration zu beobachten. Dem gegenüber erhöhte sich durch die Zufütterung von Captopril oder Tempol zu L-NAME der PTHrP Anteil in Bezug auf die anderen Versuchsgruppen. Für Tempol war die Zunahme der PTHrP Konzentration sogar signifikant gegenüber der L-NAME Behandlung. So konnte unter vierwöchiger L-NAME Applikation nachgewiesen werden, dass die Inhibitionen der NOS sich gering auf die Bildung von PTHrP auswirkte. Die Niere konnte post-translational die verminderte Genexpression zumindest teilweise ausgleichen. Eine Hemmung des RAAS sowie eine Reduktion des oxidativen Stresses förderten dies. Nach sechsmonatiger NO-Defizienz in der Niere kam es zu einer signifikant verminderten PTHrP Konzentration. Kompensatorisch war die PTHrP mRNA-Expression bezogen auf die Kontrollen signifikant erhöht. Beide Effekte waren durch Senkung des Blutdrucks rückläufig, was einen wesentlichen Einfluss des Blutdrucks als mechanischen Reiz auf die PTHrP Expression zeigte. Wie auch in der vierwöchigen Adaptation führte eine Blutdrucksenkung zu einer Teilnormalisierung der PTHrP Konzentration unter NO-Defizienz. Die von anderen Autoren beobachtete Zunahme an PTHrP unter erhöhtem mechanischem Stress [62,65], konnte jedoch in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. NO zeigte sich als wesentlicher Faktor für die Bildung von PTHrP. Eine Blutdrucksenkung unter NO-Defizienz ging mit erhöhten PTHrP Konzentrationen einher.

5.8 Oxidativer Stress

Für alle Forschungsmodelle der Hypertonie konnte eine Zunahme des oxidativen Stresses im Gefäßbett nachgewiesen werden. Eine wesentliche Quelle des oxidativen Stresses im Gefäßbett sind die NOX [27]. In der Niere befinden sich ebenfalls NOX im dicken aufsteigenden Teil der Henle Schleife [115]. Aus einem Ungleichgewicht zwischen NO und O_2^- resultierten eine endotheliale Dysfunktion sowie Endorganschäden [25,29].

Die Folge eines sechsmonatigen NO-Defizits auf die Genexpression von gp91phox und p22phox als indirekte Marker für oxidativen Stress wurden in dieser Arbeit untersucht. Gp91phox ist eine Untereinheit der NOX2, p22phox ist eine Untereinheit der NOX1-4 [71,72,73]. Durch die Behandlung mit L-NAME war die p22phox mRNA-Konzentration deutlich gegenüber den Kontrollen heraufreguliert. Ähnliche Beobachtungen wurden auch aus einer früheren Studie berichtet [116,117]. Die

Messung der p22phox mRNA-Konzentration zeigte unter Hemmung des RAAS eine Normalisierung. Ein protektiver Effekt vor oxidativem Stress wurde auch in der vorherigen Studie durch eine adjuvante Losartantherapie berichtet [116]. Eine reine Blutdrucksenkung durch Hydralazin hingegen führte nur zu einer leichten Abnahme der p22phox mRNA. Übereinstimmend wurde für eine adjuvante Hydralazintherapie in einer früheren Studien über eine erhöhte NOX mRNA-Expressionen sowie einen unzureichender Schutz vor Endorganschäden beschrieben [118]. Monobehandlungen mit Hydralazin und Captopril wirkten sich nicht auf die Genexpression von p22phox im Vergleich zu den Kontrollen aus.

Für gp91phox fanden wir unter sechsmonatiger NO-Defizienz keine wesentlichen Unterschiede in der Genexpression von gp91phox mRNA im Vergleich zu den Kontrollen. In einer vorherigen Studie mit einem zweiwöchigen Behandlungszeitraum wurde über erhöhte gp91phox Konzentrationen berichtet [116]. Erstaunlicherweise waren in dieser Arbeit durch die adjuvante Behandlungen mit Captopril oder Hydralazin die Genexpressionen für gp91phox erhöht. Es zeigte sich somit in Bezug auf die mRNA-Expression der NOX durch eine Behandlung mit Hydralazin oder Captopril keine eindeutige Veränderung.

Für die SOD's war bei den Isoformen SOD1-3 eine Abnahme der Expression in Relation zu den Kontrollen unter sechsmonatiger L-NAME Behandlung festzustellen. Für SOD3 war die Abnahme der mRNA-Konzentration signifikant. Ähnliche Beobachtungen über sechs- und zwölfwöchige Behandlungszeiträume wurden bereits in früheren Studien berichtet [120,121]. Die beschriebenen protektiven Effekte der Hemmung des RAAS auf die Heraufregulation der SOD [120] konnten in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Adjuvante Behandlungen mit Hydralazin oder Captopril führten zu keiner Verbesserung in der mRNA-Expression. Für die SOD1-3 wurde sogar eine signifikante Herabregulation in der mRNA-Expression in Relation zur Captopril oder Hydralazin Monobehandlung beobachtet. Dies lässt vermuten, dass NO nach sechs Monaten essentiell für die Regulation der SOD mRNA-Expression ist.

Protein-Nitro-Tyrosin wird vermehrt im Gewebe bei nitrosativen Stress gebildet [21]. Aufgrund einer verminderten Aktivität der NOS durch L-NAME Applikation ist die vermehrte Bildung von Protein-Nitro-Tyrosin auf eine erhöhte O_2^- Konzentrationen in dieser Studie zurückzuführen [119,122].

Nach vierwöchiger NO-Defizienz konnte indirekt über die vermehrte Bildung von Protein-Nitro-Tyrosin eine erhöhte O_2^- Konzentration nachgewiesen werden. Wie auch in der Literatur beschrieben, reduzierte sich die O_2^- Konzentration unter einer

adjuvanten Behandlung mit Tempol oder Captopril [120,122]. Durch eine Hemmung des RAAS oder Reduktion des oxidativen Stresse konnte die Niere den nitrosativen Stress durch O_2^- -Radikale gut kompensieren.

5.9 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ein vierwöchiges NO-Defizit und der daraus resultierende Bluthochdruck von der Niere gut kompensiert wurde. Eine Hemmung des RAAS als auch die Senkung des oxidativen Stresses förderten die adaptiven Prozesse. Sowohl bei den mit L-NAME behandelten Versuchstieren als auch in der Zufütterung von Tempol oder Captopril, blieb die Nierenfunktion, gemessen an dem BUN erhalten. Mit einer Reduktion von nitrosativen Stress durch Tempol oder Captopril war auch eine Normalisierung der ODC Konzentration erkennbar. Eine antifibrotische Gegenregulation in allen mit L-NAME behandelten Versuchstieren wurde besonders in einer reduzierten TGF- β Genexpression deutlich.

Nach sechs Monaten konnte eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO durch die Niere nicht kompensiert werden. Die beste Korrelation zwischen den funktionellen Beeinträchtigungen und den molekularen Anpassungen ergab sich für den Polyaminstoffwechsel, charakterisiert durch eine verminderte ODC Expression in der L-NAME Versuchsgruppe. Eine Normalisierung konnte durch die Senkung des Blutdrucks erreicht werden. Dies zeigte sich ebenfalls in der Reduktion der mRNA-Expression von TGF- β . Die Nierenfunktion gemessen am BUN war langfristig nur durch Hemmung des RAAS zu erhalten.

6. Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele: Oxidativer Stress, Bluthochdruck und das RAAS sind wesentlich an der Entstehung und Progredienz der hypertensiven Nephropathie beteiligt. Die Auswirkungen der genannten Einflussfaktoren wurden bislang unzureichend im Tiermodell erforscht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher in der Niere die funktionellen und strukturellen Adaptationsvorgänge nach vier Wochen sowie nach sechs Monaten darzustellen. Durch die Kenntnis der molekulargenetischen und funktionellen Vorgänge ist es zukünftig möglich, Ansatzpunkte für Therapien zu optimieren.

Methoden: Im Tiermodell mit Wistar Hannover Ratten wurden die Auswirkungen einer L-NAME Behandlung in der Niere über vier Wochen sowie sechs Monaten bestimmt. Ergänzend erfolgte eine Behandlung mit Captopril oder Tempol über vier Wochen sowie von Captopril oder Hydralazin über sechs Monate. Die Blutdruckmessung erfolgte regelmäßig mittels „Tail-Cuff-Methode“. Die entnommenen Nieren wurden molekulargenetisch mittels PCR und Western Blot untersucht. Im Plasma wurden der BUN und die Plasma-Elektrolytzusammensetzung ermittelt. Mittels ELISA erfolgte eine Quantifizierung des Protein-Nitro-Tyrosin.

Ergebnisse: Die in dieser Studie erhobenen Daten zeigten die Entwicklung einer Hypertonie durch vierwöchige L-NAME Gabe. Eine Senkung des Blutdrucks konnte nur durch Hemmung des RAAS, nicht aber durch Reduktion des oxidativen Stresses, erzielt werden. Durch NO-Defizienz kam es zu keiner Änderung des NW. Die Nierenfunktion gemessen am BUN blieb in allen Versuchsgruppen erhalten, wobei die Plasma-K⁺-Konzentrationen in den mit L-NAME behandelten Versuchsgruppen erhöht waren. Zudem zeigte sich in der L-NAME Applikation ein erhöhter Protein-Nitro-Tyrosin Gehalt und eine verminderte ODC Expression. Eine Hemmung des RAAS oder Senkung des oxidativen Stresses normalisierten dies. Hinweise für eine antifibrotische Gegenregulation, am besten bestimmt in einer verminderten TGF- β mRNA-Expression, waren bei L-NAME Gabe nachweisbar. Die Kombination mit Captopril oder Tempol führte hingegen zu einer Reduktion der TGF- β mRNA-Expression gegenüber den Kontrollen. Bezogen auf die PTHrP mRNA-Konzentration in der Niere reduzierte eine NOS Inhibition diese. Durch Captopril oder Tempol war dies für die mRNA-

Konzentration nicht reversibel. Post-translational konnte die PTHrP Konzentration nur in der L-NAME Behandlung reduziert werden. Eine adjuvante Therapie mit Tempol erhöhte die PTHrP Konzentration sogar signifikant gegenüber den Kontrollen.

Nach sechsmonatiger NO-Defizienz war eine Hypertonie in den mit L-NAME behandelten Versuchsgruppen nachweisbar. Eine Captopril- oder Hydralazintherapie führte zu keiner ausreichenden Blutdrucksenkung. Für das NW kam es zu keiner Veränderung in den Versuchsgruppen. Die Nierenfunktion bei NO-Defizienz blieb nur durch die Behandlung mit Captopril erhalten. Im Plasma-Elektrolythaushalt führte eine NOS Inhibition zu einer erhöhten Plasma-K⁺-Konzentration und reduzierte die Plasma-Na⁺-Konzentration. Therapien mit Captopril oder Hydralazin normalisierten dies. Erstaunlicherweise waren für Monobehandlungen mit Captopril oder Hydralazin die Plasma-Ca²⁺-Konzentrationen erhöht. Indirekte Hinweise auf erhöhten oxidativen Stress gemessen an p22phox, gp91phox sowie SOD1-3 mRNA-Expressionen zeigten sich in allen NO-defizienten Versuchsgruppen. Obwohl indirekte Hinweise für oxidativen Stress durch NOS Inhibition vorlagen, war die reduzierte ODC Konzentration durch die L-NAME Behandlung in der Therapie mit Captopril oder Hydralazin reversibel. Hinweise für eine Fibrose, am besten bestimmt in einer erhöhten TGF-β mRNA-Expression, waren unter NO-Defizienz nachweisbar. Eine Behandlung mit Captopril oder Hydralazin optimierte diese. Die Erhöhung der Fibronectin mRNA-Expression durch NOS Inhibition war zumindest teilweise durch Captopril oder Hydralazin reversibel. Eine L-NAME Behandlung reduzierte die PTHrP Konzentration, wobei eine Behandlung mit Hydralazin als auch mit Captopril die PTHrP Konzentration normalisierte.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend konnte die Niere ein NO-Defizit über einen Zeitraum von vier Wochen kompensieren. Nach sechs Monaten war durch NOS Inhibition eine hypertensive Nephropathie nachweisbar. Eine Erhaltung der Nierenfunktion über diesen Zeitraum war durch reine Blutdrucksenkung mit Hydralazin nicht möglich, sondern erst durch eine spezifische Hemmung des RAAS mit Captopril. Erstaunlicherweise konnten Hydralazin als auch Captopril den Blutdruck bei den älteren Tieren nicht senken.

7. Summary

Background and aims: Oxidative stress, high blood pressure and RAAS are significantly involved in the development and progression of hypertensive nephropathy. The influence of these parameters has been insufficiently researched in an animal model so far. The aim of this doctoral research study was therefore to present the functional and structural adaptation process in the kidney after four weeks as well as six months. Knowledge in molecular and functional processes enable optimized therapeutic approaches.

Methods: The impact of L-NAME treatment of the kidney was analyzed after four weeks and six months by using an animal model with Wistar Hannover rats. Additionally, the rats were treated with captopril or tempol for four weeks as well as captopril or hydralazine for six months, respectively. The blood pressure measurement was carried out regularly by the „Tail-Cuff-method“. The resected kidneys were further analyzed by PCR and Western Blot. The BUN, and electrolyte composition of the plasma were determined. The protein-nitro-tyrosin was quantified by the application of the ELISA technique.

Results: In the present study, the compiled data showed a development of hypertension by a L-NAME treatment over four weeks. A reduction of the blood pressure could only be achieved through RAAS inhibition, but not by decreasing the oxidative stress. The NO-deficiency had no impact on the NW. The renal function measured according to the BUN was maintained in all treated experimental groups, although the plasma-K⁺-concentration of the L-NAME treated rats was increased. Additionally, the L-NAME application induced an increased protein-nitro-tyrosin concentration and decreased ODC expression. This reaction was normalized through an inhibition of RAAS or reduction of oxidative stress. The evidence of an antifibrotic regulation was shown by a reduced TGF- β -mRNA-expression under L-NAME application. Contrarily, the combination with captopril or tempol induced a reduction of the TGF- β -mRNA-expression as compared to the controls. An NOS inhibition reduced the renal PTHrP mRNA-concentration.

Captopril and tempol had no impact on the mRNA-concentration. The PTHrP concentration could be only reduced by the L-NAME treatment, postranlationally. An adjuvant therapy with tempol significantly increased the PTHrP concentration as compared to the controls.

After six months of NO-deficiency, a hypertension in the L-NAME treated experimental rats was detectable. A therapy with captopril or hydralazine didn't result in a sufficient reduction of the blood pressure. For the NW no alterations could be observed in the experimental groups. In case of a NO deficiency, the renal function could be maintained by the treatment with captopril. An NOS-inhibition increased the plasma-K⁺-concentration and reduced the plasma-Na⁺-concentration of the plasma-electrolyte balance. This could be normalized by therapies with captopril or hydralazine. Surprisingly, monotherapeutic applications of captopril or hydralazine increased the plasma-Ca²⁺-level concentration. Indirect evidence of increased oxidative stress determined by p22phox, gp91phox as well as SOD1-3 mRNA-expressions was shown in NO-deficient experimental groups. The reduced ODC concentration was reversible through the L-Name treatment with captopril or hydralazine, although indirect evidence existed for oxidative stress by an NOS inhibition.

Evidenz for a fibrosis which was determined by a TGF- β mRNA expression, was detectable in case of a NO-deficiency. This was optimized by the application of captopril or hydralazine. An increase of the fibronectin mRNA-expression by NOS inhibition was partially reversible by captopril or hydralazine. A L-NAME treatment reduced the PTHrP concentration, in which a treatment with hydralazin as well as captopril normalized the PTHrP concentration.

Conclusion: In summary, the kidney could compensate a NO-deficiency for four weeks. After six months a hypertensive nephropathy was detectable by NOS inhibition. A maintenance of the kidney function was not possible through lowering the blood pressure with Hydralazin, but only by a specific inhibition of RAAS with captopril. Remarkably, hydralazine as well as captopril couldn't lower the blood pressure in elderly rats.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Diagramm der in vivo gemessenen P_{sys} nach vier Wochen in mmHG	30
Abb.2: Diagramm der NW normiert ihre TI in mg/mm.....	31
Abb.3: Diagramm der BUN-Konzentrationen in mg/dl	31
Abb.4: Diagramme der Plasma- Na^+ -, Plasma- K^+ - und Plasma- Ca^{2+} -Konzentrationen in mmol/l.....	32
Abb.5: Diagramm der Biglycan mRNA-Expression.....	33
Abb.6: Darstellung des Western Blots zur Ermittlung der Biglycan Signalstärke	33
Abb.7: Diagramm der densitometrischen Auswertung des in Abb.6 dargestellten Western Blots	34
Abb.8: Diagramm der PTHrP mRNA-Expression	34
Abb.9: Darstellung des Western Blots zur Ermittlung der PTHrP-Signalstärke.....	35
Abb.10: Diagramm der densitometrischen Auswertung des in Abb.9 dargestellten Western Blots	35
Abb.11: Diagramm der ODC mRNA-Expression	36
Abb.12: Darstellung des Western Blots zur Ermittlung der ODC-Signalstärke	36
Abb.13: Diagramm der densitometrischen Auswertung des in Abb.12 dargestellten Western Blots	37
Abb.14: Diagramme der TGF- β -1, Kollagen 1, Laminin, Decorin, Fibronectin mRNA- Expression.....	37-39
Abb. 15: Diagramm des prozentualen Anteils an Protein-Nitro-Tyrosin bezogen die K- Gruppe	39
Abb.16: Diagramm der in vivo gemessen P_{sys} nach 13,5, 14 und 18 Monaten in mmHG.....	40
Abb.17: Diagramm der NW normiert auf die TI in mg/mm	41
Abb.18: Diagramm der BUN-Konzentrationen in mg/ml	42
Abb.19: Diagramme der Plasma- Na^+ -, Plasma- K^+ - und Plasma- Ca^{2+} -Konzentrationen in mmol/l.....	43
Abb.20: Diagramm der PTHrP mRNA Expression	44

Abb.21: Darstellung des Western Blots zur Ermittlung der PTHrP-Signalstärke.....	44
Abb.22: Diagramm der densitometrischen Auswertung des in Abb.21 dargestellten Western Blots	45
Abb.23: Diagramm der ODC mRNA-Expression	46
Abb.24: Darstellung des Western-Blots zur Ermittlung der ODC-Signalstärke	46
Abb.25: Diagramm der densitometrischen Auswertung des in Abb.24 dargestellten Western Blots	47
Abb.26: Diagramme der TGF- β -1, Kollagen 1 und Fibronectin mRNA-Expression.	48-49
Abb.27: Diagramme der p22phox und gp91phox mRNA-Expression	50
Abb.28: Diagramme der SOD1, SOD2 und SOD3 mRNA-Expression	51

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab.1: Einteilung der Hypertonie nach der „Deutschen Hochdruckliga“ [2,3].....	2
Tab.2: Stadieneinteilung der Niereninsuffizienz nach den KIDGO-Leitlinien [16,17]....	3

9. Literaturverzeichnis

1. World Health Organisation. Global Health Observatory (GHO) data: Risk factors [Internet]. [zitiert am 20.05.2016]. URL: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence/en/
2. Janhsen K, Strube H, Starker A. Hypertonie. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 12/2008; (43): 1-35.
3. World Health Organisation. Q&As on Hypertension [Internet]. Last updated September 2015. [zitiert am 20.05.2016]. URL: <http://www.who.int/features/qa/82/en/>
4. Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F. In: Deutsche Gesellschaft für Kardiologie und Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL, Hrsg. Leitlinien für das Management der arteriellen Hypertonie. ESC Pocket Guidelines Leitlinien; 2013: 7.
5. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F. ESH / ESC Guidelines for the management of arterial hypertension [E-Book]. European Heart Journal. Latest version 06/21/2013; 34: 2159-2219. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/eh151>
6. von Scheidt W. Hypertonie und Hypotonie. In: Böhm M, Hallek M, Schmiegel W, Hrsg. Innere Medizin. München Elsevier; 2009: 243-251.

7. Krollner B, Krollner DM. Kardiologie Hamburg. ICD-10-GM-2017 Code Suche und OPS-2017 Code Suche [Internet]. 2017 [zitiert am 22.03.2017]. URL: <http://www.icd-code.de/icd/code/l10.-.html>
8. von Scheidt W. Hypertonie und Hypotonie. In: Böhm M, Hallek M, Schmiegel W, Hrsg. Innere Medizin. München Elsevier; 2009: 261-262.
9. Deutsche Gesellschaft für Nephrologie. Daten und Fakten zur Niere und zu Nierenersatzverfahren [Internet]. 06/2009 [zitiert am 16.03.2017]. URL: <http://www.dgfn.eu/presse/downloadbereich/daten-und-fakten-zur-nephrologie.html>
10. Sommers SC. Hypertension and kidney disease. Progress in cardiovascular diseases. 11/1965; 8(3): 210-234. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0033-0620\(65\)80016-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0033-0620(65)80016-0)
11. Schmieder R, Grube E, Rüdell H, Schlebusch H, Schulte W. Bedeutung der Mikroproteinurie zur Früherkennung hypertoniebedingter Endorganschäden. Klinische Wochenschrift. 1990; 68: 256-257.
12. Schmieder RE. Hypertoniebedingte Endorganschäden. Deutsches Ärzteblatt. 2010; 107(49): 866-873.
13. Hodgkins KS, Schnaper HW. Tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease. Pediatric Nephrologie (Berlin, Germany). 06/2012; 27(6): 901-909. doi: 10.1007/s00467-011-1992-9
14. Lang F, Kurtz A. Niere. In: Schmidt RF, Lang F, Hrsg. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. Heidelberg: Springer; 2007: 715.
15. Wanner C, Galle J. Chronische Niereninsuffizienz. In: Böhm M, Hallek M, Schmiegel W, Hrsg. Innere Medizin. München Elsevier; 2009: 1277-1282.
16. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney international supplements. 01/2013; 3(1): 5. doi:10.1038/kisup.2012.77

17. Deutsche Gesellschaft für Nephrologie. Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie zur Abschätzung der glomerulären Filtrationsrate [Internet]. 04/10/2014 [zitiert am 20.05.2016]. URL: <http://www.dgfn.eu/aerzte/meldungen/meldung-epi-ckd.html>
18. Mount PF, Power DA. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiologica*. 08/2006; 187(4): 433 - 446. doi: 10.1111/j.1748-1716.2006.01582.x
19. Villanueva C, Giulivi C. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free radical biology & medicine*. 08/01/2010; 49(3): 307-316. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.004
20. Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 05/01/1997; 272(5): 561-578.
21. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Review*. 01/2007; 87(1): 315-424. doi: 10.1152/physrev.00029.2006
22. Thoonen R, Sips PY, Bloch KD, Buys ES. Pathophysiology of hypertension in the absence of nitric oxide/cyclic GMP signaling. *Current Hypertension reports*. 02/2013; 15(1): 47-58. doi: 10.1007/s11906-012-0320-5
23. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Science*. 10/2015;129(2):83-94. doi: 10.1016/j.jphs.2015.09.002. Epub 2015 Sep 28
24. Buerk DG, Barbee KA, Jaron D. Nitric oxide signaling in the microcirculation. *Critical reviews in biomedical engineering*. 2011; 39(5): 397-433.
25. Bernatova I. Endothelial Dysfunction in Experimental Models of Arterial Hypertension: Cause or Consequence?. *BioMed Research International*. 05/13/2014; 2014: 1-41.

26. Armin J, Olson AJM, Whitten CL, Arendshorst J. Superoxide mediates acute renal vasoconstriction produced by angiotensin II and catecholamines by a mechanism independent of nitric oxide. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 01/01/2007; 292 (1): H83-H92, doi:10.1152/ajpheart.00715.2006
27. Carlström M, Lai EY, Ma Z, Patzak A, Brown RD, Persson AEG. Role of NOX2 in the regulation of afferent arteriole responsiveness. *American Journal of Physiology -Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 01/2009; 296(1): 72-79.
28. Araujo M, Wilcox CS. Oxidative stress in hypertension: role of the kidney. *Antioxidants & redox signaling*. 01/01.2014; 20(1): 74-101. doi: 10.1089/ars.2013.5259
29. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 05/1989; 83(5): 1774-1777. doi: 10.1172/JCI114081
30. Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D, Webb RC. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*. 02/1996; 78(2): 225-230.
31. Kolpakov V, Gordon D, Kulik TJ. Nitric oxide-generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*. 02/1995; 76(2): 305-309.
32. Toda N, Okamura T. Modulation of renal blood flow and vascular tone by neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Journal of vascular research*. 2011; 48(1): 1-10. doi: 10.1159/000317395
33. Ortiz PA, Garvin JL. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *American journal of physiology. Renal physiology*. 05/2002; 282(5): F777-784.
34. Kurtz A, Wagner C. Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *American journal of physiology. Renal physiology*. 12/1998; 256(6 Pt 2); F849-862.

35. Kim JS, Choi KC, Jeong MH, Kim SW, Oh YW, Lee JU. Increased expression of sodium transporters in rats chronically inhibited of nitric oxide synthesis. *Journal of Korean Medicine Science*. 02/2006; 21(1): 1-4.
36. Baylis C, Mitruka B, Deng A. A Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *The Journal of Clinical Investigation*. 06/1992; 90(1): 281-278. doi: 10.1172/JCI115849
37. Chan ED, Riches DW. IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *American journal of physiology. Cell physiology*. 05/2001; 280(3): C441-450.
38. Leask A, Abraham DJ. TGF- β signaling and the fibrotic response. *FASEB Journal*. 05/2004; 18(7): 816-827.
39. Meng XM, Tang PMK., Li J, Lan HY. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Frontiers in physiology*. 2015; 6: 82. doi: 10.3389/fphys.2015.00082
40. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney international*. 06/2006; 69(2): 213-217.
41. Liu RM, Pravia KG. Oxidative stress and glutathione in TGF- β -mediated fibrogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*. 01/2010; 48(1): 1-15. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.026
42. Klahr S, Morrissey JJ. The role of vasoactive compounds, growth factors and cytokines in the progression of renal disease. *Kidney international*. 2000; 57: 7-14.
43. Matsuki K, Hathaway CK, Chang AS, Smithies O, Kakoki M. Transforming growth factor beta1 and aldosterone. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 03/2015; 24(2): 139-144.
44. Petersen TE, Skorstengaard K, Vibe-Pedersen K. Primary structure of fibronectin. In: Mosher DF, Hrsg. *Fibronectin [E-Book]*. Elsevier; 2012: 1-24.

45. Kühn K. The Classical Collagenes: Types I, II and III. In: Mayne R, Burgeson RE, Hrsg. *Biology of Extracellular Matrix: A Series Structure and Function of Collagene Types* [E-Book]. Elsevier; 2012: 1-42. doi: 10.1016/B978-0-12-481280-2.50003-9
46. Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 12/1996; 7(12), 2495-2508.
47. Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, Border WA. Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor- β 1. *Kidney international*. 05/1992; 41(5): 1213-1221.
48. Hedman K, Vaheri K. Fibronectin and the pericellular Matrix. In: Mosher DF, Hrsg. *Fibronectin* [E-Book]. Elsevier; 2012: 123-139.
49. Van Vliet A, Baelde HJ, Vleming LJ, de Heer E, Bruijn JA. Distribution of fibronectin isoforms in human renal disease. *The Journal of Pathology*. 02/2001;193(2): 256-62.
50. Dixon AJ, Burns J, Dunnill MS, and McGee JO. Distribution of fibronectin in normal and diseased human kidneys. *The journal of clinic pathology*. 11/1980; 33(11): 1021-1028.
51. Kolb M, Margetts PJ, Sime PJ, Gauldie J. Proteoglycans decorin and biglycan differentially modulate TGF- β -mediated fibrotic responses in the lung. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 06/01/2001; 280(6), 1327-1334.
52. Schaefer L, Gröne HJ, Raslik I, Robenek H, Ugorcakova J, Budny S, Schaefer RM, Kresse H. Small proteoglycans of normal adult human kidney: distinct expression patterns of decorin, biglycan, fibromodulin, and lumican. *Kidney international*. 10/2000;58(4), 1557-1568.
53. Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi YU, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Natural inhibitor of transforming growth factor- β protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature*. 11/26/1992; 360(6402): 4-361.

54. Wells RG. Fibrogenesis. V. TGF- β signaling pathways. *American Journal of physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 11/2000; 279(5): 845-850.
55. Border WA, Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E. Transforming growth factor- β regulates production of proteoglycans by mesangial cells. *Kidney international*. 02/1990; 37(2): 689-695.
56. Chatziantoniou C, Dussaule JC. Insights into the mechanisms of renal fibrosis: is it possible to achieve regression?. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 07/08/2005; 289(2): 227-234.
57. Schönherr E, Witsch-Prehm P, Harrach B, Robenek H, Rauterberg J, Kresse H. Interaction of biglycan with type I collagen. *The Journal of Biological Chemistry*. 10/02/1995; 270(6): 2776-2783.
58. Weber IT, Harrison RW, Iozzo RV. Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 12/13/1996; 271(50): 31767-31770.
59. Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Developmental Dynamics*. 06/2011; 218(2), 213-234.
60. Deng A, Munger KA, Valdivielso JM, Satriano J, Lortie M, Blantz RC, Thomson SC. Increased Expression of Ornithine Decarboxylase in Distal Tubules of Early Diabetic Rat Kidneys Are Polyamines Paracrine Hypertrophic Factors?. *Diabetes*. 05/2003; 52(5): 1235-1239.
61. Pegg AE, McCann PP. Polyamine metabolism and function. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 11/1982; 243(5): 212-221.
62. Bachrach U. Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. *Current protein and peptide science*. 12/2005; 6(6): 559-566.
63. Banting JD. Assessment of the impact of acute and chronic nitric oxide synthase blockade on functional and structural components of the cardiovascular system [Dissertation]. Kingston: Queen's University; 1997.

64. Rahman A, Ahmed S, Vasenwala SM, Athar M. Glyceryl trinitrat, a nitric donor, abrogates ferric nitrilotriacetate-induced oxidative stress and renal damage. *Archives of biochemistry and biophysics*. 10/01/2003; 418(1): 9-71.
65. Schlüter KD. PTH and PTHrP: similar structures but different functions. *News in physiological sciences*. 12/1999; 14: 243-249.
66. Noda M, Takuwa Y, Katoh T, Kurokawa K. Mechanical force regulation of vascular parathyroid hormone-related peptide expression. *Kidney international. Supplement*. 06/1996; 55: 154-155.
67. Massfelder T, Endlich K, Judes C, Saussine C, Simeoni U, Nickols, GA, Steinhausen M, Helwig JJ. (1994). Actions of parathyroid hormone-related protein on the renal glomerulo-vascular bed. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 02/1994; 12(1): 199-206.
68. Schlüter KD, Piper HM. Cardiovascular actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Cardiovascular Research*. 1998; 37(1): 34-41.
69. Endlich K, Massfelder T, Helwig JJ, Steinhausen M. Vascular effects of parathyroid and parathyroid hormone-related protein in the split hydronephrotic rat kidney. *The journal of physiology*. 05/01/1995; 483(2): 481-490.
70. Wenzel S, Schorr K, Degenhardt H, Frischkopf K, Kojda G, Wiesner RJ, Rosenkranz S, Piper HM, Schlüter KD. TGF- β 1 downregulates PTHrP in coronary endothelial cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 06/2001; 33(6), 1181-1190.
71. Joshi S, Peck AB, Khan SR. NADPH oxidase as a therapeutic target for oxalate induced injury in kidneys. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013; 2013: 462361. doi: 10.1155/2013/462361
72. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. 01/2007; 87(1): 245-313.

73. Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus RE, Szöcs K, Sorescu GP, Vapalu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Griendling KK. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*. 03/26/2002; 105(12): 1429-1435. doi: 10.1161/01.CIR.0000012917.74432.66

74. Schnackenberg CG. Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 02/2002; 282(2): 335-342.

75. Zambrano S, Blanca AJ, Ruiz-Armenta MV, Miguell-Carrasco JL, Arévalo M, Mate A, Vázquez CM. L-carnitine attenuates the development of kidney fibrosis in hypertensive rats by upregulating PPAR- γ . *American Journal of Hypertension*. 01/11/2014; 27(3):460-470. doi: 10.1093/ajh/hpt268

76. Modlinger PS, Wilcox CS, Aslam S. Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. *Seminars in nephrology*. 07/2004; 24(4): 354-365.

77. Sung CC, Hsu YC, Chen CC, Lin YF, Wu CC. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013; 2013: 301982. doi: 10.1155/2013/301982

78. Da Costa Rebelo RM. Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Progredienz hochdruckvermittelter Herzinsuffizienz bei hypertensiven Ratten [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität; 2010.

79. Simms D, Cizdziel P, Chomczynski P. (1993). TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*. 12/1993; 15(4): 532-535.

80. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular aspects of medicine*. 04-07/2006; 27(2-3): 126-139.

81. D'Alessio JM, Noon MC, Ley HL, Gerard GF. One-tube double-stranded cDNA synthesis using cloned M-MLV reverse transcriptase. *Focus*. 1987; 9(1): 1-4.
82. Novex by life technologies. XCell SureLock ® Mini-Cell For leak-free electrophoresis of mini-gels Catalog Numbers EI0001, EI0020, EI0002 [Internet]. [zitiert am 20.05.2016]. URL: https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/surelock_man.pdf/
83. Invitrogene. XCell II™ Blot Module Catalog no. EI9051 [Internet]. 12/14/2009. [zitiert am 20.05.2016]. URL: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/blotmod_pro.pdf
84. Arbor Assays. Detection Kits, DetectX® Kits Urea Nitrogen (BUN) Colorimetric Detection Kit [Internet]. [zitiert am 20.05.2016]. URL: <http://www.arborassays.com/product/k024-h1-urea-nitrogen-bun-detection-kit/>
85. Zicha J, Dobesová Z, Kunes J. Antihypertensive mechanisms of chronic captopril or N-acetylcysteine treatment in L-NAME hypertensive rats. *Hypertension Research*. 12/2006; 29(12): 1021-1027. doi:10.1291/hypres.29.1021
86. Seth MK, Hussain ME, Pasha S, Fahim M. Effects of a novel ACE inhibitor, 3-(3-thienyl)-l-alanyl-ornithyl-proline, on endothelial vasodilation and hepatotoxicity in l-NAME-induced hypertensive rats. *Drug design, development and therapy*. 04/20/2016; 10:1533-1542. doi: 10.2147/DDDT.S77761
87. Bernátová I , Pechánová O Simko F. Captopril prevents NO-deficient hypertension and left ventricular hypertrophy without affecting nitric oxide synthase activity in rats. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 1996; 45(4): 311-316.
88. Stauffer LS, Westby CM, DeSouza CA. Endothelin-1, Aging and hypertension. *Current opinion cardiology*. 07/2008; 23(4):350-355. doi: 10.1097/HCO.0b013e328302f3c6
89. Chen SX, Song T, Zhou SH, Liu YH, Wu SJ, Liu LY. Protective effects of ACE inhibitors on vascular endothelial dysfunction induced by exogenous advanced

- oxidation protein products in rats. *European journal of pharmacology*. 04/28/2008; 584(2-3): 368-375. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.02.020.
90. Oluwatosin A Adaramoye, Ifeanyi O Nwosu, Ebenezer O Farombi. Sub-acute effect of N^G-nitro-L-arginine methyl-ester (L-NAME) on biochemical indices in rats: Protective effects of Kolaviron and extract of *Curcuma longa* L. *Pharmacognosy Research*. 2012; 4: 127-133.
 91. Hale TM, Robertson SJ, Burns KD, deBlois D. Short-term ACE inhibition confers long-term protection against target organ damage. *Hypertension Research*. 06/2012; 35(6): 604-610. doi: 10.1038/hr.2012.2
 92. Pearson PB. Wasser und Elektrolythaushalt. In: Schmidt RF, Lang F, Hrsg. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Heidelberg: Springer; 2007: 733.
 93. Pearson PB. Wasser und Elektrolythaushalt. In: Schmidt RF, Lang F, Hrsg. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Heidelberg: Springer; 2007: 736-737.
 94. Biesalski HK. Ernährung. In: Schmidt RF, Lang F, Hrsg. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Heidelberg: Springer; 2007: 854.
 95. Lang F, Kurtz A. Niere. In: Schmidt RF, Lang F, Hrsg. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Heidelberg: Springer; 2007: 683-718.
 96. Muldowney JA 3rd, Davis SN, Vaughan DE, Brown NJ. NO Synthase Inhibition Increases Aldosterone in Humans. *Hypertension*. 11/2004; 44(5): 739-745.
 97. Mojiminiyi FB, Anigbogu CN, Sofola OA, Adigun SA. Role of nitric oxide in salt and water excretion in experimental hypertension in hooded (Aguti) rats. *The Nigerian Postgraduate medical journal*. 06/2007; 14(2): 99-104
 98. Maulood IM, Mahmud AMR. Effects of COX-1 and COX-2 Inhibitors in L-Nitro-L-Arginine Methyl Ester Induced Hypertensive Rats. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 09/2013; 6(3): 199-204.

99. Komminroth P, Perren A, Klöppel G. Nebennieren. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H, Hrsg. Pathologie. München: Elsevier; 2008: 424.
100. Brown JM, Williams JS, Luther JM, Garg R, Garza AE, Pojoga LH, Ruan DT, Williams GH, Adler GK, Vaidya A. Human interventions to characterize novel relationships between the renin-angiotensin-aldosterone system and parathyroid hormone. *Hypertension*. 02/2014;63(2):273-280. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01910
101. Moch H, Komminroth P, Zimmermann DR, Odermatt B, Probst-Hensch N, Bopp M. Pathologie: Aufgaben und Methoden. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H, Hrsg. Pathologie. München: Elsevier; 2008: 52-55.
102. Bültmann BD, Mackensen-Haen S, Schmid KW, Kirkpatrick CJ. Kreislaufkrankungen. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H, Hrsg. Pathologie. München: Elsevier; 2008: 879-880
103. Nizze N, Kerjaschki D, Moch H. Niere. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H, Hrsg. Pathologie. München: Elsevier; 2008: 879-880.
104. Mojiminiyi FB, Anigbogu CN, Sofola OA, Adigun SA. Cardiac and Kidney Weight Indices following Dietary Salt Loading and/or Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition in the Hooded (Aguti) Rat. *The Nigerian Postgraduate medical journal*. 03/2009; 16(1): 1-7.
105. Rajeshwari T, Raja B, Manivannan J, Silambarasan T, Dhanalakshmi T. Valproic acid prevents the deregulation of lipid metabolism and renal renin-angiotensin system in L-NAME induced nitric oxide deficient hypertensive rats. *Environmental toxicology and pharmacology*. 05/2014; 37(3): 936-945. doi: 10.1016/j.etap.2014.02.008
106. Zhao YJ, Xu CQ, Zhang WH, Zhang L, Bian SL, Huang Q, Sun HL, Li QF, Zhang YQ, Tian Y, Wang R, Yang BF, Li WM. Role of polyamines in myocardial ischemia/reperfusion injury and their interactions with nitric oxide. *European journal of pharmacology*. 05/21/2007; 562(3): 236-246.

107. Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cellular and Molecular Life Science*. 02/2001; 58(2): 244-258
108. Banting JD, Thompson KE, Friberg P, Adams MA. Blunted cardiovascular growth induction during prolonged nitric oxide synthase blockade. *Hypertension*. 09/1997; 30(3): 416-421.
109. Genovese F, Nabresa AA, Leeming DJ. The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis?. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 05/28/2014; 7: 4. doi: 10.1186/1755-1536-7-4
110. Liu GX, Li YQ, Huang XR, Wei LH, Zhang Y, Feng M, Meng XM, Chen HY, Shi YJ, Lan HY. Smad7 inhibits AngII-mediated hypertensive nephropathy in a mouse model of hypertension. *Clinical science*. 08/2014; 127(3):195-208. doi: 10.1042/CS20130706
111. Meng XM, Tang PM, Li J, Lan HY. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Frontiers in physiology*. 03/19/2015; 6: 82. doi: 10.3389/fphys.2015.00082
112. Dellê H, Rocha JR, Cavaglieri RC, Vieira JM Jr, Malheiros DM, Noronha IL. Antifibrotic effect of tamoxifen in a model of progressive renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 01/2012; 23(1):37-48. doi: 10.1681/ASN.2011010046.
113. Simeoni U, Massfelder T, Saussine C, Judes C, Geisert J, Helwig JJ. Involvement of nitric oxide in the vasodilatory response to parathyroid hormone-related peptide in the isolated rabbit kidney. *Clinical science*. 03/1994; 86(3): 245-249.
114. Massfelder T, Stewart AF, Endlich K, Soifer N, Judes C, Helwig JJ. Parathyroid hormone-related protein detection and interaction with NO and cyclic AMP in the renovascular system. *Kidney international*. 11/1996; 50(5): 1591-603.
115. Gonzalez-Vicente A, Saikumar JH, Massey KJ, Hong NJ, Dominici FP, Carretero OA, Garvin JL. Angiotensin II stimulates superoxide production by

nitric oxide synthase in thick ascending limbs. *Physiologica reports*. 02/2016; 4(4). pii: e12697. doi: 10.14814/phy2.12697

116. Rincón J, Correia D, Arcaya JL, Finol E, Fernández A, Pérez M, Yaguas K, Talavera E, Chávez M, Summer R, F. Romero F. Role of Angiotensin II type 1 receptor on renal NAD(P)H oxidase, oxidative stress and inflammation in nitric oxide inhibition induced-hypertension. *Life Sci*. 03/2015; 124: 81-90. doi: 10.1016/j.lfs.2015.01.005
117. Moningka NC, Tsarova T, Sasser JM, Baylis C. Protective actions of nebivolol on chronic nitric oxide synthase inhibition-induced hypertension and chronic kidney disease in the rat: a comparison with angiotensin II receptor blockade. *Nephrology, dialysis, transplantation*. 03/2012; 27(3): 913-20. doi: 10.1093/ndt/gfr449
118. Toba H, Nakagawa Y, Miki S, Shimizu T, Yoshimura A, Inoue R, Asayama J, Kobara M, Nakata T. Calcium channel blockades exhibit anti-inflammatory and antioxidative effects by augmentation of endothelial nitric oxide synthase and the inhibition of angiotensin converting enzyme in the N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertensive rat aorta: vasoprotective effects beyond the blood pressure-lowering effects of amlodipine and manidipine. *Hypertension research*. 08/2005; 28(8): 689-700.
119. Kashiwagi M, Shinozaki M, Hirakata H, Tamaki K, Hirano T, Tokumoto M, Goto H, Okuda S, Fujishima M. Locally activated renin-angiotensin system associated with TGF-beta1 as a major factor for renal injury induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Journal of the American Society of Nephrology*. 04/2000; 11(4): 616-624.
120. Oktem F, Kirbas A, Armagan A, Kuybulu AE, Yilmaz HR, Ozguner F, Uz E. Lisinopril attenuates renal oxidative injury in L-NAME-induced hypertensive rats. *Molecular and cellular biochemistry*. 06/2011; 352(1-2): 247-53. doi: 10.1007/s11010-011-0760-2
121. Abd El Motteleb DM, Elshazly SM. Renoprotective effect of sitagliptin against hypertensive nephropathy induced by chronic administration of L-NAME in

rats: role of GLP-1 and GLP-1 receptor. *European journal of pharmacology*.
11/15/2013; 720(1-3): 158-65. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.10.033

122. Fleenor BS, Seals DR, Zigler ML, Sindler AL. Superoxide-lowering therapy with TEMPOL reverses arterial dysfunction with aging in mice. *Aging Cell*. 04/2012; 11(2): 269-276. doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00783.x

10. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

11. Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter für die Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung während der Arbeit bedanken. Er war immer sehr freundlich und hilfsbereit.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Dr. Rolf Schreckenber, Peter Volk und Nadine Woltasky für die Einarbeitung in die Geräte und die Unterstützung bei den Laborarbeiten bedanken sowie bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schlüter für die angenehme Atmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit.

Danke an meine Verlobte Carolin Grimm, die die Arbeit unermüdlich Korrektur gelesen und mir mentale Unterstützung gegeben hat sowie an Frau Prof. A. Fisseler-Eckhoff und Dr. M. Demes für die Korrektur der englischen Zusammenfassung.

Ich danke meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, ohne die das Studium nicht möglich gewesen wäre, als Voraussetzung um diese Arbeit zu erstellen, meinem Sohn Julius Alexander und meiner Schwester.