

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin IV
(Schwerpunkt: Diabetologie, Endokrinologie und Nephrologie)
Sektion Nieren- und Hochdruckerkrankungen

**Die Rolle der Urokinase beim experimentellen
nephrotischen Syndrom der Maus**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Daiminger, Sophie Elisabeth

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Artunc
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Kimmel

Tag der Disputation: 24.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Ich wollte nicht nur Namen von Dingen wissen. Ich erinnere mich, dass ich wirklich wissen wollte, wie alles funktioniert hat.

Elizabeth Blackburn

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	12
1.1	Das nephrotische Syndrom.....	12
1.1.1	Ätiologie des nephrotischen Syndroms.....	12
1.2	Der epitheliale Natriumkanal ENaC.....	14
1.2.1	Physiologische Regulation.....	15
1.2.1.1	Proteolytische Aktivierung des ENaCs.....	15
1.2.2	Pharmakologische Hemmstoffe des ENaC.....	16
1.2.2.1	Amilorid.....	16
1.2.2.2	Weitere Hemmstoffe des ENaCs.....	17
1.3	Pathophysiologie der Ödementstehung – Overfill- und Underfill-Theorie.....	18
1.3.1	Bedeutung der Proteasurie.....	20
1.3.1.1	Plasminaktivierung durch Urokinase.....	21
1.3.2	Therapie des nephrotischen Syndrom.....	22
1.4	Fragestellung der Dissertation.....	23
2	<i>Material und Methoden</i>	24
2.1	Material.....	24
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Versuchstiere und Tierhaltung.....	27
2.2.2	Versuchsablauf und Probengewinnung.....	28
2.2.2.1	Teilversuch 1: Untersuchung des nephrotischen Syndroms im experimentellen Mausmodell.....	29
2.2.2.2	Teilversuch 2: Hemmung der Urokinase durch Amilorid.....	29
2.2.2.3	Teilversuch 3: Auswirkung einer genetischen Deletion der Urokinase.....	30
2.2.2.4	Teilversuch 4: Auswirkung der genetischen Deletion der Urokinase auf die Amiloridbehandlung.....	31

Inhaltsverzeichnis

2.2.3	Blut- und Urinparameter	31
2.2.3.1	Messung der Proteinurie mittels Bradford (Bio-Rad Protein Assay).....	32
2.2.3.2	Elektrolytmessung am Flammenphotometer	33
2.2.3.3	Kreatininmessung im Urin mit der modifizierten Methode nach Jaffé (LT-SYS® Creatinin, kinetisch)	34
2.2.3.4	Harnstoffkonzentration im Plasma (LT-SYS® Harnstoff, UV, kinetisch) 35	
2.2.3.5	Blutgasanalyse.....	36
2.2.3.6	Messung der Plasmin- und Urokinaseaktivität im Urin mittels chromogenen Substraten	37
2.2.3.7	Messung der Urokinaseaktivität im Urin mittels 1344.....	37
2.2.3.8	Messung der Plasminaktivität im Urin mittels S-2251	38
2.2.3.9	Westernblot.....	39
2.2.3.10	Bestimmung der Amiloridkonzentration im Urin und Plasma mittels Fluoreszenz.....	40
2.2.3.11	Aldosteron ELISA.....	41
2.2.4	Statistische Auswertung	43
3	<i>Ergebnisse</i>	44
3.1	Teilversuch 1: Nephrotisches Syndrom im Mausmodell.....	44
3.1.1	Proteinurie und Plasma-Albumin-Konzentration	44
3.1.2	Gewicht.....	45
3.1.3	Natriurese	46
3.1.4	Plasma-Aldosteron- und -Harnstoff-Konzentration	47
3.1.5	Urokinase- und Plasminaktivität im Urin	48
3.1.6	Blutgasanalyse	49
3.1.7	Lipidämie	50

Inhaltsverzeichnis

3.1.8	Zusammenfassung	50
3.2	Teilversuch 2: Amiloridbehandlung	51
3.2.1	Inhibition der Urokinaseaktivität <i>in vitro</i>	51
3.2.2	Urinamilorid-Konzentration <i>in vivo</i>	52
3.2.3	Proteinurie und Plasma-Albumin-Konzentration	53
3.2.4	Gewicht.....	54
3.2.5	Natriurese	55
3.2.6	Plasma-Aldosteron und -Harnstoff-Konzentration.....	57
3.2.7	Urokinase- und Plasminaktivität im Urin	58
3.2.8	Westernblot zur Untersuchung der Plasminogenkonversion	59
3.2.9	Blutgasanalyse	61
3.2.10	Zusammenfassung.....	62
3.3	Teilversuch 3: Auswirkung einer genetischen Deletion der Urokinase bei Mäusen	63
3.3.1	Proteinurie und Plasma-Albumin-Konzentration	63
3.3.2	Gewicht.....	64
3.3.3	Natriurese	65
3.3.4	Plasma-Aldosteron und -Harnstoff-Konzentration.....	66
3.3.5	Urokinase- und Plasminaktivität im Urin	67
3.3.6	Westernblot zur Untersuchung der Plasminogenkonversion bei genetischer uPA-Defizienz.....	68
3.3.7	Blutgasanalyse	69
3.3.8	Langzeitüberleben	70
3.3.9	Zusammenfassung	71
3.4	Teilversuch 4: Amiloridbehandlung der uPA-Knockout Mäuse.....	72
3.4.1	Urinamilorid-Konzentration	72

Inhaltsverzeichnis

3.4.2	Proteinurie	73
3.4.3	Gewicht.....	74
3.4.4	Plasma-Aldosteron-Konzentration	75
3.4.5	Zusammenfassung	76
4	<i>Diskussion</i>	77
4.1	Mausmodell.....	77
4.2	Experimentelles nephrotisches Syndrom im Mausmodell	78
4.3	Theorie der Ödementstehung im experimentellen nephrotischen Syndrom der Maus.....	79
4.4	Natriumtransport beim nephrotischen Syndrom	81
4.5	ENaC-Aktivierung und Rolle des RAAS	82
4.6	Plasminaktivierung durch Urokinase	84
4.7	Wirkweise Amilorid.....	86
4.8	Therapie des nephrotischen Syndroms mit Amilorid	86
4.9	Ausblick.....	88
5	<i>Zusammenfassung</i>	89
6	<i>Anhang</i>	90
7	<i>Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift</i>	97
8	<i>Veröffentlichungen</i>	98
9	<i>Danksagung</i>	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des ENaC [1].....	14
Abbildung 2: Aminosäuresequenz der γ -Untereinheit des humanen ENaCs ...	16
Abbildung 3: Strukturformel Amilorid [28]	16
Abbildung 4: Pathomechanismus Ödementstehung.....	19
Abbildung 5: Aktivierung des ENaCs durch Plasmin [51]	21
Abbildung 6: Versuchsablauf des Teilversuchs 1	29
Abbildung 7: Studiendesign des Teilversuchs 2	29
Abbildung 8 : Studiendesign des Teilversuchs 3	30
Abbildung 9: Studiendesign des Teilversuchs 4	31
Abbildung 10: Funktionsweise chromogene Substrate.....	37
Abbildung 11: Experimentelles nephrotisches Syndrom – Proteinurie und Plasma Albumin	44
Abbildung 12: Experimentelles nephrotisches Syndrom – Gewichtsverlauf	45
Abbildung 13 : Experimentelles nephrotisches Syndrom – Aszites	45
Abbildung 14: Experimentelles nephrotisches Syndrom – Natriuresis	46
Abbildung 15 : Experimentelles nephrotisches Syndrom – Plasma Aldosteron und Plasma Harnstoff.....	47
Abbildung 16 : Experimentelles nephrotisches Syndrom – Urokinase - & Plasminaktivität im Urin	48
Abbildung 17 : Experimentelles nephrotisches Syndrom – Lipidämie	50
Abbildung 18 : In-vitro Inhibitionskurven.....	51
Abbildung 19 : Amiloridbehandlung – Urinamilorid [2].....	52
Abbildung 20: Amiloridbehandlung – Proteinurie und Plasma Albumin [2].....	53
Abbildung 21: Amiloridbehandlung – Gewichtsverlauf [2]	54
Abbildung 22 : Amiloridbehandlung – Natriuresis [2]	55
Abbildung 23 : Amiloridbehandlung – Plasma Aldosteron und Plasma Harnstoff [2]	57
Abbildung 24: Amiloridbehandlung – Urokinase- und Plasminaktivität [2].....	58
Abbildung 25 : Amiloridbehandlung – Plasmin Westernblot [2]	59
Abbildung 26 : uPA – Knockout – Proteinurie und Plasma Albumin [2].....	63
Abbildung 27 : uPA-Knockout – Gewicht [2].....	64
Abbildung 28 : uPA-Knockout – Natriuresis [2]	65

Tabellenverzeichnis

Abbildung 29 : uPA-Knockout – Plasma Aldosteron [2].....	66
Abbildung 30 : uPA-Knockout - Urokinase- und Plasminaktivität [2]	67
Abbildung 31 : uPA-Knockout - Plasmin Westernblot [2].....	68
Abbildung 32 : uPA-Knockout – Langzeitüberleben und Verlauf Harnstoff	70
Abbildung 33: Scoring system zur Beurteilung des Allgemeinzustandes der Maus während des Experimentes Bei > 8 Punkten sofortige Euthanasie	90
Table 1 : Abkürzungsverzeichnis.....	10
Table 2 : Material - Geräte.....	24
Table 3 : Material - Verbrauchsmaterialien	25
Table 4 : Material - Medikamente	26
Table 5 : Material - Tierhaltung.....	26
Table 6 : Material - Kit/ Reagenz	26
Table 7 : Experimentelles nephrotisches Syndrom – BGA.....	49
Table 8 : Amiloridbehandlung BGA [2]	61
Table 9 : uPA-ko – BGA [2]	69

Abkürzungsverzeichnis

Table 1 : Abkürzungsverzeichnis

μ-	Mikro- (10^{-6})
...<...	...kleiner als...
...>...	...größer als...
♀	Weibchen
♂	Männchen
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
BE	Base excess
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
c [...]	Konzentration [von...]
ca.	circa
cHbc	calculated hemoglobin concentration
CMV	Cytomegalie-Virus
d	Tag
Da	Dalton
DF	Verdünnungsfaktor
DNA	Desoxyribonucleinacid
EBV	Epstein-Barr-Virus
ENaC	epithelialer Natriumkanal
FSGN	fokal-segmental sklerosierende Glomerulonephritis
g	Gramm
h	Stunden
Hct/ Hkt	Hämatokrit
HCV	Hepatitis C Virus
het	Heterozygot
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
i.v.	intravenös
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
k-	Kilo-
KG	Körpergewicht
ko	Knock-out
Krea	Kreatinin
l	Liter
M	Molar (mol/l)
m-	Milli- (10^{-3})
-m	Meter
max.	maximal
MCGN	minimal-change-Glomerulonephritis
min	Minute
min.	minimal

Abkürzungsverzeichnis

MPGN	membranoproliferative Glomerulonephritis
n-	Nano- (10^{-9})
n.d.	nicht detektierbar
NSAR	nichtsteroidalen Antirheumatika
OD	Optical density
p-	Piko- (10^{-12})
PAN	puromycin aminonucleosid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron- System
s	Sekunde
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese)
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler)
SO ₂ C	kalkulierte Sauerstoffsättigung
std	Standard
Tab.	Tabelle
uPA	Urokinase
v.a.	vor allem
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
λ	Wellenlänge

1 Einleitung

1.1 Das nephrotische Syndrom

Das nephrotische Syndrom ist ein Symptomkomplex, der aus einer Proteinurie > 3,5 g/d, einer konsekutiven Hypoproteinämie, einer Hyperlipidämie und Ödemen besteht [4]. Klinisch zeigt sich häufig das Bild von Pleuraergüssen und Aszites, in seltenen Fällen auch ein Perikarderguss. Durch die Hypoproteinämie kommt es zu einer gesteigerten hepatischen Eiweißsynthese, welche zu einer Steigerung von α_2 - und β -Globulinen, mit gleichzeitiger Erniedrigung von Albumin, α_1 - und γ -Globulinen führt. Durch Verlust von gerinnungshemmenden Proteinen wie AT III, oder intravasaler Hypovolämie besteht ein erhöhtes Thromboserisiko [5]. Darüber hinaus besteht ein erhöhtes Infektrisiko durch Verlust von γ -Globulinen sowie eine veränderte Konzentration von Trägerproteinen wie Transferrin oder Vitamin D-bindendes Protein [6-8].

1.1.1 Ätiologie des nephrotischen Syndroms

Das nephrotische Syndrom kann bei einer Vielzahl von glomerulären Erkrankungen auftreten. Am häufigsten wird eine Minimal-Change-Glomerulopathie (MCGP), eine fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS), eine membranöse Glomerulonephritis oder eine membranproliferative Glomerulonephritis (MPGN) diagnostiziert [6].

Die MCGP ist die häufigste Ursache für ein nephrotisches Syndrom im Kindesalter. Bei Erwachsenen ist sie in 10% der Fälle die zu Grunde liegende Erkrankung. Sie tritt idiopathisch oder sekundär als Folge von hämatologischen Neoplasien oder medikamententoxisch, beispielsweise nach Einnahme von VEGF-blockierenden Medikamenten, NSAR oder Lithium auf [4, 6].

Bei der MCGP kommt es zur Verschmelzung der Podozyten (Podozytopathie), die bei der FSGS mit einem Podozytenverlust einhergeht. Die FSGS ist in 12 % der Fälle die Ursache für ein nephrotisches Syndrom. Die FSGS lässt sich in eine

Einleitung

primäre idiopathische, eine familiär genetische und eine sekundäre Form unterteilen. Die genetische FSGS entsteht durch verschiedene rezessiv oder dominant vererbte Mutationen von Genen, die für podozytäre Proteine, wie Nephrin oder Podocin kodieren. Die sekundäre Form kann durch einen Nephronverlust, wie bei einer Ischämie aufgrund einer diabetischen Nephropathie oder bei Adipositas bedingt sein. Weiterhin tritt sie auch virusassoziiert, wie beispielsweise bei Infektion mit HIV, Parvovirus B19, CMV, EBV, HCV oder auch medikamenteninduziert nach Einnahme von Lithium, NSAR, Interferon oder Anabolika auf [9].

Mit 30% ist die membranöse Glomerulonephritis die häufigste beim Erwachsenen vorkommende Form. Auch bei dieser Glomerulonephritis gibt es eine idiopathische und eine sekundäre Form. Bei der idiopathischen Form liegen Autoantikörper gegen podozytäre Antigene, wie den Phospholipase A1-Rezeptor (PLA2R) vor. Sekundär kann eine membranöse Glomerulonephritis nach Infektionserkrankungen wie Hepatitis B/ C, HIV oder Syphilis, medikamentös, bei Autoimmunerkrankungen oder bei Malignomen auftreten. Im histologischen Präparat zeigt sich eine subepitheliale Ablagerung von Autoantikörpern und Komplementfaktoren an den Podozyten an der Außenseite der glomerulären Basalmembran. Dadurch kommt es zu einer Verdickung der Basalmembran, die im Stadium IV zu einer kompletten Umschichtung der Immunkomplexe mit Basalmembranmaterial führt. Spontane Remission tritt in 30 % aller Fälle auf [4, 6].

Die MPGN kommt sehr selten vor und ist entweder idiopathisch bedingt oder entsteht sekundär bei malignen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder Infektionserkrankungen wie Hepatitis B/ C. Histologisch kommt es hierbei zu diffusen Verdickungen der glomerulären Kapillarschlingen durch subendotheliale Ablagerungen und Proliferation der Mesangiumzellen. Die idiopathische Form resultiert innerhalb von 10 Jahren in 50 % der Fälle in einer Dialysepflichtigkeit [1, 2].

Weitere sekundäre Ursachen sind eine postinfektiöse Glomerulonephritis, beispielsweise nach einer Endokarditis, medikamenteninduzierte Glomerulonephritiden, paraneoplastische Geschehen oder auch autoimmune

Systemerkrankungen wie systemischer Lupus erythematoses oder eine Leichtketten-Nephropathie [6].

1.2 Der epitheliale Natriumkanal ENaC

Der epitheliale Natriumkanal ENaC befindet sich im distalen Tubulus der Niere, ist aber auch in Darm, Lunge, Schweiß- und Speicheldrüsen zu finden [10]. Er ist ein konstitutiv aktiver Kanal und transportiert Natrium gemäß eines elektrochemischen Gradienten in die Zelle [10]. In der Niere spielt er eine bedeutende Rolle für den Elektrolyt- und Wasserhaushalt des Körpers [4].

Der ENaC befindet sich an der tubulären Seite der distal tubulären Zellen im Sammelrohr. Den transepithelialen Transport der Natrium-Ionen bewerkstelligt er gemeinsam mit der Na^+/K^+ -ATPase, welche sich auf der basolateralen Seite der Zelle befindet und den elektrochemischen Gradienten aufbaut [11].

Unter physiologischen Bedingungen findet zwar nur etwa 5 % der Natriumresorption über den ENaC statt, seine Bedeutung erlangt er jedoch dadurch, dass er den finalen Natriumgehalt des Urins bestimmt. Durch verschiedene Mechanismen kann die Natriumretention gesteigert werden, um einer Dehydratation oder einem Salzverlust entgegen zu wirken [12, 13].

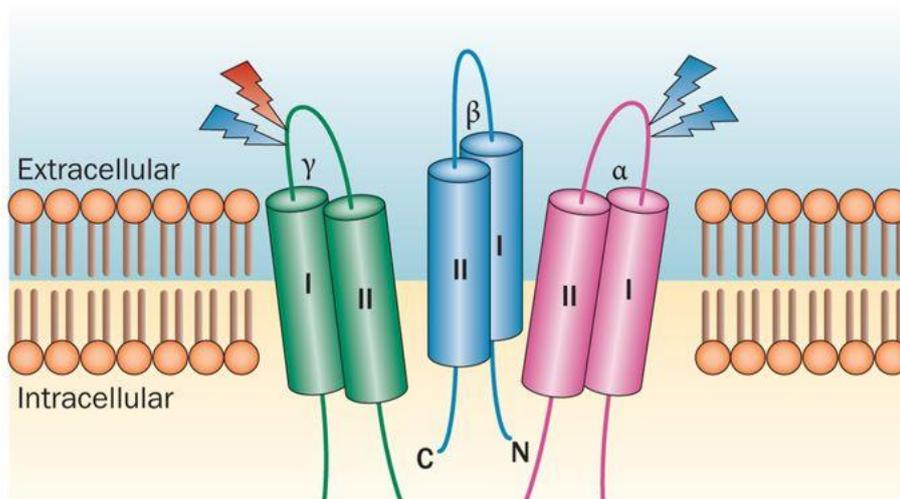


Abbildung 1: Aufbau des ENaC [1]

Der ENaC besteht aus drei Untereinheiten mit jeweils zwei Transmembrandomänen. Das N- und C-Ende liegt jeweils intrazellulär, während die Schnittstellen zur Aktivierung, dargestellt durch den roten, beziehungsweise die blauen Pfeile, extrazellulär liegen [1].

Einleitung

Der Kanal setzt sich aus drei Untereinheiten, der α -, β - und γ -Untereinheit, zusammen [1, 14]. Jede Untereinheit besteht jeweils aus zwei Transmembranproteinen. Das carboxy- und aminoternale Ende der Proteine liegen intrazellulär und sind mit einer großen Extrazellularregion, die in das Tubuluslumen ragt, verbunden. Diese Extrazellularregion ist Ansatzstelle für diverse Proteasen. Dort kann die Offenwahrscheinlichkeit des ENaCs über Spaltung an definierten Schnittstellen reguliert werden [10, 15].

1.2.1 Physiologische Regulation

Der ENaC kann über mehrere Wege aktiviert werden und so zu einem verstärkten Natriumtransport führen. Die Regulierung des ENaCs findet auf verschiedenen Ebenen statt. Zu diesen gehört die Regulation der Synthese der Kanalproteine über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, der Transport der Proteine des Kanals zur luminalen Zellmembran der Tubuluszelle, die proteolytische Spaltung der Extrazellularregion des Kanals zur Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit und es gibt Hinweise für eine direkte Steuerung des ENaCs durch Phosphorylierung [16].

1.2.1.1 Proteolytische Aktivierung des ENaCs

Ein besonderer Regulationsmechanismus des ENaC ist die proteolytische Spaltung der α - und γ -Untereinheiten des Kanals [11, 17]. Hierdurch kann die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals beeinflusst werden, das sogenannte Gating. Die Serinprotease Furin schneidet intrazellulär während der Maturation sowohl zweimal an der α -Untereinheit an den Stellen Arg-205 und Arg-231 [18, 19], als auch einmal in der Extrazellulärschleife der γ -Untereinheit an der Stelle Arg-138 [18]. Die Offenwahrscheinlichkeit des ENaCs steigert sich dadurch von einer geringen zu einer mittleren Offenwahrscheinlichkeit.

Im Falle einer weiteren extrazellulären, proteolytischen Spaltung an der γ -Untereinheit und somit einem Herausschneiden eines weiteren Peptidfragmentes resultiert eine hohe ENaC-Aktivität. Hierzu sind verschiedene Proteasen in der

Einleitung

Lage, unter anderem Proctasin [20, 21], Transmembran Protease Serin 4 [21], Matriptase [21], Cathepsin B [22], Elastase [23], Kallikrein [24] und Plasmin [25].

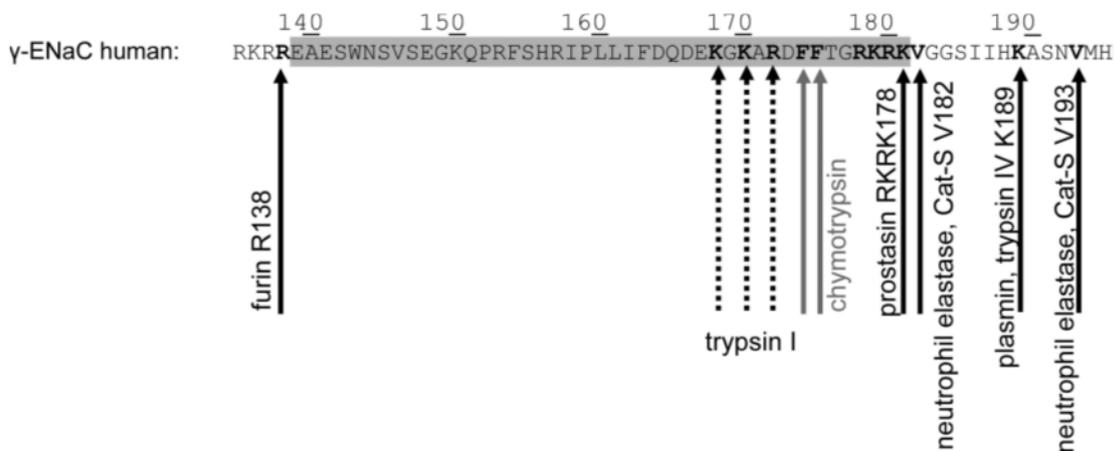


Abbildung 2: Aminosäuresequenz der gamma-Untereinheit des humanen ENaCs

Aminosäuresequenz der gamma-Untereinheit des humanen ENaCs der UniProt Database (UniProt Nummer P51170). Gezeigt sind die verschiedenen Spaltungsorte von Furin (Arg-138), Trypsin I (Lys-168, Lys-170 und Arg-172), Chymotrypsin (FF¹⁷⁴), Proctasin (RKRK¹⁷⁸), humane neutrophile Elastase (Val-182 und Val-193) und Plasmin (Lys-189). Pfeile deuten auf die jeweilige Schnittstelle[3].

Besonders unter Nidrigsalzdiät, bei einer Aldosteroninfusion oder bei einer Hyperkaliämie zeigt sich eine erhöhte Abspaltung des Peptidfragmentes der gamma-Untereinheit und damit eine hohe Offenwahrscheinlichkeit [26, 27].

1.2.2 Pharmakologische Hemmstoffe des ENaC

1.2.2.1 Amilorid

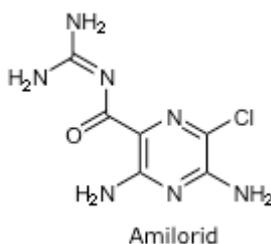


Abbildung 3: Strukturformel Amilorid [28]

Amilorid Hydrochlorid: N-amidino-3-amino-6-chloropyrazinecarboxamid [29]

Amilorid ist ein kaliumsparendes Diuretikum. Es wird glomerulär frei filtriert und hat dort ein duales Hemmprofil. Amilorid wirkt über eine direkte Blockade des ENaCs im distalen Teil des Nephrons und hemmt sowohl die Aufnahme von Natrium, als auch die Kaliumausscheidung [10, 30]. Bei der Amiloridblockade

des ENaCs geht man von einem einfachen, physikalischen Verschluss der Pore durch das Amiloridmolekül mit einem K_i -Wert von $0,1 \mu\text{M}$ aus [10, 32, 33]. Weiterhin hemmt Amilorid die Urokinase im Tubulussystem mit einem K_i -Wert von $7 \mu\text{M}$ [2, 34, 35].

Klinisch wird es als Kombinationspräparat mit Hydrochlorothiazid bei Hypertonie, Herzinsuffizienz und Leberzirrhose mit Aszites eingesetzt und wird bei oraler Gabe zu etwa 50 % im Gastrointestinaltrakt resorbiert. Die maximale Serumkonzentration ist nach vier Stunden erreicht. Die maximale Wirkung wird acht Stunden nach Gabe gemessen [36]. Amilorid wird zu gleichen Teilen renal und hepatisch eliminiert, daher ist bei Niereninsuffizienz mit deutlich längeren Plasmahalbwertszeiten zu rechnen. Eine wichtige Nebenwirkung ist die Gefahr der Hyperkaliämie. Die Überwachung des Kaliumspiegels ist besonders bei eingeschränkter Nierenfunktion engmaschig empfohlen [29, 36].

1.2.2.2 Weitere Hemmstoffe des ENaCs

Neben Amilorid gibt es weitere Amiloridanaloga, die ebenfalls über eine direkte ENaC-Blockade wirken. Triamteren hat dieselbe Bindungsstelle wie Amilorid, ist aber unter einem pH von 7,5 100-fach weniger potent [37]. Benzamil ist ebenfalls ein ENaC-Blocker. Es trägt im Vergleich zu Amilorid eine weitere Benzylgruppe. Dadurch ist die Potenz im Vergleich zu Amilorid auf das Fünf- bis Siebenfache erhöht [38].

Weiterhin kann man über Mineralokortikoidrezeptorantagonisten wie Spironolacton, Eplerenon, oder Kaliumcanrenoat Einfluss auf die ENaC-Membranexpression nehmen. Diese Medikamente wirken über die Blutseite als kompetitive Antagonisten am Mineralokortikoidrezeptor im Sammelrohr der Niere und gehören ebenfalls zu den kaliumsparenden Diuretika. Nach Einnahme kommt es zu einer geringeren Aldosteronwirkung und zu einem verringerten ENaC-Einbau in die luminale Membran. Sie unterscheiden sich lediglich pharmakokinetisch und durch ein unterschiedliches toxikologisches Profil [39]. Indiziert sind Aldosteronantagonisten bei arterieller Hypertonie, bei Hyperaldosteronismus und bei Ödemen im Rahmen einer Herzinsuffizienz oder

einer Leberzirrhose [30]. Grundsätzlich zu beachten ist die Gefahr der Hyperkaliämie, besonders bei einer bestehenden Niereninsuffizienz [39].

1.3 Pathophysiologie der Ödementstehung – Overfill- und Underfill-Theorie

Das nephrotische Syndrom ist charakterisiert durch generalisierte Ödeme [40]. Für den Pathomechanismus der Ödementstehung gibt es zwei Erklärungsansätze, die Overfill- und die Underfilltheorie [41]. Beiden Theorien liegt die Proteinurie als zentrales Symptom zugrunde.

Die Underfilltheorie besagt, dass es durch die Proteinurie zu einer Hypalbuminämie kommt und der verringerte intravasale, onkotische Druck zu einer Umverteilung des Wassers in das Interstitium führt [42]. Die Hypovolämie führt nun über eine Renin-Angiotensin-Aldosteron-System-Aktivierung zu einer vermehrten Natrium- und Wasserretention der Niere. Die Ödeme sind somit die physiologische Konsequenz des „underfillings“ [41].

Bei der Overfill-Theorie kommt es weniger auf die Quantität der Proteinurie, als auf die Qualität an. Arbeiten der letzten Jahre haben als Mechanismus die aberrante Filtration von Serinproteasen ausgemacht, die den epithelialen Natriumkanal ENaC aktivieren [42-44]. Dabei kommt es zu einer vermehrten Natrium- und Wasserretention durch die erkrankte Niere und somit zu einem „overfill“ der Gefäße. Die pathologische Ausscheidung aktiver und aktivierbarer Proteasen im Urin wird im Weiteren Proteasurie genannt [43].

Die folgende Abbildung liefert einen integrativen Ansatz, um die Ödementstehung nach Underfill- und Overfilltheorie zu erklären. Während des nephrotischen Syndroms kommt es aufgrund der bestehenden Proteinurie bzw. Proteasurie einerseits zu einer direkten ENaC-Aktivierung durch aktive Serinproteasen, andererseits zu einer RAAS-Aktivierung, die ebenfalls zu einer ENaC-Aktivierung führt. Durch die Kanalaktivierung wird vermehrt Natrium rückresorbiert und durch das osmotisch folgende Wasser zeigt sich eine generalisierte Ödementstehung.

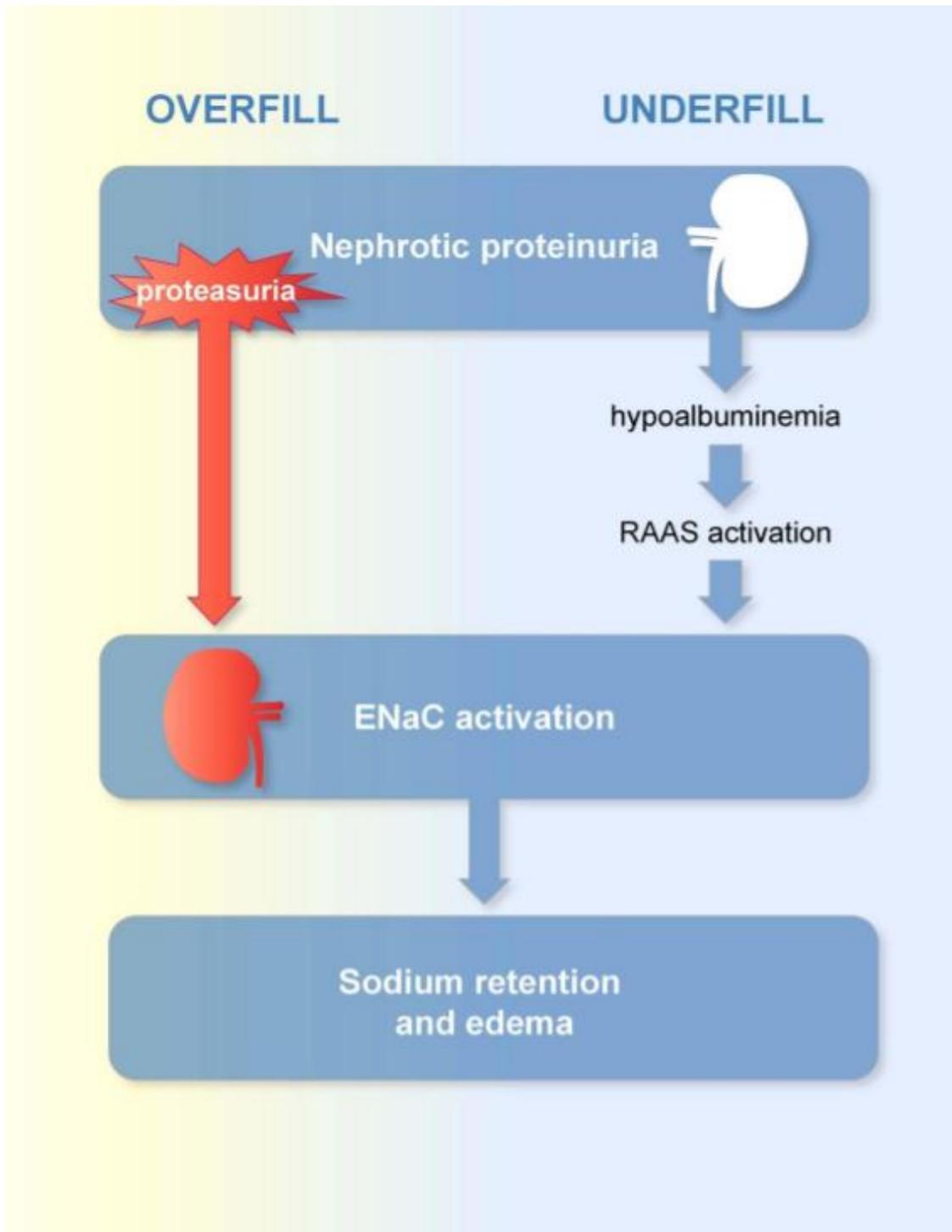


Abbildung 4: Pathomechanismus Ödementstehung

Bei der Overfill-Theorie kommt es durch eine Proteasurie zu einer direkten ENaC-Aktivierung. Als Folge steigt die Natriumretention und es entstehen Ödeme. Die Underfill-Theorie nimmt an, dass es durch eine Proteinurie zu einer Hypalbuminämie kommt. Das RAAS wird aktiviert und sorgt so für eine indirekte ENaC-Aktivierung. Hierdurch kommt es ebenfalls zu einer vermehrten Natriumretention und zu Ödembildung. [43] Abbildung entnommen aus [43].

1.3.1 Bedeutung der Proteasurie

Serinproteasen machen bis zu 80% der totalen Proteaseaktivität im nephrotischen Urin aus [44]. Weitere Proteaseklassen sind Aspartat, Cystein und Metalloproteasen [44].

Serinproteasen liegen in löslicher Form im Plasma vor und sind unter anderem dem körpereigenen Koagulations- und Komplementsystem zugehörig [45]. Erst bei einer Glomerulusschädigung können großmolekulare Proteine, zum Beispiel einige Serinproteasen wie Kallikrein, Plasmin, Thrombin oder andere Proteasen [12, 37, 46] aberrant in den Urin filtriert werden. Anzunehmen ist, dass Podozyten der kritischste Punkt der Filtrationsbarriere sind [47]. Die Ausscheidung von Serinproteasen, wie beispielsweise Plasmin, korreliert mit der Albuminurie [44, 48]. Bei 44% und 30% der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz war im Urin aktives Plasmin und Plasmakallikrein zu finden [45]. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch bei der Untersuchung nephrotischer Mäuse [46]. Es ist davon auszugehen, dass sich bei jeder höhergradigen Proteinurie auch eine signifikante Proteasurie zeigt [44].

Glomerulonephritiden mit progressiven Tubulusschäden und interstitieller Fibrose sind oft assoziiert mit einer ansteigenden Proteinurie [49]. Klinisch zeigt sich, dass eine vermehrte Proteinurie mit einem schnelleren Abfall der Nierenfunktion und einem vermehrten tubulointerstitiellen Schaden einhergeht [48]. Dies bestärkt die Vermutung, dass die Filtration potentiell tubulotoxischer Plasmaproteine ein Grund der Nierenschädigung sind und nicht nur als Symptom angesehen werden sollten [48]. Von mehreren Proteasen ist bereits bekannt, dass sie die γ -Untereinheit des ENaCs durch eine proteolytische Spaltung aktivieren können [47, 50]. Dieser Mechanismus spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals und der Ödementstehung. Durch den Proteaseinhibitor Aprotinin kann im Mausmodell eine suffiziente Hemmung der Ödementstehung erzielt werden [42]. Diese Blockierung einer proteolytischen Aktivierung des ENaC-Kanals stellt einen möglichen Therapieansatz zur Verhinderung der Ödementstehung dar.

1.3.1.1 Plasminaktivierung durch Urokinase

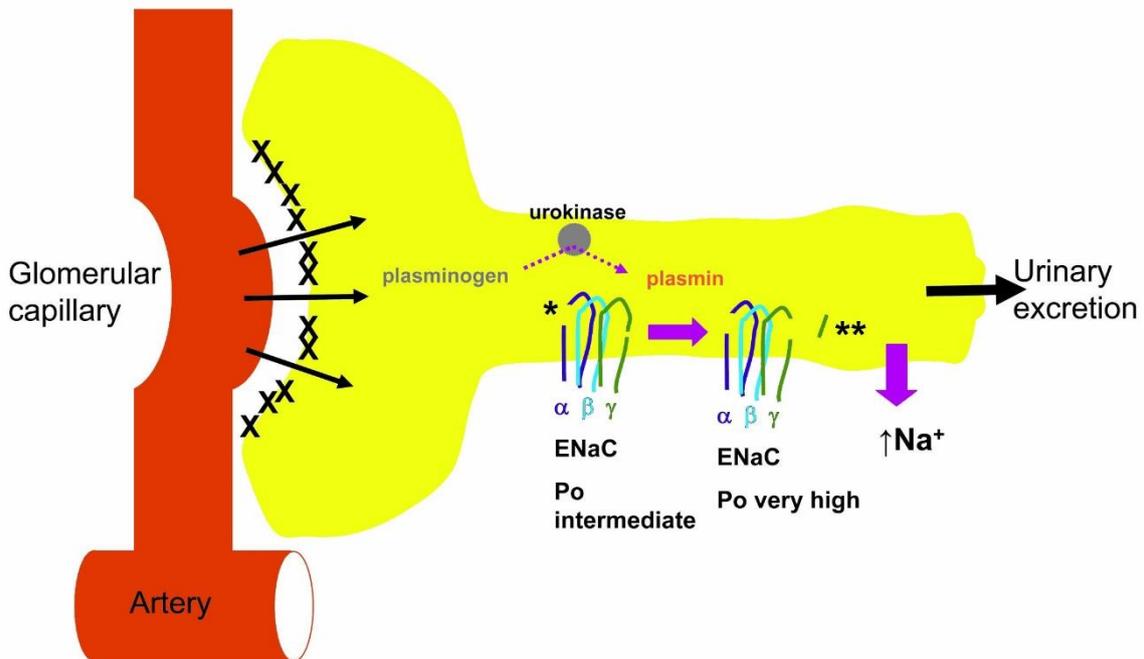


Abbildung 5: Aktivierung des ENaCs durch Plasmin [51]

Rot stellt das Vas afferens und Vas efferens der Niere da. Die Kreuze entsprechen den Podozyten des Glomerulus. Gelb entspricht dem Tubulussystem der Niere. Durch die beschädigten Glomeruli wird aberrant Plasminogen in das Tubuluslumen filtriert, welches durch die Urokinase zu Plasmin aktiviert wird. Aktives Plasmin schneidet an der γ -Untereinheit des ENaCs und erhöht so die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Konsekutiv kommt es zu einer verstärkten Natriumretention.

Während des nephrotischen Syndroms wird unter anderem das Zymogen Plasminogen aberrant in das Tubulussystem filtriert und dort vor allem durch die tubulusständige Urokinase aktiviert [34, 52, 53]. Svenningsen et al. stellten 2009 die Theorie auf, dass das entstehende Plasmin die Hauptursache der Aktivierung des ENaCs während des nephrotischen Syndroms ist. Dies könnte über eine Spaltung der γ -Untereinheit geschehen [34, 51, 54, 55], wodurch sich die Offenwahrscheinlichkeit des Natriumkanals erhöhen und es zu einer vermehrten Natriumresorption und somit konsekutiv zu einer Ödementstehung kommen könnte.

Plasmin ist eine Peptidase, deren Vorstufe in der Leber synthetisiert wird. Es ist ein wichtiger Bestandteil des Fibrinolyseystems des Körpers. Dieses System

besteht aus Plasminogen und den Aktivatoren tissue-type Plasminogenaktivator (tPA) und urokinase-type Plasminogenaktivator (uPA) [55, 56]. tPA und uPA sind die einzigen physiologisch relevanten Aktivatoren von Plasminogen in vivo [57]. uPA wird vor allem im Tubulussystem der Niere exprimiert, wohingegen tPA vermehrt in den Glomeruli produziert wird [58]. Plasmin wird nur bei Schädigung des Glomerulus im Rahmen einer Proteasurie in den Urin filtiert.

Die Behandlung von nephrotischen Ratten mit Amilorid zeigte eine reduzierte Plasminaktivierung durch die medikamentöse Hemmung von uPA und eine verminderte ENaC-Aktivierung [34]. uPA ist im Urin nephrotischer Ratten nachweisbar [52]. In murinen Epithelzellen der Trachea bei uPA-ko-Mäusen zeigte sich eine geringere ENaC-assoziierte transepithelialer Na-Transport [59]. Aprotininbehandlung bei nephrotischen Mäusen verhindert die Ödementstehung während des nephrotischen Syndroms [42]. uPA ist ebenfalls sensitiv auf Aprotinin und dessen Hemmung könnte ein Grund für die Ödemverhinderung während des nephrotischen Syndroms sein [42].

Die Urokinase kann experimentell durch den spezifischen Urokinase-Inhibitor UK 122 gehemmt werden [60].

1.3.2 Therapie des nephrotischen Syndrom

Die Vielfältigkeit der pathologischen Mechanismen des nephrotischen Syndroms erfordert differenzierte therapeutische Maßnahmen.

Bei einem nephrotisches Syndrom, das durch eine primäre Glomerulonephritis verursacht wird, steht die Therapie der zu Grunde liegenden Erkrankung im Vordergrund. Die Therapie des nephrotischen Syndroms erfolgt symptomatisch. Die symptombezogene Behandlung erfolgt mit AT1-Inhibitoren und ACE-Hemmer zur Hemmung des RAAS. Diese Wirkstoffe werden aufgrund ihrer antihypertensiven Wirkung eingesetzt [61]. Zusätzlich verringern sie eine bestehende Proteinurie und gelten so als nephroprotektiv [61, 62]. Einige Patienten sprechen nicht ausreichend auf eine alleinige RAAS-Hemmung an [63, 64] und benötigen weitere diuretische Behandlung, beispielsweise mit Schleifendiuretika, gegebenenfalls in Kombination mit Thiaziden [4].

Engmaschige Überwachung bei erhöhter Diuretikagabe zur Ausschwemmung der Ödeme ist aufgrund der Gefahr einer Elektrolytentgleisung oder hypovolämen Kreislaufzuständen indiziert.

Bei bestehender Hyperlipidämie ist eine Therapie mit Statinen erforderlich [4]. Das erhöhte Thromboserisiko sollte zusätzlich mit einer antithrombotischen Behandlung durch Cumarine oder niedermolekularem Heparin reduziert werden. Eine Albuminzufuhr als Ausgleich der Hypalbuminämie wird kontrovers diskutiert. Die Studienlage zeigt teils eine erhöhte Mortalität bei Albumingabe [65, 66], im pädiatrischen Setting wird aber eine Albumininfusion empfohlen [67].

Allgemein sind die therapeutischen Möglichkeiten der Ödembehandlung beim nephrotischen Syndrom nicht zufriedenstellend. Die Erforschung der Pathophysiologie der Ödementstehung und die adäquate Therapie des nephrotischen Syndroms sind daher sehr wichtig.

1.4 Fragestellung der Dissertation

Der Mechanismus der Ödementstehung beim nephrotischen Syndrom ist bis heute noch nicht ausreichend geklärt. Es ist bekannt, dass es aufgrund einer Proteasurie während des nephrotischen Syndroms zu einer proteolytischen ENaC-Aktivierung und konsekutiv zu einer vermehrten Natrium- und Wasserretention kommt. Hauptbestandteil der Proteasurie ist Plasminogen, das durch die tubulusständige Urokinase zu Plasmin aktiviert wird. *In vitro* schneidet Plasmin die γ -Untereinheit des ENaCs und führt so zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des Kanals [51].

In dieser Arbeit wird die Hypothese geprüft, inwieweit sich eine Hemmung der uPA-Wirkung, pharmakologisch oder durch eine genetische Defizienz, auf die tubuläre Plasminaktivierung, ENaC-Aktivierung und Ödementstehung auswirkt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Table 2 : Material - Geräte

Gerät	Hersteller
ALT 100-4M Analysenwaage	Kern
BGA-Analyseautomaten IL GEM® Premier 3000	Instrumentation Laboratory GmbH
Biofuge 13	Heraeus Instruments
Biomate S3 Spectrophotometer	Thermo Scientific
ChemiDoc Touch System	Biorad, Hercules, USA
Dräger Vapor® 2000 – Isofluran	Dräger
Dual-Timer C5080	TFA
EFUX 5057 Flammenphotometer	Eppendorf
ELx800 Absorptionsreader für Mikrotiterplatten	BioTek
Eppendorf Multipeppe	Eppendorf
Eppendorf Research® plus (0,1 µl – 2,5 µl) Pipette	Eppendorf
Eppendorf Research® plus (0,5 µl – 10 µl) Pipette	Eppendorf
Eppendorf Research® plus (10 µl – 100 µl) Pipette	Eppendorf
Eppendorf Research® plus (100 µl – 1000 µl) Pipette	Eppendorf
Eppendorf Research® plus (2 µl – 20 µl) Pipette	Eppendorf
Eppendorf Research® plus (20 µl – 200 µl) Pipette	Eppendorf
Gefrierschrank -20 °C	
Gefrierschrank -80 °C	
Hybridisation Oven/ Shaker	Amersham Biosciences
Liebherr Comfort Kühlschranks 2-8 °C	Liebherr
Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments
Plattenschüttler	
Secuflow-Niedrigraum-Abzug	mc6 Das Laborsystem
SPECTRAFluor Fluoreszenz- und Absorptionsreader für Mikrotiterplatten	Tecan
Vortex VF2	IKA®-Labortechnik
VX100 Vortexmischer, ABiMED	Labnet

Table 3 : Material - Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aluminium-Folie	div. Supermärkte
Ampuwa, 100 ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Antikörper ab154560	abcam
Antikörper NA934V	Amersham, GE healthcare
Aqua dest.	Stadtwerke Tübingen, im Labor filtriert
BD Micro-Fine™ + Demi Insulinspritzen U100 0,5 ml 0,3 x 8 mm	Seidel Medipool GmbH
Blutgaskapillaren 280 µl	Hirschmann® Laborgeräte
BRANDplates® Strip Plate 12xF8 ouregrade	Brand
Cellstar® Tubes 15 ml	greiner bio-one
Cellstar® Tubes 50 ml	greiner bio-one
Chloroform reinst. 200 ml	Merck KGaV
Citra-Lock™ 4 %, 5 ml	Dirinco B. V.
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), 500 ml	Sigma-Aldrich
Eppendorf Combitips® plus 2,5 ml	Eppendorf
Ethanol 70 %	Universitätsapotheke Tübingen
Flüssigstickstoff	Westfalen AG
Haematokrit Kapillaren 75 µl	Hirschmann® Laborgeräte
Isotonische Kochsalzlösung 0,9% , 100ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Lithium Stammlösung 500 mmol/l	biorapid GmbH
Lithium Stammlösung 500 mmol/l	biorapid GmbH
minicaps® Einmal-Kapillarpipetten Na-hep 10 µl	Hirschmann® Laborgeräte
Peha-soft® nitrile white puderfreie Untersuchungshandschuhe, Gr. S	Hartmann AG
Pipettenspitzen Standard MIKRO (0,5 – 10 µl)	Carl Roth
Plasmin	Calbiochem
ratiolab® Pipettenspitzen gelb (1 – 200 µl)	Ratiolab GmbH
Reaction tubes 1,5 ml	greiner bio-one
Reaction tubes 2 ml	Sarstedt
Reiniger D	biorapid GmbH
Reiniger-D Flammenphotometer-Reinigungslösung	biorapid GmbH
Sauerstoff	Linde AG
Serum-Standard	biorapid GmbH
Serum-Standard	biorapid GmbH

Material und Methoden

Sterillium® classic pure 500 ml	BODE Chemie GmbH
System-Leerwertlösung	biorepid GmbH
System-Leerwertlösung	Eppendorf AG
Urin-Standard	biorepid GmbH
Urin-Standard biorepid GmbH	biorepid GmbH
UV-Küvetten 70 µl mikro, Zentrumshöhe 8,5 mm, Schichtdicke 1 cm	Brand
α ₂ – Antiplasmin, Human Plasma, 100 µg	Calbiochem

Table 4 : Material - Medikamente

Medikamente	Hersteller
Amiloride hydrochloride hydrate	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
Isofluran CP® 1 ml/ml	cp-pharma® BURGDORF

Table 5 : Material - Tierhaltung

Material Tierhaltung	Hersteller
C1000 Kontrolldiät Ratte/ Maus	Altromin Spezialfutter GmbH @ Co. KG
Käfige Typ II (L)	Ehret GmbH
Leitungswasser	Stadtwerke Tübingen
LIGNOCEL® Einstreu	JRS
ssniff® Futtermittel für Ratten und Mäuse	ssniff® Spezialdiäten GmbH

Table 6 : Material - Kit/ Reagenz

Kit/ Reagenz	Hersteller
1344™, 25 mg	Cryopep
Albumin from mouse serum lyoph.	Sigma-Aldrich
Aldosteron ELISA	IBL INTERNATIONAL GMBH
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH
LT-SYS® Creatinin, mod. nach Jaffé, kinetisch, ohne Enteiweißung	Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
LT-SYS® Harnstoff, UV, kinetisch	Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
Mouse Plasminogen Total Antigen ELISA Kit	Molecular® Innovations
S-2251™, 25 mg	Chromogenix

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Studie wurde durch das Regierungspräsidium Tübingen unter der Nummer M 6/14 genehmigt. Eine Ausnahmegenehmigung zur Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten für meine Person lag vor. Alle Versuche wurden gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) sowie sämtlicher weiterer gültiger Rechtsvorschriften durchgeführt.

Für die Versuche wurden weibliche und männliche Wildtyp-Mäuse des Stammes 129 S1/SvImJ aus eigener Zucht verwendet. Die Zuchttiere des Stammes 129 S1/SvImJ wurden von Jackson Laboratories, USA, bezogen. Zuchttiere der C57BL/6-Plau tm1.1Bug/J-Mäuse ($uPA^{-/-}$) wurden freundlicherweise von Prof. Sandip Kanse (Universität Gießen) zur Verfügung gestellt.

Die $uPA^{-/-}$ - Mäuse weisen in der homozygoten Form einen gering belasteten Phänotyp auf. Sie sind äußerlich und in ihrer Verhaltensweise unauffällig, fertil und weisen eine normale Lebenserwartung auf [57, 68]. $uPA^{-/-}$ - Mäuse zeigen 2,5-mal häufiger eine Leukozyteninfiltration der Leber als die Kontrollgruppe. Selten zeigt sich eine milde bis mittlere Inflammation der Trachea [68]. In 9 % wird ein Rektalprolaps beobachtet und in 5 % langsam heilende Ulzerationen im Kopfbereich. Diese sind wahrscheinlich auf spontane Verletzungen im Käfig zurückzuführen [57]. Histologisch fanden sich gelegentlich fibrinreiche Ablagerungen im Darm, die im Bereich des prolabierenden Rektums und der Ulzerationen verstärkt auftraten. Die Daten zeigen, dass aus der homozygoten Deletion des Gens für Urokinase eine höhere Morbidität und Mortalität für die Maus resultiert [57]. Importierte $uPA^{-/-}$ - Mäuse auf dem Bl6-Hintergrund wurden über mehr als vier Generationen auf den Hintergrund 129 S1/SvImJ gekreuzt, der empfänglich für das doxorubicin-induzierte nephrotische Syndrom ist [69, 70]. Die Mäuse wurden in einem Tierraum bei Temperaturen zwischen 20 °C und 24 °C und bei einer Luftfeuchtigkeit zwischen 45 % und 65 % gehalten. Des

Weiteren bestand in der Tierhaltung ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h zu 12 h. Futter und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung.

2.2.2 Versuchsablauf und Probengewinnung

Das Studiendesign bestand aus vier Versuchsteilen. Im ersten Teil wurde das nephrotische Syndrom im experimentellen Mausmodell an Wildtyp-Mäusen untersucht. Anschließend wurde die Auswirkung der pharmakologischen Hemmung der Urokinase durch Amilorid analysiert. Nachfolgend wurde der genetische Knockout der Urokinase und dessen Folgen für die Ödementstehung näher beleuchtet. Zuletzt wurde die Auswirkung der Amiloridtherapie bei *uPA*^{-/-}-Mäusen betrachtet.

In der Auswertung wurden nur Mäuse eingeschlossen, bei denen eine nephrotische Proteinurie > 120 mg/mg Kreatinin ab Tag 8 nachweisbar war. Ausgeschlossen wurden Mäuse bei Auftreten jeglicher Art von Doxorubicin-Toxizität und Erreichen vordefinierter Abbruchkriterien zur Vermeidung einer zu großen Belastung der Tiere im Versuch (siehe Anhang). n ist jeweils die Anzahl an Proben, die an dem spezifischen Tag gewonnen und somit gemessen werden konnten. Es konnte nicht jeden Tag von allen Mäusen der Versuchsgruppe Urin gewonnen werden, daher unterscheiden sich die n Anzahl leicht. Das größte n entspricht der jeweils der Gesamtanzahl der Mäuse einer Gruppe.

Die Tiere wurden fünf Tage vor Versuchsbeginn in die Tierhaltung der Medizinischen Klinik gebracht, um sich an die räumlichen Gegebenheiten zu adaptieren. Den Mäusen wurde an Tag 0 links retrobulbär Doxorubicin (Dosis ♂ 7,25 µg/g KG bzw. ♀ 6,8 µg/g KG) injiziert, um ein nephrotisches Syndrom zu induzieren [7, 69, 71]. Dies geschah unter Isoflurannarkose (5 % vol/vol) und mittels einer 30G-Kanüle. Morgens wurde täglich zur selben Zeit Spontanurin durch eine Blasenmassage gewonnen. Anschließend wurde das Gewicht erhoben. Die Futter- und Trinkmenge wurden täglich kontrolliert. Alle zehn Tage wurde eine retrobulbäre Blutentnahme unter Isoflurannarkose durchgeführt. Nach Versuchsende wurden die Tiere unter Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation getötet.

2.2.2.1 Teilversuch 1: Untersuchung des nephrotischen Syndroms im experimentellen Mausmodell

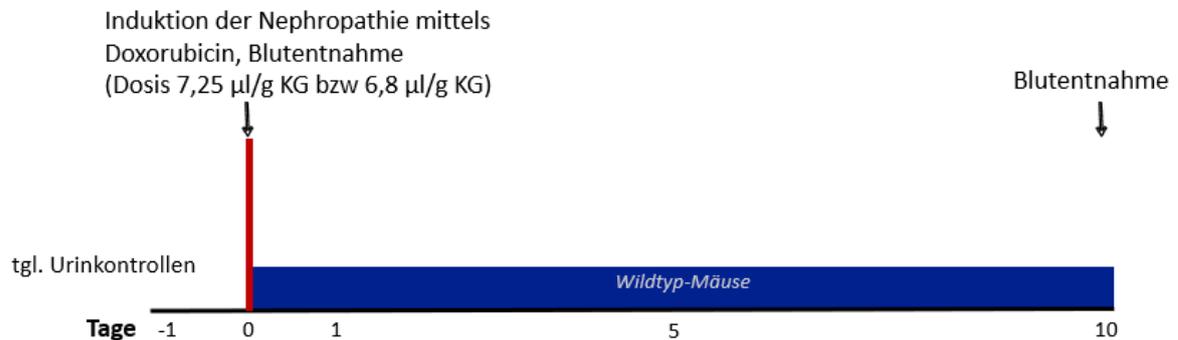


Abbildung 6: Versuchsablauf des Teilversuchs 1

Es wurden weibliche und männliche Wildtyp-Mäuse des Stammes 129 S1/SvlmJ verwendet. An Tag 0 erfolgte die Doxorubicin-Injektion. Täglich wurde Urin gewonnen und das Gewicht der Mäuse kontrolliert. An Tag 10 erfolgte eine Blutentnahme aus dem rechten retrobulbären Venenplexus. Anschließend wurden die Mäuse getötet und die Nieren entnommen.

2.2.2.2 Teilversuch 2: Hemmung der Urokinase durch Amilorid

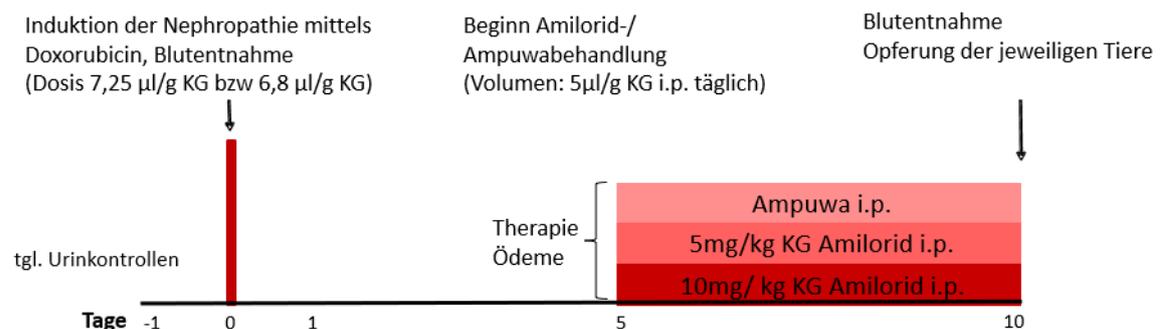


Abbildung 7: Studiendesign des Teilversuchs 2

Drei Gruppen von Wildtyp-Mäusen wurden ab Tag 5 mit unterschiedlichen Therapieregimen behandelt. Die Therapie wurde ab Tag 5 täglich intraperitoneal (i.p.) mit einem Volumen von 5 µl/g KG zur selben Uhrzeit verabreicht. Als Vehikel diente injizierbares, steriles Wasser (Ampuwa). Die Ödemtherapie mit Amilorid

erfolgte in den Dosierungen 5 mg/kg KG und 10 mg/kg KG. Das pulverförmige Amilorid wurde in Ampuwa gelöst und die Lösung wurde lichtgeschützt gelagert. Urin wurde vor und 4 h nach der Injektion gewonnen. An Tag 10 nach Doxorubicininjektion wurde den Mäusen Blut entnommen, sie wurden geopfert und die Nieren wurden entnommen.

2.2.2.3 Teilversuch 3: Auswirkung einer genetischen Deletion der Urokinase

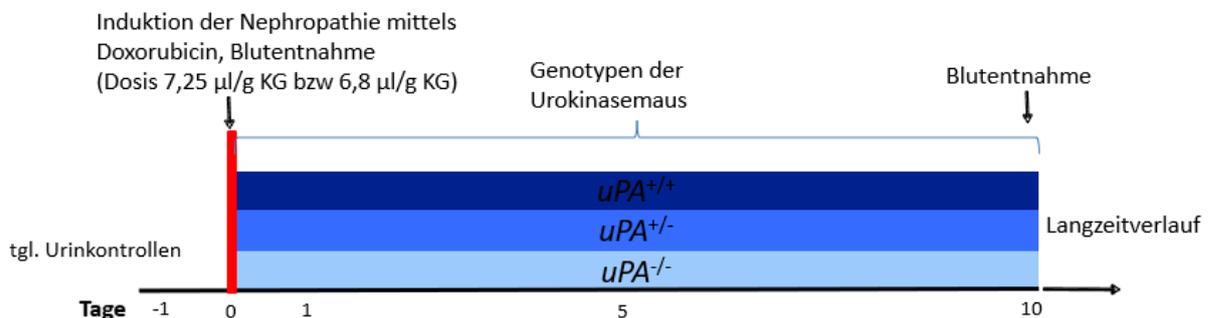


Abbildung 8 : Studiendesign des Teilversuchs 3

Es wurden uPA -Wildtyp/-heterozygote und -knockout Mäuse verwendet. Im Folgenden sind die Wildtyp-Mäuse mit $uPA^{+/+}$, die heterozygoten Mäuse mit $uPA^{+/-}$ und die Knockout-Mäuse mit $uPA^{-/-}$ bezeichnet.

Analog zum vorherigen Versuchsaufbau wurde den Mäusen an Tag 0 Doxorubicin gespritzt, um ein nephrotisches Syndrom zu induzieren. Ab Tag 0 wurde täglich Urin gewonnen und die Mäuse wurden gewogen. Alle zehn Tage wurde Plasma abgenommen, um die Nierenfunktion zu überprüfen. Ab Tag 10 befanden sich die Mäuse im Langzeitverlauf, währenddessen alle zehn Tage bis Tag 100 Blut abgenommen wurde.

2.2.2.4 Teilversuch 4: Auswirkung der genetischen Deletion der Urokinase auf die Amiloridbehandlung

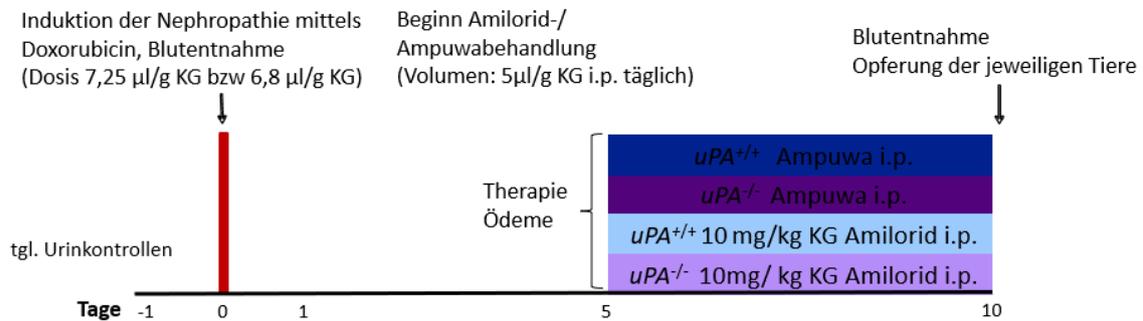


Abbildung 9: Studiendesign des Teilversuchs 4

In diesem Teil wurden *uPA*^{+/+}- und *uPA*^{-/-}- Mäuse entweder mit Ampuwa oder mit Amilorid in der Dosierung 10 mg/kg KG behandelt. Die Injektion erfolgte wie in den vorherigen Versuchsaufbauten intraperitoneal.

Analog zum vorherigen Versuchsaufbau wurde den Mäusen an Tag 0 Doxorubicin gespritzt, um ein nephrotisches Syndrom zu induzieren. Ab Tag 0 wurde täglich Urin gewonnen und die Mäuse wurden gewogen. Ab Tag 5 wurde die Mäuse täglich Ampuwa oder Amilorid 10 mg/kg KG i.p. verabreicht. An Tag 10 wurde Plasma abgenommen. Anschließend wurden die Mäuse getötet und die Nieren wurden entnommen.

2.2.3 Blut- und Urinparameter

Urinproben wurden jeden Morgen zur gleichen Zeit durch abdominelle Blasenmassage gewonnen. Die Proben wurden anschließend bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

Die Blutproben wurden durch Punktion des rechten retrobulbären Venenplexus mittels einer Mikrokapillare in Isoflurannarkose (5 % vol/vol) gewonnen. Anschließend wurde durch Zentrifugation das Plasma separiert und das Plasma wurde bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.3.1 Messung der Proteinurie mittels Bradford (Bio-Rad Protein Assay)

Prinzip

Die Proteinuriebestimmung mittels Bradford erfolgte photometrisch. Proteine binden dabei an den Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250, insbesondere, wenn es sich um basische oder aromatische Aminosäurenreste handelt. Dies führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm und damit von einem braunen in einen blauen Bereich. Die Extinktion verhält sich dabei direkt proportional zur Proteinkonzentration [72, 73].

Inhaltsstoffe

Protein Assay - Dye Reagent Concentrate 450 ml

Aqua dest.

Ampuwa ®

Vorbereitung

Die Protein Assay – Dye Reagent Concentrate-Reagenz wird 1:5 mit Aqua dest. verdünnt.

Durchführung

Je 2 µl der Urinprobe bzw. Ampuwa als Leerwert werden mit 1 ml Reagenz in eine Küvette pipettiert. Danach erfolgt eine Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Die Extinktion wird bei $\lambda=595$ nm gemessen.

Die Proteinkonzentration wird mit folgender Standardkurve berechnet:

$$c_{Protein} \left[\frac{mg}{mg \text{ crea}} \right] = \frac{c_{Protein} \left[\frac{mg}{ml} \right]}{c_{Kreatinin} \left[\frac{mg}{dl} \right]} \times 100$$

Die obere Nachweisgrenze ist hierbei 10 mg/ml. Bei höheren Werten wurde die Probe dementsprechend mit Ampuwa verdünnt. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0,2 mg/ml.

Es liegt kein Hinweis auf relevante Interaktionen mit anderen Verbindungen vor.

2.2.3.2 Elektrolytmessung am Flammenphotometer

Prinzip

Das Flammenphotometer dient der quantitativen Bestimmung der Elektrolyte Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ im Urin. Bei dieser Methode werden die (Erd-)Alkalimetallionen Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ in einer Acetylenflamme verbrannt und die Ionenkonzentration anhand der jeweils charakteristischen Flammenfärbung detektiert. Die jeweiligen Farbveränderungen der Flamme werden zu der Veränderung der Flamme bei alleiniger Lithiumverbrennung in Relation gesetzt. Die jeweilige Ionenkonzentration verhält sich direkt proportional zur jeweiligen Farbintensität der Flamme [74].

Inhaltsstoffe

Reiniger-D Flammenphotometer-Reinigungslösung

Urin-Standard

Lithium Stammlösung 500 mmol/l

System-Leerwertlösung

Vorbereitung

Bei Urinmengen < 150 µl werden die Proben 1:5 verdünnt.

Durchführung

Die Urinprobe wird unverdünnt gemessen. Der Standardabgleich erfolgt mit Urinstandard (c[Na⁺] = 143,5 mmol/l, c[K⁺] = 100,0 mmol/l, c[Ca²⁺] = 5,00 mmol/l). Bei Messwerten außerhalb des Referenzbereiches (Na⁺ : 10,0 – 300,0 mmol/l, K⁺ : 5,0 – 200,0 mmol/l, Ca²⁺ : 0,50 – 20,00 mmol/l) wird die Urinprobe um DF 5 verdünnt.

Berechnung der Elektrolytkonzentration:

$$c_{\text{Elektrolyt}} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg crea}} \right] = \frac{c_{\text{Elektrolyt}} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right]}{c_{\text{Kreatinin}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right]} / 100 (\times DF)$$

2.2.3.3 Kreatininmessung im Urin mit der modifizierten Methode nach Jaffé (LT-SYS® Creatinin, kinetisch)

Prinzip

Das Grundprinzip der Kreatininmessung beruht auf der Bindung von Pikrinsäure an Kreatinin bei einem alkalischen pH-Wert. Hierbei bildet sich ein gelber Komplex und es kommt zu einer Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von 492 nm. Es handelt sich um einen kinetischen Farbttest. Die Farbintensität wird photometrisch gemessen und die Kreatininkonzentration verhält sich direkt proportional zur Farbintensitätsveränderung [75, 76].

Inhaltsstoffe

Natronlauge (400 mmol/l)

Pikrinsäure (55 mmol/l)

Standard (Creatinin 2,0 mg/dl)

Ampuwa ®

Vorbereitung

Die Messlösung wird aus 1 Teil Natronlauge, ¼ Teil Pikrinsäure und ¾ Teil Ampuwa gemischt. Die Urinproben werden für die Messung im Verhältnis DF 20 mit Ampuwa verdünnt.

Durchführung

Pro Küvette werden 200 µl der Messlösung und 10 µl Urinprobe, Standard oder Ampuwa als Leerwert zusammengegeben und gevortext. Nach 10 Sekunden (t_0) und nach 8 Minuten (t_8) wird die Extinktion der Probe bei einer Wellenlänge von $\lambda = 492$ nm im Photometer bei Raumtemperatur gemessen.

Die Kreatininkonzentration berechnet sich nach folgender Formel:

$$c_{\text{Kreatinin}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right] = \frac{\Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}}{\Delta E_{\text{Standard}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}} \times C_{\text{Standard}} \times DF$$

$\Delta E = \text{Differenz zwischen Extinktion bei } t_8 \text{ und Extinktion bei } t_0$

Der lineare Bereich lag unter $c < 0,8$ mg/dl. Die obere Nachweisgrenze liegt bei 300 mg/dl, die untere Nachweisgrenze liegt bei 0,03 mg/dl.

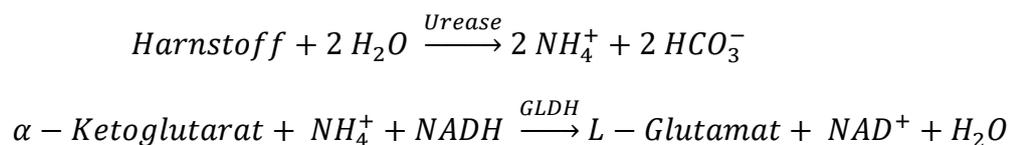
Material und Methoden

Wenn der Wert über der oberen Nachweisgrenze lag, wurde die Probe entsprechend mit Ampuwa verdünnt.

2.2.3.4 Harnstoffkonzentration im Plasma (LT-SYS® Harnstoff, UV, kinetisch)

Prinzip

Durch den enzymatischen Abbau von Harnstoff durch das Enzym Urease kommt es zur Bildung von Ammoniak und Bikarbonat. Messbar hierbei ist der Abfall von NADH durch eine Absorptionsänderung bei 340 nm. Es entstehen NADH und Ketoglutarate durch die enzymatische Reaktion von Harnstoff zu Ammoniak und Bikarbonaten. Ammoniak wiederum reagiert mit NADH und α -Ketoglutarat zu L-Glutamat und NAD^+ . Katalysiert wird dieser Vorgang durch die Glutamatdehydrogenase (GLDH). Daher ist der Anteil an NADH in der Probe direkt proportional zur Harnstoffkonzentration [77][78].



Inhaltsstoffe

Reaktionsenzym (liophilisierte Urease und GLDH)

Puffer (TRIS-Puffer 100 mM, pH 7,8, Ketoglutarat 6 mM, NADH 0,2 mM, ADP 2 mM, EDTA 4 mM, Stabilisatoren)

Standard (c = 40 mg/dl)

Vorbereitung

Für die Messlösung werden die Reaktionsenzyme in 16 ml Puffer aufgelöst. Gekühlt ist die Lösung bei 2-8°C für einen Monat haltbar.

Durchführung

In eine Küvette werden 300 μ l Messlösung und 3 μ l Probe, Standard oder Ampuwa pipettiert und gevortext. Die erste Absorption bei 340 nm ist nach exakt zehn Sekunden (t_0) abzulesen. Die zweite Messung folgt nach genau acht Minuten (t_8). Die Proben haben dabei Raumtemperatur. Bei einer Serummessung muss das Serum nicht verdünnt werden.

Berechnung der Harnstoffkonzentration:

$$c_{\text{Harnstoff}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right] = \frac{\Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}}{\Delta E_{\text{Standard}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}} \times C_{\text{Standard}} \times DF \times \frac{10}{9}$$

ΔE = Differenz zwischen Extinktion bei t_8 und Extinktion bei t_0

Die untere Nachweisgrenze liegt bei 2 mg/dl, die obere Nachweisgrenze liegt bei 300 mg/dl. Bei Werten über der oberen Nachweisgrenze wird die Plasmaprobe entsprechend mit Ampuwa verdünnt. Störfaktoren bei der Messung sind Ammoniumionen bei z.B. Ammoniumheparinat, Hämolyse und Lipämie, welche in falsch niedrigen Werten resultieren. Bei einer Hyperlipidämie im Plasma sollte die Probe vor der Messung mit Chloroform im Verhältnis 1:10 verdünnt werden. Danach erfolgt eine Zentrifugation und der gereinigte Überstand der Probe wird abpipettiert. Schließlich erfolgt die Bestimmung der Harnstoffkonzentration mittels der oben genannten Vorgehensweise aus der gereinigten Probe.

2.2.3.5 Blutgasanalyse

Bei der Blutgasanalyse (BGA) wird 150 μl Blut mit einer Natrium-Heparin-beschichteten Kapillare retrobulbär entnommen und mithilfe des Analyseautomaten IL GEM® Premier 3000 (Instrumentation Laboratory GmbH) gemessen. Folgende Werte wurden gemessen beziehungsweise errechnet: pH, pCO_2 [mmHg], pO_2 [mmHg], Na^+ [mmol/l], K^+ [mmol/l], Ca^{2+} [mmol/l], Hkt [%], Ca^{2+} (pH 7,4), HCO_3^- [mmol/l], HCO_3^- std [mmol/l], BE [mmol/l], SO_2c [%], cHbc [g/dl].

2.2.3.6 Messung der Plasmin- und Urokinaseaktivität im Urin mittels chromogenen Substraten

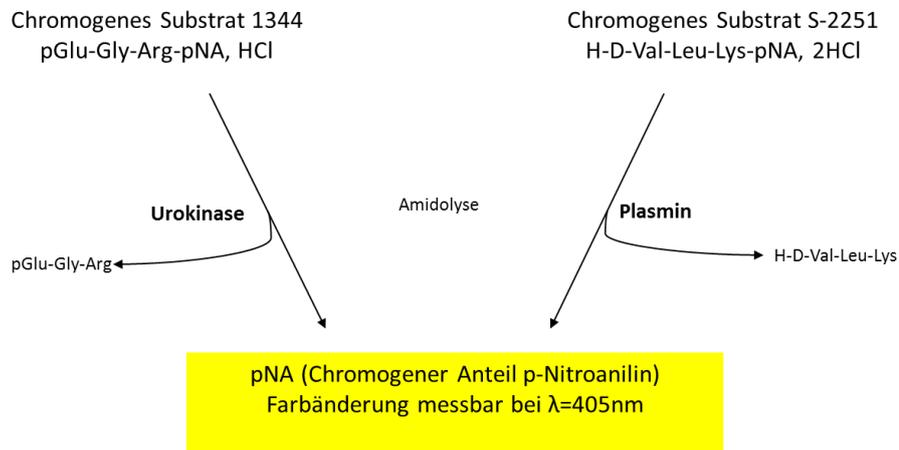


Abbildung 10: Funktionsweise chromogene Substrate

pNA = p-Nitroanilin, λ ist die Extinktion

Ein chromogenes Substrat ist ein synthetisch erzeugtes Peptid aus einer Sequenz von drei bis vier Aminosäuren, die präferentiell an das aktive Zentrum des untersuchten Enzyms binden. An die Aminosäurekette ist das Chromophor pNA (p-Nitroanilin) über eine Amidbindung gekoppelt, das an der Kette farblos ist, bei Abspaltung jedoch gelb wird.

Mengt man das Substrat in die Probe, reagiert das entsprechende Enzym (in diesem Fall Plasmin oder Urokinase) mit dem chromogenen Substrat und spaltet das p-Nitroanilin mittels Amidolyse von der Aminosäurekette ab. Der Farbumschlag ist im Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm messbar. Zur Bestimmung der Urokinaseaktivität wird das Substrat 1344 und der Inhibitor UK 122 verwendet, für die Bestimmung der Plasminaktivität eignet sich das chromogene Substrat S-2251 und der Inhibitor Antiplasmin.

2.2.3.7 Messung der Urokinaseaktivität im Urin mittels 1344

Inhaltstoffe

Cryopep pNAPEP 1344 25 mg

PBS (phosphote-buffered saline)

UK 122 (uPA-Inhibitor, Santa Cruz) 25 mg/ml

Ampuwa

Material und Methoden

Vorbereitung

Zur Herstellung der 1344-Stammlösung werden 25 mg des Cryopep 1344-Flakons in 17ml PBS (phosphate-buffered saline) aufgelöst. Dadurch ergibt sich eine Lösung mit 2,95 mmol/l 1344. Das Substrat wird bei -20 °C gelagert und ist über Wochen haltbar. Bakteriell bedingter Abbau resultiert in einer gelblichen Verfärbung der Lösung. Damit ist die Lösung nicht mehr zu verwenden [79].

Durchführung

In eine Mikrotiterplatte werden 3 µl unverdünnter Mäuseurin, mit oder ohne Urokinase-Inhibitor (3 µl UK122) und 50 µl Substrat pipettiert. Bei Zugabe des Substrates startet die Reaktion. Für den Leerwert werden statt 3 µl Probe 3 µl Ampuwa hinzugegeben.

Die Mikroküvetten werden für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Absorption im Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

Die amidolytische Aktivität wird folgendermaßen berechnet:

$$\begin{aligned} \text{amidolytische Aktivität} & \left[\frac{OD \times 1000}{60 \text{ min}} \right] \\ & = \frac{(E_{\text{ohne Inhibitor}} - E_{\text{Leerwert}}) - (E_{\text{mit Inhibitor}} - E_{\text{Leerwert}})}{60 \text{ min}} \times 1000 \end{aligned}$$

2.2.3.8 Messung der Plasminaktivität im Urin mittels S-2251

Inhaltsstoffe

Chromogenix S2251 25mg

PBS (phosphate-buffered saline)

Antiplasmin 1mg/ml (Merck)

Ampuwa

Vorbereitung

Zur Herstellung der S-2251 Stammlösung werden 25 mg des S-2251-Flakons in 15 ml PBS aufgelöst. Dadurch ergibt sich eine Lösung von 3,02 mmol/l S-2251. Das Substrat wird bei -20 °C gelagert und ist über Wochen haltbar.

Material und Methoden

Bei bakteriell bedingtem Abbau entwickelt sich eine gelbliche Verfärbung der Lösung. Damit ist die Lösung nicht mehr zu verwenden

Durchführung

Das Pipettierschema und die Messung erfolgt wie im obigen Abschnitt der Urokinaseaktivitätsmessung mit 1344 beschrieben. Als Inhibitor wird Antiplasmin 1 mg/ml verwendet.

In eine Mikrotiterplatte werden 3 µl unverdünnter Mäuseurin, 3 µl Ampuwa als Leerwert oder 3 µl Antiplasmin 1 mg/ml als Inhibitor und 50 µl Substrat pipettiert. Bei Zugabe des Substrates startet die Reaktion. Für den Leerwert werden statt 3 µl Probe 3 µl Ampuwa hinzugegeben. Als Standard wird 3 µl Plasmin verwendet.

Die Mikroküvetten werden für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Absorption im Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen[80][81].

Die amidolytische Aktivität wird folgendermaßen berechnet:

$$\begin{aligned} \text{amidolytische Aktivität} & \left[\frac{OD \times 1000}{60 \text{ min}} \right] \\ & = \frac{(E_{\text{ohne Inhibitor}} - E_{\text{Leerwert}}) - (E_{\text{mit Inhibitor}} - E_{\text{Leerwert}})}{60 \text{ min}} \times 1000 \end{aligned}$$

2.2.3.9 Westernblot

Prinzip

Die Methode des Westernblots ist eine Technik, bei der Proteine einer Probe durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden. Das aufgetrennte Proteingemisch wird anschließend in einem elektrischen Feld auf eine Membran geblottet und über spezifische Antikörper-Antigen-Interaktion sichtbar gemacht. So ist es möglich, eine qualitative und eine semiquantitative Analyse der entsprechenden Proteine durchzuführen [82].

Material und Methoden

Vorbereitung

Die Urinproben werden durch Zugabe von SDS und β -Mercaptoethanol reduziert und denaturiert und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt.

Durchführung

Die Elektrophorese erfolgt in einem 7,5 % SDS-Polyacrylamid Gel. Pro Ladetasche werden 20-30 μ g Probenlysat geladen. Das Gel läuft bei einer Spannung zwischen 100 V und 150 V für 50 bis 90 Minuten.

Anschließend werden die aufgetrennten Proteine mithilfe eines Tank-Blotters auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Hierzu legt man eine Spannung von 100 V für ein bis zwei Stunden bei 4 °C an. Die negativ geladenen Proteine bewegen sich aus dem Gel auf die Membran hin zur positiven Kathode.

Dann wird die Membran zum Blocking unspezifischer Bindungsstellen in 5 % BSA für ein bis zwei Stunden inkubiert.

Im nächsten Schritt wird die Membran mit dem primären, aus Kaninchen gewonnenen Antikörper gegen die schwere Kette des Plasminogens (ab154560 abcam) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Banden werden durch Chemilumineszenz mithilfe eines sekundären Antikörpers (NA934V, Amersham, GE healthcare) auf einem ChemiDoc Touch System (Biorad, Hercules, USA) entwickelt.

Zum Schluss wird der Membran, nach Nutzung von HRP-konjugierten Sekundärantikörpern, ein Substrat, zum Beispiel Hydrogenperoxide und Luminor, hinzugefügt, um die gebundenen Antikörper sichtbar zu machen. Die so behandelte Membran kann nun eingescannt und ausgewertet werden.

2.2.3.10 Bestimmung der Amiloridkonzentration im Urin und Plasma mittels Fluoreszenz

Prinzip

Amilorid wird nach Extraktion aus dem Urin mittels Fluoreszenz gemessen. Hierzu wird Amilorid durch Mischung mit Natriumcarbonat in Richtung eines

Material und Methoden

alkalischen pHs verschoben und mithilfe von Ethylacetat aus dem Urin extrahiert. Nach Zentrifugation wird das Ethylacetat von der basischen Lösung entfernt und es wird Salzsäure hinzugegeben. Nach erneuter Zentrifugation löst sich das Amilorid in der sauren, protonierten Form in der wässrigen Phase. Die so entstandene Lösung hat ein Absorptionsmaximum bei 360 nm. Der Amiloridmetabolit produziert eine blaue Fluoreszenz, die bei 420 nm detektierbar ist.

Inhaltsstoffe

Gesättigte NaCO₃-Lösung (217 g/ Liter Wasser)

600 µl Ethylacetat (Ethylsäureester): Sigma

0,1 N HCL

Durchführung

Im ersten Schritt werden 24 µl des Standards oder der Probe (Urin oder Plasma) mit 48 µl gesättigter NaCO₃-Lösung versetzt. Anschließend wird 600 µl Ethylacetat zu jeder Probe hinzugegeben und für zehn Sekunden gevortext. Danach werden die Proben für zwei Minuten mit 3000 g zentrifugiert. Hierauf werden je 480 µl des Überstandes entnommen und in ein neues Gefäß mit 120 µl 0,1 HCL gegeben. Diese Lösung wird für zehn Sekunden gevortext und für zwei Minuten mit 3000 g zentrifugiert. Zuletzt werden 100 µl der nun entstandenen unteren wässrigen Phase entnommen und in eine schwarze Mikrotiterplatte pipettiert.

Amilorid in der so entstandenen Lösung wird bei 360 nm angeregt und die Emission wird bei 405 nm detektiert. [29]

2.2.3.11 **Aldosteron ELISA**

Prinzip

Die Messung der Aldosteronkonzentration wird mithilfe eines kompetitiven Enzymimmunoassay-Kits (ELISA) des Herstellers IBL International GmbH durchgeführt. Hierbei konkurrieren eine unbekannte Menge an Antigen mit einer

Material und Methoden

bekanntem Menge an enzymmarkiertem Antigen um die Bindungsstelle des Antikörpers, der an die Wells der Mikrotiterplatte gebunden ist. Nach der Inkubation werden nicht gebundene enzymmarkierte Antigene durch Waschen entfernt. Die Intensität der Farbreaktion nach Reaktion mit dem Substrat ist umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration in den Proben. Die Konzentrationen der Proben können anhand einer Standardkurve bestimmt werden.

Inhaltsstoffe

Mikrotiterplatte mit Antikörpern gegen Aldosteron (polyklonal)

20 ml Enzymkonjugat (Aldosteron-HRP Konjugat)

Standard A-F

Positivkontrolle

Negativkontrolle

25 ml TMB Substratlösung

14 ml TMB Stopplösung

30 ml Waschpufferkonzentrat (40x)

Durchführung

Die Standard- und die Positivkontrolle werden mit jeweils 1 ml destilliertem Wasser rekonstituiert. Die 30 ml Waschpufferkonzentrat werden mit 1170 ml destilliertem Wasser verdünnt.

Im ersten Schritt werden jeweils 25 µl der Probe in ein Röhrchen pipettiert. Anschließend wird in jedes Röhrchen 25 µl Freisetzungsreagenz (*Release Reagent*) pipettiert und über Nacht (16-20h) bei 2 – 8 °C inkubiert. Anschließend wird jedem Röhrchen 25 µl Neutralisationsreagenz (*Neutralization Reagent*) und 400 µl Verdünnungspuffer hinzugefügt. Das Plasma ist nun 1:19 verdünnt.

Bei der Messung werden nun 50 µl des Standards, der Kontrolle und des behandelten Plasmas in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wird die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 25°C) inkubiert. Im folgenden Schritt werden je 150 µl Enzymkonjugat in jedes Well hinzugefügt und die Platte wird erneut für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Wells

werden nun mit jeweils 400 μ l Waschpuffer gewaschen. Direkt im Anschluss werden je 200 μ l TMB Substratlösung in jedes Well pipettiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 Minuten, wird 100 μ l der TMB Stopplösung hinzugefügt. Die optische Dichte wird nun im Photometer bei 450 nm innerhalb von 10 Minuten gemessen. Die Auswertung folgt mit Hilfe einer Standardkurve [83, 84].

2.2.4 Statistische Auswertung

Alle Werte sind, sofern nicht anders beschrieben, als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter zu Hilfenahme der Graphik- und Statistiksoftware GraphPad Prism 6 (Graphpad Software Inc.) und Microsoft Office Excel 10. Folgende Tests wurden zur Überprüfung der Normalverteilung herangezogen: Kolmogorov-Smirnoff-, D'Adogostino-Pearson- und Shapiro-Wilk-Test. Sobald einer dieser Tests keine Normalverteilung anzeigte, wurden die Ergebnisse als nicht normalverteilt angesehen. Die Analyse auf Varianz erfolgte bei Normalverteilung mittels one-way-ANOVA und bzw. bei nicht normalverteilten Werten mittels Kruskal-Wallis-Test. Zur Signifikanzanalyse wurden bei Normalverteilung der Dunnett-Bonferroni-, der Tuckey-Posttest- oder der Student's-t-Test bzw. bei keiner Normalverteilung der Dunn-Posttest verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Teilversuch 1: Nephrotisches Syndrom im Mausmodell

Nach Induktion mit Doxorubicin entwickelten die 129 S1/SvImJ Wildtyp-Mäusen innerhalb von 8 Tagen das Vollbild eines nephrotischen Syndroms mit Proteinurie, Hypalbuminämie, Gewichtszunahme, Anstieg des Harnstoffs sowie Anstieg der Urin-Urokinase- und Plasminaktivität.

3.1.1 Proteinurie und Plasma-Albumin-Konzentration

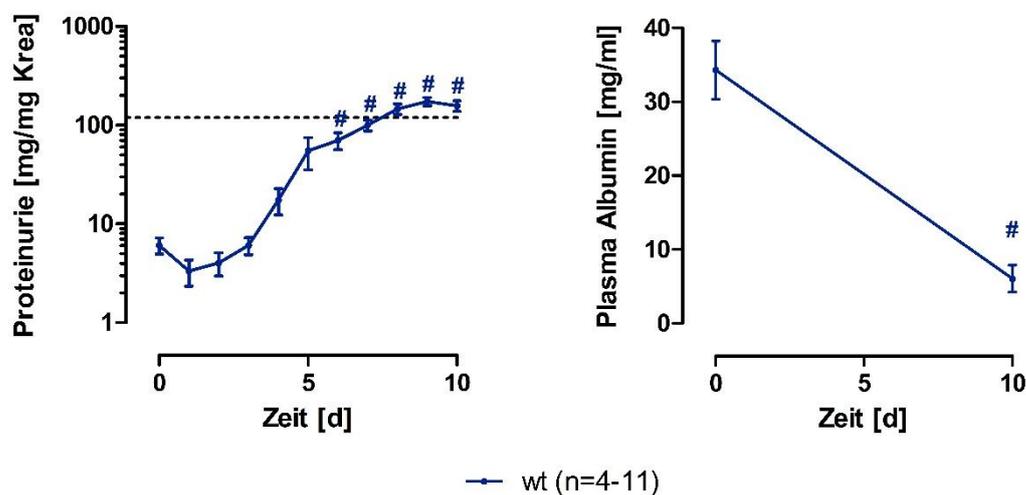


Abbildung 11: Experimentelles nephrotisches Syndrom – Proteinurie und Plasma Albumin

Links: Zeitlicher Verlauf der Proteinurie in [mg/mg Krea], gestrichelte Linie: Nephrotische Schwelle von 120 mg/mg Krea; Rechts: Zeitlicher Verlauf des Plasmaalbumins, gemessen an Tag 0 und Tag 10; # $p < 0,05$ zu Tag 0, n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Ab Tag 3 entwickelte sich eine Proteinurie mit einem Überschreiten der nephrotischen Schwelle von 120 mg/mg Kreatinin im Verlauf. An Tag 10 pendelte sich die Proteinurie bei einem Niveau von 157 ± 19 mg/mg Kreatinin ein.

Parallel entwickelte sich im Plasma eine Hypalbuminämie. Das Plasma-Albumin fiel signifikant von 34 ± 4 mg/ml unter Kontrollbedingungen auf 6 ± 2 mg/ml an Tag 10 ab.

3.1.2 Gewicht

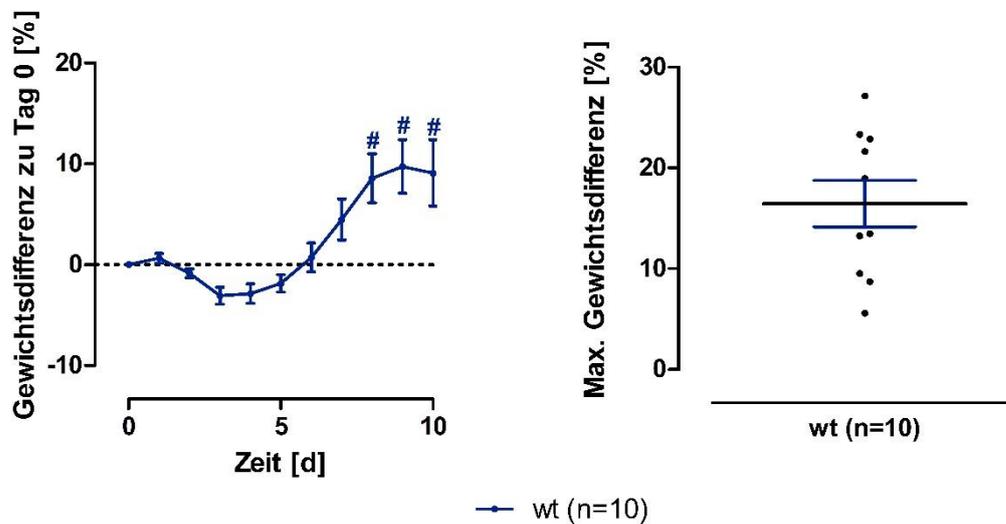


Abbildung 12: Experimentelles nephrotisches Syndrom – Gewichtsverlauf

Links: Gewichtsverlauf als Differenz zu Tag 0 in [%], gestrichelte Linie: Ausgangsgewicht; Rechts: Maximale Gewichts­differenz zwischen vorausgegangene­m Minimum und Maximum in [%]; # $p < 0,05$ zu Tag 0, $n =$ Anzahl der jeden Tag gewogenen Mäuse

Das mittlere Ausgangsgewicht der Mäuse lag bei $23,39 \pm 0,77$ g. Nach Doxorubicininjektion sank das Gewicht bis Tag 3 auf einen Wert von durchschnittlich $22,67 \pm 0,76$ g. Das entspricht einem mittleren Gewichtsverlust von 3 ± 1 %. Ab Tag 4 kam es zu einem signifikanten Gewichtsanstieg, der ab Tag 6 das Ausgangsgewicht überstieg und an Tag 10 ein Maximum bei $25,49 \pm 1,09$ g erreicht. Dieses Gewicht lag im Mittel 9 ± 3 % über dem Ausgangsgewicht. Die maximale Gewichts­differenz innerhalb der 10 Versuchstage betrug somit $3,86 \pm 0,55$ g, bzw. 17 ± 2 %.



Abbildung 13 : Experimentelles nephrotisches Syndrom – Aszites

Obere Maus: Gesunde Maus; Untere Maus: Nephrotische Maus mit ausgeprägtem Aszites, besonders zu Sehen an den ausladenden Flanken

3.1.3 Natriurese

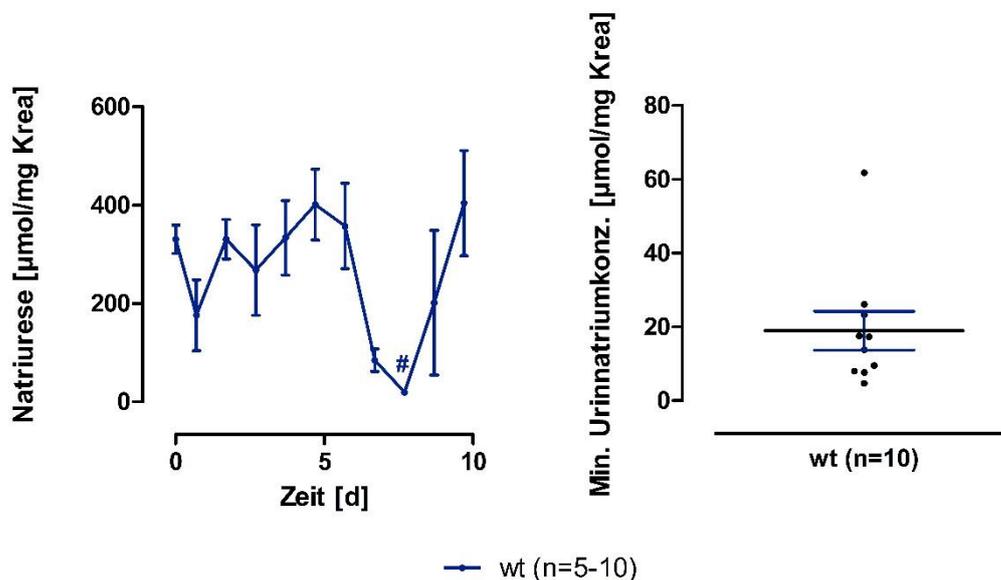


Abbildung 14: Experimentelles nephrotisches Syndrom – Natriurese

Links: Zeitlicher Verlauf der Natriurese in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Krea; Rechts: Minimale Natriumkonzentration gemessen zwischen Tag 5 und Tag 10 in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Krea; # $p < 0,05$ zu Tag 0, n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Die mittlere Natriurese zeigte sich die ersten Tage weitgehend stabil in einem Bereich von $330 \pm 29 \mu\text{mol}/\text{mg}$ Kreatinin bis $357 \pm 87 \mu\text{mol}/\text{mg}$ Kreatinin. Ab Tag 6 kam es zu einem signifikanten Abfall auf $52 \pm 22 \mu\text{mol}/\text{mg}$ Kreatinin an Tag 8. Dem folgte ein Anstieg auf $518 \pm 147 \mu\text{mol}/\text{mg}$ Kreatinin an Tag 10. Die durchschnittliche minimale Urinnatriumkonzentration pro Maus gemittelt betrug $19 \pm 5 \mu\text{mol}/\text{mg}$ Kreatinin.

3.1.4 Plasma-Aldosteron- und -Harnstoff-Konzentration

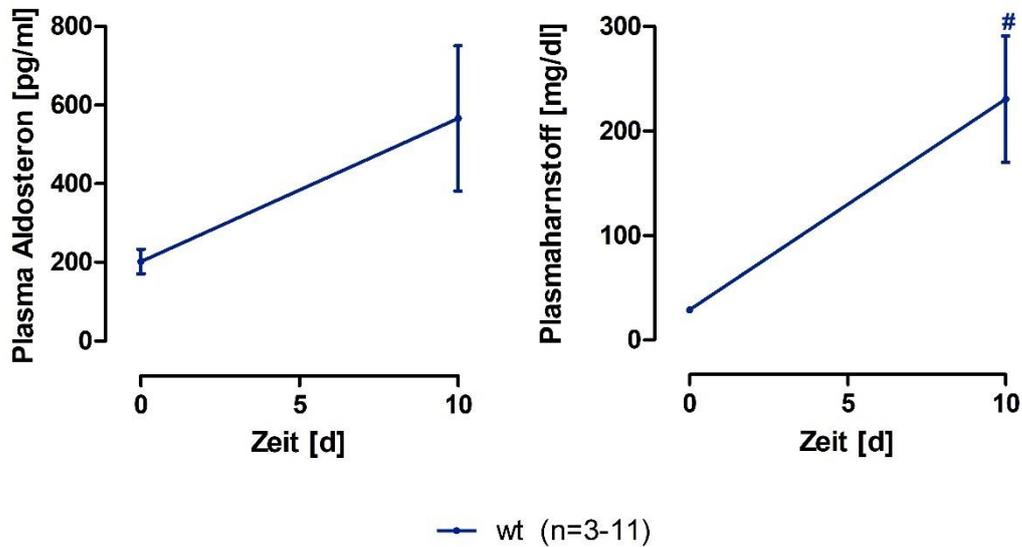


Abbildung 15 : Experimentelles nephrotisches Syndrom – Plasma Aldosteron und Plasma Harnstoff

Links: Zeitlicher Verlauf der Aldosteronkonzentration in [pg/ml] im Plasma; # $p < 0,05$ zu Tag 0
Rechts: Zeitlicher Verlauf der Harnstoffkonzentration im Plasma an Tag 0 und 10 [mg/dl]; # $p < 0,05$ zu Tag 0, n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Bei gesunden Tieren an Tag 0 lag die Aldosteronkonzentration im Plasma gemittelt bei 202 ± 32 pg/ml. Bis Tag 10 entwickelte sich ein Hyperaldosteronismus und der Plasma-Aldosteronspiegel stieg signifikant auf das Dreifache (566 ± 184 pg/ml) an.

Die Harnstoffkonzentration der gesunden Mäuse an Tag 0 lag im Mittel bei 27 ± 1 mg/dl. Nach Induktion des nephrotischen Syndroms stieg der Harnstoff signifikant auf 230 ± 60 mg/dl an Tag 10 an.

3.1.5 Urokinase- und Plasminaktivität im Urin

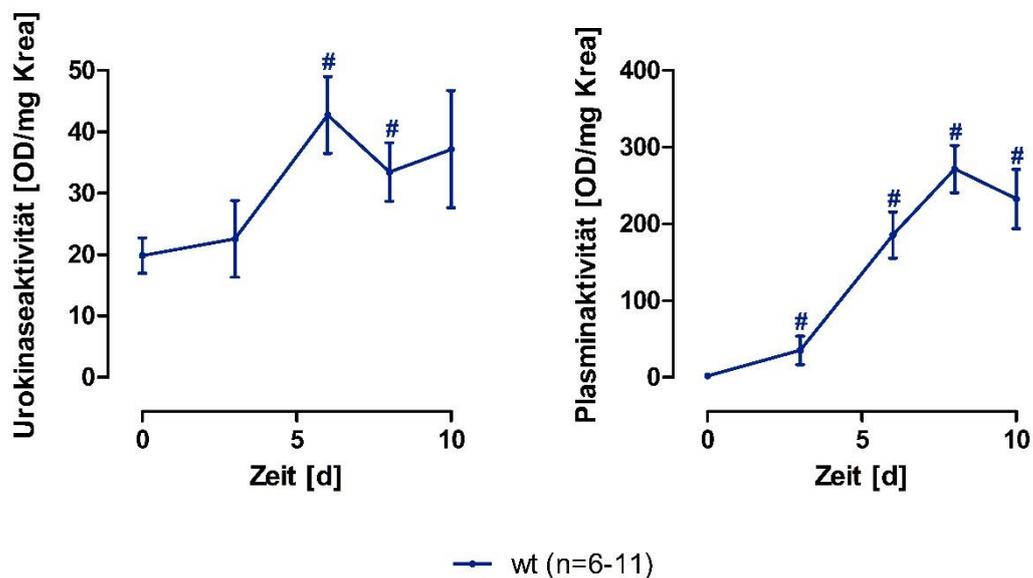


Abbildung 16 : Experimentelles nephrotisches Syndrom – Urokinase - & Plasminaktivität im Urin

Links: Zeitlicher Verlauf der Urokinaseaktivität in [OD/mg Krea] gemessen im Urin; Rechts: Zeitlicher Verlauf der Plasminaktivität in [OD/mg Krea] gemessen im Urin; OD @ 405 nm; # $p < 0,05$ zu Tag 0, n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Der Ausgangswert der Urokinaseaktivität an Tag 0 lag bei 20 ± 3 OD/mg Kreatinin. Mit Auftreten der Proteinurie stieg die Urokinaseaktivität ab Tag 6 signifikant auf das Doppelte mit einem Maximum von 43 ± 6 OD/mg Kreatinin an Tag 6 an.

Die Plasminaktivität stieg beginnend von einem Ausgangswert von 2 ± 1 OD/mg Kreatinin massiv an. Die maximale Aktivität von 271 ± 31 OD/mg Kreatinin wurde an Tag 8 gemessen. Damit stieg die Plasminaktivität um das fast 135-fache an.

3.1.6 Blutgasanalyse

	gesund	nephrotisch
	<i>wt</i>	<i>wt</i>
venöser pH	7,28 ± 0,01	7,30 ± 0,02
std HCO ₃ ⁻ [mM]	22 ± 0,40	24 ± 1,2
Na ⁺ [mM]	148 ± 1	138 ± 3 #
K ⁺ [mM]	4,70 ± 0,07	5,7 ± 0,21 #
Ca ⁺⁺ [mM]	1,10 ± 0,01	1,00 ± 0,02 #
Hct, %	47 ± 0	46 ± 3
cHbc [g/dl]	15,6 ± 0,2	15,3 ± 0,8

Table 7 : Experimentelles nephrotisches Syndrom – BGA

Erste Spalte: Gemessene BGA Parameter; Zweite Spalte: Parameter im Blut gesunder Wt-Mäuse an Tag 0 vor Doxorubicininjektion; Dritte Spalte: Parameter im Blut nephrotischer Wt-Mäuse an Tag 10; # p < 0,05 zu Tag 0

Während sich die meisten Werte unverändert zeigten, trat im Verlauf des nephrotischen Syndroms ein Abfall des Natriums von 148 ± 1 mM auf 138 ± 3 mM und ein Anstieg des Kaliums von 4,7 ± 0,1 mM auf 5,7 ± 0,2 mM auf. Auch das Bikarbonat erhöhte sich von 21 ± 0,40 mM auf 26 ± 1 mM.

3.1.7 Lipidämie

Klinisch fiel bei den nephrotischen Tieren eine massive Lipidämie im Plasma an Tag 10 auf, die mit bloßem Auge sichtbar war. Die obere Kapillare enthält das zentrifugierte Blut einer Maus mit nephrotischen Syndrom, die untere Kapillare enthält das Blut einer gesunden Maus.

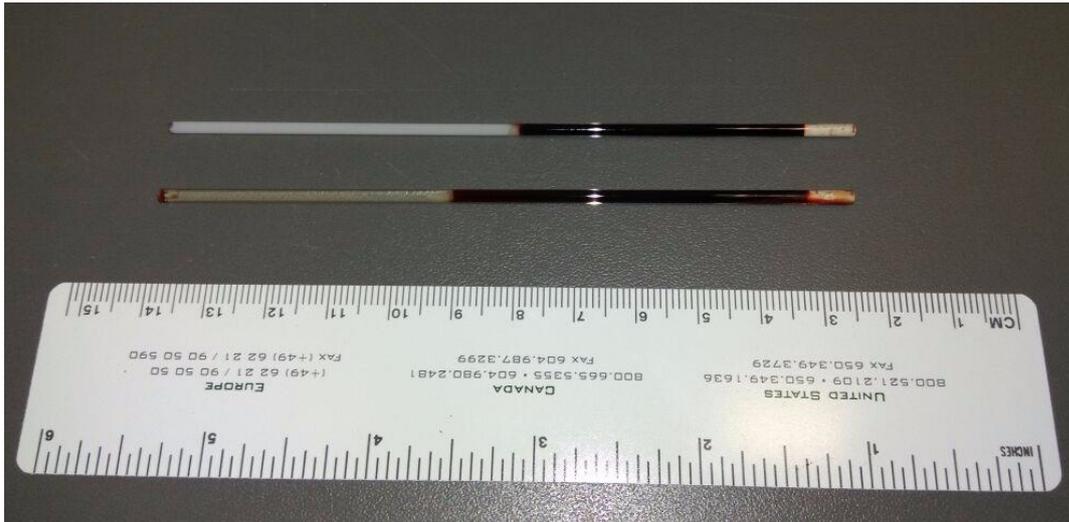


Abbildung 17 : Experimentelles nephrotisches Syndrom – Lipidämie

Obere Kapillare: Blut einer nephrotischen Maus mit massiver Lipidämie im Plasma; untere Kapillare: Blut einer gesunden Maus mit klarem Plasma

3.1.8 Zusammenfassung

Nach Induktion mit Doxorubicin konnte innerhalb von 10 Tagen das Vollbild eines nephrotischen Syndroms beobachtet werden. Die Mäuse präsentierten eine massiv gesteigerte Proteinurie, die an Tag 8 die nephrotische Schwelle von 120 mg/mg Kreatinin überschritt. Parallel dazu zeigte sich eine Hypalbuminämie an Tag 10. Außerdem trat eine deutliche Ödembildung verbunden mit einer vermehrten Natriumretention, mit einem Maximum an Tag 9 beziehungsweise Tag 10, auf. Zusätzlich stieg das Aldosteron im Plasma leicht an. Die uPA-Aktivität konnte im Urin im Verlauf vermehrt detektiert werden und es kam es zu einer Steigerung der Plasminaktivität. Der Plasmaharnstoff stieg ebenfalls im Verlauf an. Im Plasma zeigte sich klinisch eine deutliche Lipidämie.

3.2 Teilversuch 2: Amiloridbehandlung

3.2.1 Inhibition der Urokinaseaktivität *in vitro*

Zur Hemmung der uPA-Aktivität wurden die Inhibitoren Amilorid, UK 122 und Aprotinin untersucht und ihre Inhibitionsstärke mit Hilfe des Substrats 1322 bestimmt. Die uPA-Aktivität entstammte entweder einer Lösung mit 500 IE/ml humanem uPA (medac) oder Urin von gesunden Wildtyp-Mäusen.

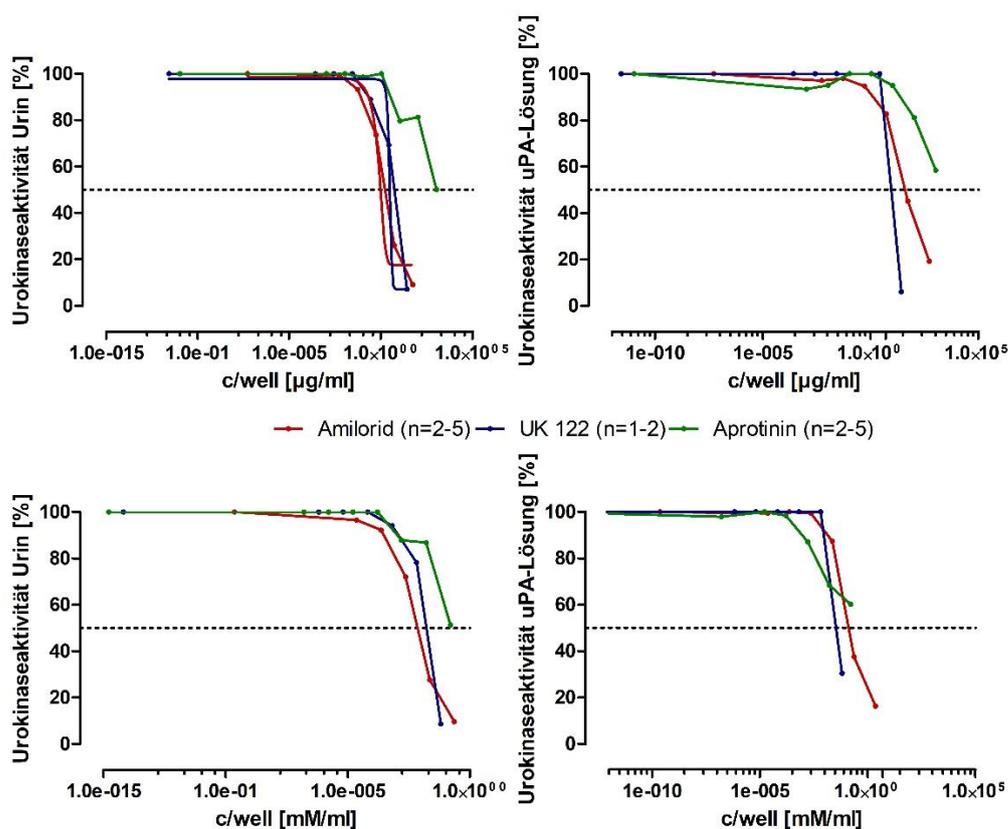


Abbildung 18 : In-vitro Inhibitionskurven

Links oben: Urokinaseaktivität in Prozent gemessen im Urin, inhibiert durch Amilorid, UK 122 und Aprotinin [µg/ml] ; Rechts oben: Urokinaseaktivität in Prozent gemessen in uPA 500 IE/ml Stammlösung, inhibiert durch Amilorid, UK 122 und Aprotinin [µg/ml]; Links unten: Urokinaseaktivität in Prozent gemessen im Urin, inhibiert durch Amilorid, UK 122 und Aprotinin [mM]; Rechts unten: Urokinaseaktivität in Prozent gemessen in uPA 500 IE/ml Stammlösung, inhibiert durch Amilorid, UK 122 und Aprotinin [mM]; Urokinaseaktivität in Prozent gestrichelte Linie bei 50%, n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

In den linken Abbildungen ist die Hemmung der Urokinase-Aktivität im Urin durch Amilorid, UK 122 und Aprotinin in der Konzentration µg/ml und in mM gezeigt. Die resultierenden IC₅₀-Werte lagen bei 1,4 µg/ml (Amilorid), 7,5 µg/ml (UK122) und 197,4 µg/ml (Aprotinin) bzw 0,006 mM/ml (Amilorid), 0,036 mM/ml (UK122)

Ergebnisse

und 0,066 mM/ml (Aprotinin). Allerdings inhibierte Aprotinin die Urokinase nicht vollständig.

In den rechten Abbildungen wurde die Hemmung der Urokinaseaktivität aus einer Stammlösung mit 500 IE/ml in der Konzentration $\mu\text{g/ml}$ und in mM/ml gemessen. Hierbei inhibierte UK 122 die Urokinase effektiver als Amilorid. Aprotinin hatte einen ähnlichen Inhibitionsverlauf wie in der ersten Abbildung. Die resultierenden IC_{50} -Werte lagen bei bei 28,1 $\mu\text{g/ml}$ (Amilorid), ca 222.489 $\mu\text{g/ml}$ (UK122) und 189,8 $\mu\text{g/ml}$ (Aprotinin) bzw 0,108 mM/ml (Amilorid), ca. 551 mM/ml (UK122) und 0,004 mM/ml (Aprotinin). Wieder inhibierte Aprotinin nicht vollständig.

3.2.2 Urinamilorid-Konzentration *in vivo*

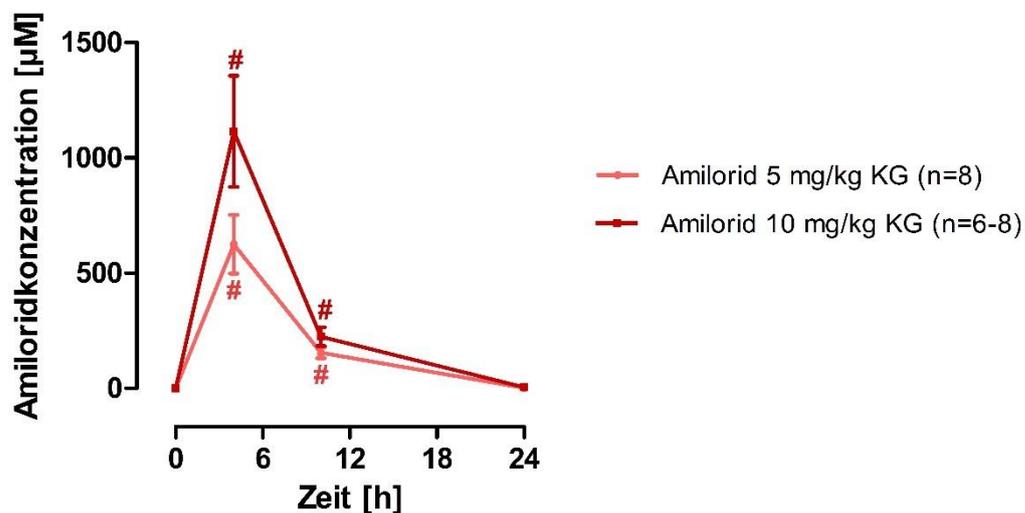


Abbildung 19 : Amiloridbehandlung – Urinamilorid [2]

Zeitlich Verlauf in Stunden – Amiloridkonzentration bei den Dosierungen 5 mg/kg KG und 10 mg/kg KG in μM ; # $p < 0,05$ zum Zeitpunkt der Injektion (0 h), n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Unter der Amiloriddosierung von 5 mg/kg KG zeigte sich ein Anstieg der Amiloridkonzentration im Urin mit einem Maximum von $625 \pm 127 \mu\text{M}$ 4 h nach Amiloridgabe. Unter der Dosierung von 10 mg/kg KG kam es zu einem Anstieg auf bis zu $1115 \pm 241 \mu\text{M}$ 4 h nach Amiloridgabe. Unter beiden Dosierungen war 24 h nach Gabe kein Amilorid im Urin mehr detektierbar.

Die beiden Dosierungen lagen größtenteils über der IC_{50} zur Hemmung der uPA-Aktivität und waren damit geeignet, *in vivo* eingesetzt zu werden, um die Effekte auf den Verlauf des nephrotischen Syndroms zu untersuchen.

3.2.3 Proteinurie und Plasma-Albumin-Konzentration

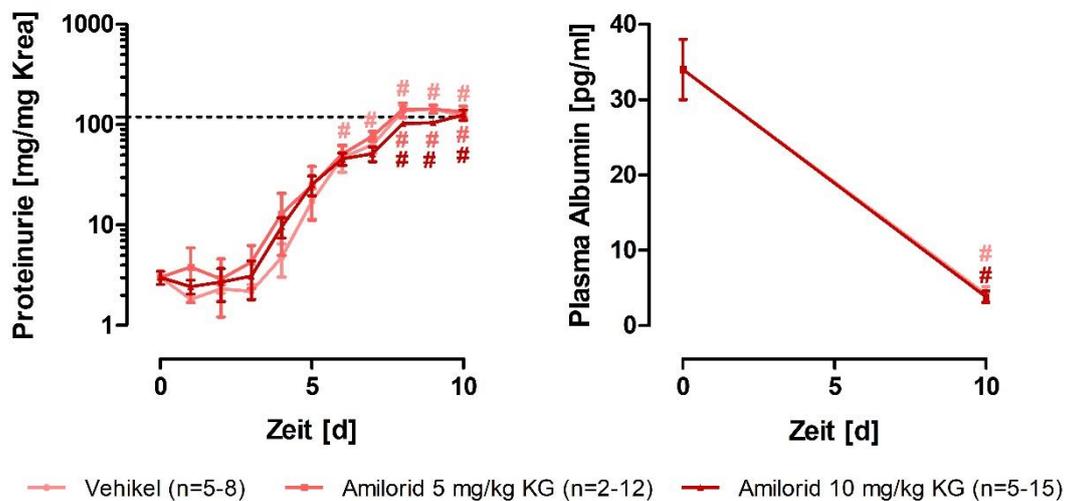


Abbildung 20: Amiloridbehandlung – Proteinurie und Plasma Albumin [2]

Links: Zeitlicher Verlauf der Proteinurie für das jeweilige Behandlungsschema in [mg/mg Krea]; gestrichelte Linie: Nephrotische Schwelle bei 120 mg/mg Krea; Rechts: Zeitlicher Verlauf der Albuminämie an Tag 0 und Tag 10; # $p < 0,05$ zu Tag 0; * $p < 0,05$ zu Vehikel am selben Tag, n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Die Proteinurie zeigte bei allen Behandlungsgruppen einen vergleichbaren Verlauf. Im gesunden Zustand zeigten die Tiere eine Proteinurie von 2 ± 0 mg/mg Kreatinin bei den Kontrolltieren, von 4 ± 3 mg/mg Kreatinin bei der Gruppe mit Behandlung von 5 mg/kg KG Amilorid und von 3 ± 1 mg/mg Kreatinin in der Behandlungsgruppe mit 10 mg/kg KG Amilorid. Ab Tag 3 kam es zu einem Anstieg der Proteinurie in allen Gruppen. An Tag 8 überschritten die Vehikelgruppe und die Tiere mit der Amiloriddosis 5 mg/kg KG die Schwelle von 120 mg/mg Kreatinin mit einer Proteinurie von 123 ± 23 mg/mg Kreatinin bei der Vehikelgruppe und einer Proteinurie von 143 ± 23 bei der Amiloriddosierung 5 mg/kg KG. Die Gruppe mit der Amiloridbehandlung 10 mg/kg KG überstieg die Schwelle von 120 mg/mg Kreatinin an Tag 10 mit einem Wert von 125 ± 15 mg/mg Kreatinin.

Die Plasmaalbuminkonzentration fiel in allen Behandlungsgruppen signifikant von einem initialen Plasmaalbumin von 34 ± 4 pg/ml an Tag 0 auf 4 ± 1 pg/ml an Tag 10 bei der Kontrollgruppe und auf 4 ± 1 pg/ml unter der Behandlung von 10 mg/kg KG Amilorid ab.

3.2.4 Gewicht

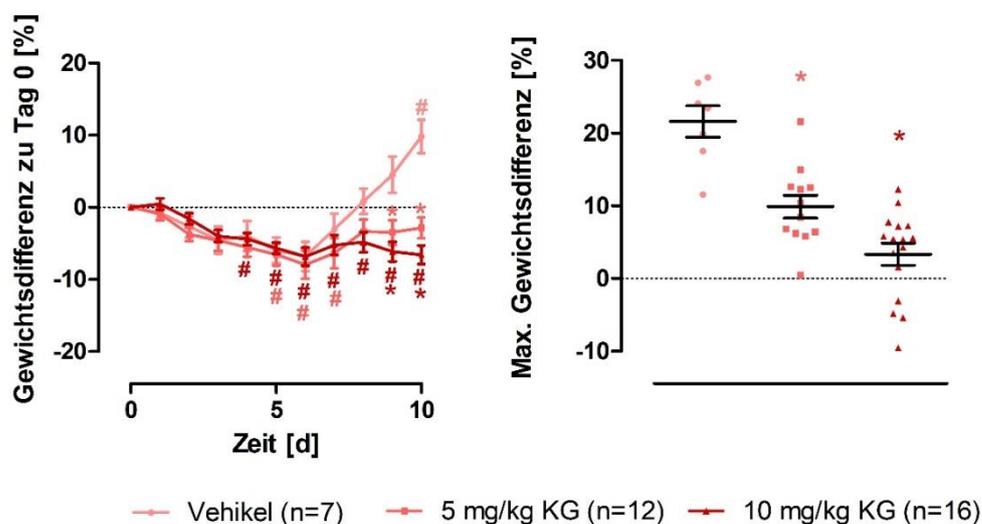


Abbildung 21: Amiloridbehandlung – Gewichtsverlauf [2]

Links: Gewichtsverlauf als Differenz zu Tag 0 in [%], gestrichelte Linie: Ausgangsgewicht; Rechts: Maximale Gewichts-differenz zwischen vorausgegangenem Minimum und Maximum in [%], gestrichelte Linie bei 0 %; # $p < 0,05$ zu Tag 0, * $p < 0,05$ zu Vehikel am selben Tag, n = Anzahl der jeden Tag gewogenen Mäuse

Alle Mäuse zeigten am Anfang des Versuches ein ähnliches Ausgangsgewicht von $28,84 \pm 0,82$ g (Vehikelgruppe), $27,50 \pm 1,01$ g (5 mg/kg KG Amilorid) und $27,44 \pm 0,69$ g (10 mg/kg KG Amilorid). Das Gewicht fiel bei allen Gruppen bis Tag 6 gleichermaßen ab. Bei der vehikelbehandelten Gruppe stieg das Gewicht ab Tag 6 bis zu einem Maximum an Tag 10 von $31,63 \pm 0,81$ g bzw. 10 ± 2 % an. Unter der Behandlung von 5 mg/kg KG Amilorid stieg das Gewicht auf $26,66 \pm 0,95$ g bzw. -3 ± 1 % an Tag 10 an. Die amiloridbehandelten Mäuse mit der Dosis 10 mg/kg KG verloren an Gewicht bis zu einem Endgewicht von $25,54 \pm 0,49$ g bzw. -7 ± 1 % an Tag 10. Allein die Vehikelgruppe zeigte im Verlauf einen signifikanten Gewichtsanstieg. Unter Amiloridbehandlung kam es zu einem signifikanten Gewichtsverlust.

Die maximale Gewichts-differenz zwischen Tag 6 und Tag 10 betrug in der Kontrollgruppe $6,69 \pm 0,96$ g bzw. 22 ± 2 %. Unter Amiloridbehandlung zeigte sich eine maximale Gewichts-differenz von $2,69 \pm 0,47$ g bei 5 mg/kg KG bzw. 10 ± 2 % und $0,90 \pm 0,43$ g bzw. 3 ± 2 % bei 10 mg/kg KG. Beide Amiloridbehandlungen zeigten eine signifikant niedrigere maximale Gewichts-differenz.

3.2.5 Natriurese

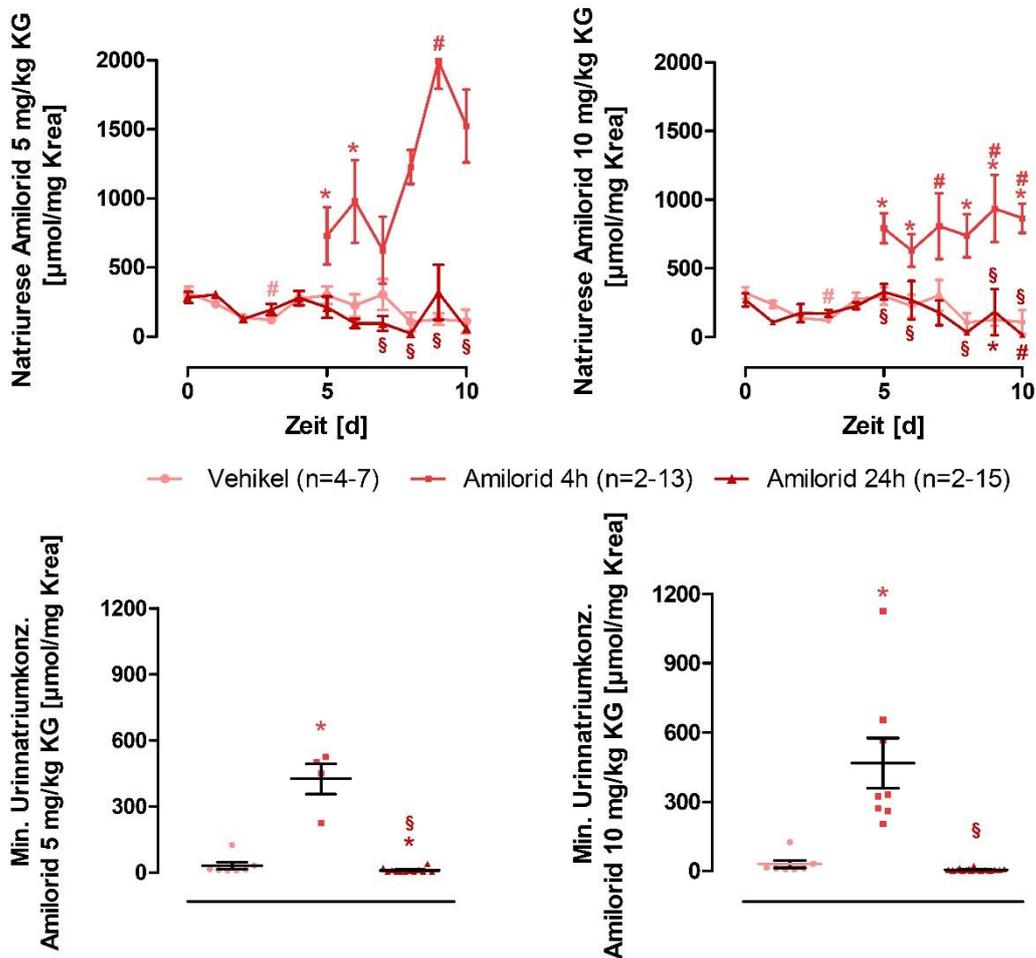


Abbildung 22 : Amiloridbehandlung – Natriurese [2]

Links oben: Zeitlicher Verlauf der Natriurese bei der Amiloridbehandlung 5 mg/kg KG in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Krea; Rechts oben: Zeitlicher Verlauf der Natriurese bei der Amiloridbehandlung 10 mg/kg KG in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Krea; Links unten: Minimale Natriumkonzentration gemessen zwischen Tag 5 und Tag 10 bei der Amiloridbehandlung 5 mg/kg KG in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Krea; Rechts unten: Minimale Natriumkonzentration gemessen zwischen Tag 5 und Tag 10 bei der Amiloridbehandlung 10 mg/kg KG in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Krea; * $p < 0,05$ zu Vehikel am selben Tag; # $p < 0,05$ zu Tag 0; § $p < 0,05$ zwischen 4h und 24h am selben Tag, n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Die Natriurese der Vehikelgruppe sank von einem Ausgangswert von 322 ± 43 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Kreatinin an Tag 0 bis zu einem Wert von 110 ± 87 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Kreatinin an Tag 10 ab. Die Natriurese, gemessen 24 h nach Amiloridgabe (5 mg/kg KG), sank nach Beginn der Amiloridgabe an Tag 5 auf 96 ± 33 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Kreatinin an Tag 6 bzw. auf 59 ± 25 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Kreatinin an Tag 10 ab.

Die Natriurese, gemessen 4 h nach Amiloridgabe (5 mg/kg KG), stieg hingegen hochsignifikant an. Von einem Ausgangswert von 731 ± 207 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Kreatinin

Ergebnisse

an Tag 5 zeigte sich ein Anstieg der Natriumkonzentration auf 1525 ± 265 $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin an Tag 10. Die Natriumausscheidung im 4 h Urin und im 24 h Urin waren an Tag 7 - 10 signifikant unterschiedlich.

Die Natriurese 24 h nach Amiloridbehandlung mit 10 mg/kg KG begann an Tag 0 mit 271 ± 49 $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin und sank auf 18 ± 4 $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin an Tag 10 ab.

Auch bei der Amiloriddosierung von 10 mg/kg KG stieg die Natriurese, gemessen 4 h nach Amiloridgabe, massiv an. Beginnend mit 271 ± 49 $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin an Tag 0 stieg die Natriumkonzentration bis Tag 10 auf 865 ± 106 $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin an. Die Werte zwischen dem 4 h Urin und dem 24 h Urin unterschieden sich signifikant an den Tagen 5, 6 und 8 – 10.

In der Kontrollgruppe fiel die Natriumkonzentration im Urin auf einen minimalen Wert von durchschnittlich 29 ± 14 $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin ab und auch jeweils 24 h nach Amiloridgabe in der Dosierung 5 mg/kg KG zeigte sich ein Minimum von im Mittel 10 ± 3 $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin. Die durchschnittliche minimale Natriumkonzentration 4 h nach Amiloridbehandlung mit 5 mg/kg KG lag hingegen bei 425 ± 69 $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin.

Auch unter der Behandlung mit einer Amiloriddosierung von 10 mg/kg KG zeigte sich ein signifikanter Unterschied der minimalen Natriumkonzentration zwischen den Messungen 4 h und 24 h nach Amiloridgabe. Die minimale Natriurese betrug durchschnittlich 467 ± 109 $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin 4 h nach Medikamentengabe bzw. 6 ± 1 $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin 24 h nach Amiloridgabe.

3.2.6 Plasma-Aldosteron und -Harnstoff-Konzentration

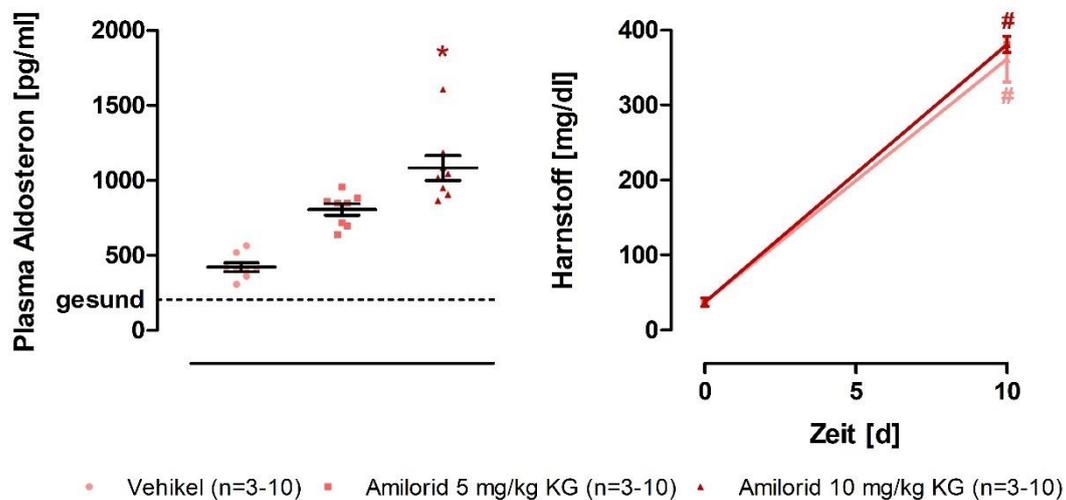


Abbildung 23 : Amiloridbehandlung – Plasma Aldosteron und Plasma Harnstoff [2]

Links: Aldosteronkonzentration im Plasma an Tag 10 [pg/ml]; * $p < 0,05$ zu Vehikel
 Rechts: Zeitlicher Verlauf der Harnstoffkonzentration im Plasma an Tag 0 und 10 [mg/dl]; # $p < 0,05$ zu Tag 0, * $p < 0,05$ zu Vehikel am selben Tag, n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Die Aldosteronkonzentration der Vehikelgruppe im Plasma betrug an Tag 10 422 ± 29 pg/ml. Unter Amiloridbehandlung zeigten die Mäuse einen deutlich höheren Wert von 805 ± 38 pg/ml unter der Dosis 5 mg/kg KG und 1083 ± 83 pg/ml unter der Amiloriddosis 10 mg/kg KG.

Der Anstieg des Harnstoffes im Plasma war bei der Kontrollgruppe und unter Amiloridtherapie (10 mg/kg KG) sehr ähnlich. Bei der Vehikelgruppe lag der Ausgangswert im Plasma bei 30 ± 4 mg/dl. Die Harnstoffkonzentration stieg auf 362 ± 31 mg/dl an Tag 10 an. Unter der Amiloriddosis 10 mg/kg KG zeigte sich ebenso ein signifikanter Anstieg auf 381 ± 11 mg/dl an Tag 10.

3.2.7 Urokinase- und Plasminaktivität im Urin

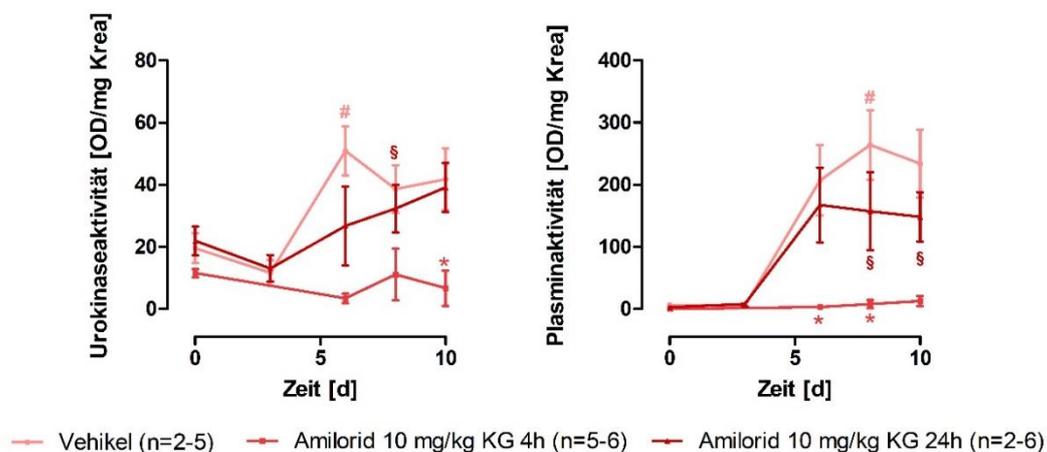


Abbildung 24: Amiloridbehandlung – Urokinase- und Plasminaktivität [2]

Links: Zeitlicher Verlauf der Urokinaseaktivität in [OD/mg Krea] gemessen im Urin; Rechts: Zeitlicher Verlauf der Plasminaktivität in [OD/mg Krea] gemessen im Urin; OD @ 405 nm; # p < 0,05 zu Tag 0; * p < 0,05 zu Vehikel am selben Tag; § p < 0,05 zwischen 4h und 24h am selben Tag, n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

In der Vehikelgruppe stieg die Urokinaseaktivität kontinuierlich an. Die Messung begann bei einem Wert von 20 ± 5 OD/mg Kreatinin an Tag 0 und verdoppelte sich bis Tag 10 auf 42 ± 10 OD/mg Kreatinin. Ebenso stieg die Urokinaseaktivität 24 h nach Amiloridgabe von 10 mg/kg KG von 22 ± 5 OD/mg Kreatinin an Tag 0 bis auf das Doppelte von 39 ± 8 OD/mg Kreatinin an Tag 10 an. Der Verlauf der Urokinaseaktivität 4 h nach Amiloridgabe hingegen zeigte einen Abfall. Von einem Anfangswert von 12 ± 1 OD/mg Kreatinin sank die Urokinaseaktivität auf einen Wert von 7 ± 6 OD/mg Kreatinin an Tag 10.

Auch der Verlauf der Plasminaktivität der Kontrollgruppe zeigte einen Anstieg um das 30-fache von 7 ± 0 OD/mg Kreatinin an Tag 0 auf 234 ± 54 OD/mg Kreatinin an Tag 10. Der Verlauf der Plasminaktivität 24 h nach Amiloridgabe (10 mg/kg KG) ähnelte dem der Vehikelgruppe mit einem Ausgangswert von 3 ± 0 OD/mg Kreatinin und einem 50-fachen Anstieg auf 148 ± 40 OD/mg Kreatinin an Tag 10. Der Wert der Plasminaktivität, gemessen 4 h nach Amiloridgabe blieb niedrig. An Tag 6, 4 h nach der zweiten Amiloridgabe, war die Plasminaktivität bei 3 ± 3 OD/mg Kreatinin. Bis Tag 10 stieg der Wert minimal auf 13 ± 8 OD/mg Kreatinin an.

3.2.8 Westernblot zur Untersuchung der Plasminogenkonversion

Die Westernblots zeigen das Verhältnis des intakten Plasminogen-Zymogens (105 kDa) und der schweren Kette (75 kDa), die nach Spaltung an Position Arg 561-Val562 [85] und Dissoziation der leichten Kette unter reduzierenden Bedingungen entsteht. Die Spaltung von Plasminogen im Urin ist ein Maß für die uPA-Aktivität.

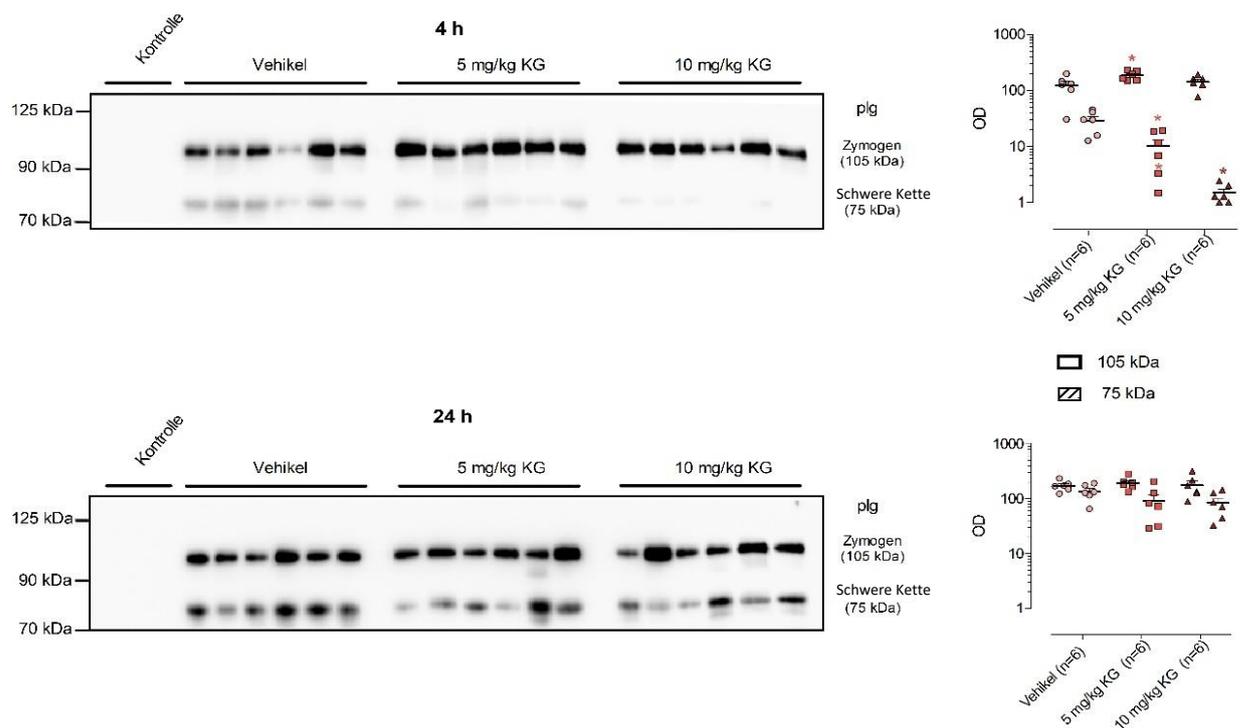


Abbildung 25 : Amiloridbehandlung – Plasmin Westernblot [2]
 Links oben: WB mit Urin 4 h nach Vehikelgabe und Amiloridgabe mit der Dosierung 5 mg/kg KG und 10 mg/kg KG; Rechts oben: Auswertung OD des WB mit 4h Urin; Links unten: WB mit Urin 24 h nach Vehikelgabe und Amiloridgabe mit der Dosierung 5 mg/kg KG und 10 mg/kg KG; Rechts unten: Auswertung OD des WB mit 24 h Urin; * $p < 0,05$ zu Vehikel am selben Tag; Herstellung und Auswertung erfolgte durch Matthias Wörn

Im Urin zeigte sich 4 h nach Verabreichung von Vehikel oder Amilorid 5 mg/kg KG bzw. 10 mg/kg KG mit zunehmender Amiloridkonzentration eine abnehmende Konversion von Plasminogen (105 kDa). Im Westernblot mit dem verwendeten anti-PiG Antikörper ließen sich hierbei zwei verschiedene Banden nachweisen. Zum einen gelang der Nachweis von Plasminogen bei 105 kDa, das in nephrotischem Urin Vehikel-behandelter Mäuse am geringsten und im Urin von Amilorid-behandelten Mäusen (10 mg/kg KG) am deutlichsten war. Umgekehrt verhielt es sich mit der zweiten Bande bei 75 kDa, die der schweren Kette des

Ergebnisse

Plasminogens entspricht und eine Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin belegt. Diese war bei den Vehikel-behandelten Mäusen am stärksten nachweisbar (29 ± 5 OD), wohingegen sich im Urin Amilorid-behandelter Mäuse nahezu keine Spaltung des Plasminogens nachweisen ließ (5 mg/kg KG: 10 ± 3 OD, 10 mg/kg KG: 1 ± 5 OD). Die leichte Kette von Plasmin ließ sich aufgrund des verwendeten Antikörpers in diesem Blot nicht nachweisen.

Im Westerblot mit Proben 24 h nach Amiloridgabe zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen.

3.2.9 Blutgasanalyse

	gesund	nephrotisch	nephrotisch
	<i>Vehikelbehandlung</i>	<i>Vehikelbehandlung</i>	<i>Amilorid 10 mg/kg KG</i>
venöser pH	7,28 ± 0,01	7,30 ± 0,02	7,30 ± 0,02
std HCO ₃ ⁻ , mM	22 ± 0,40	24 ± 1,2	23 ± 0,5
Na ⁺ , mM	148 ± 1	138 ± 3 #	145 ± 1 *
K ⁺ , mM	4,70 ± 0,07	5,7 ± 0,21 #	5,5 ± 0,31 #
Ca ⁺⁺ , mM	1,10 ± 0,01	1,00 ± 0,02 #	1,04 ± 0,03
Hct, %	47 ± 0	46 ± 3	46 ± 1
cHbc, g/dl	15,6 ± 0,2	15,3 ± 0,8	15,3 ± 0,4

Table 8 : Amiloridbehandlung BGA [2]

Erste Spalte: Gemessene BGA Parameter; Zweite Spalte: Parameter im Blut gesunder Mäuse an Tag 0 vor Doxorubicinjektion; dritte Spalte: Parameter im Blut nephrotischer Mäuse mit Vehikelbehandlung an Tag 10; vierte Spalte: Parameter im Blut nephrotischer Mäuse mit Amiloridbehandlung 10 mg/kg KG an Tag 10; # p < 0,05 zur gesunden Maus mit Vehikelbehandlung, * p < 0,05 zu Vehikel am selben Tag

Der pH-Wert der venösen BGA stieg im Verlauf des nephrotischen Syndroms leicht an. Das gemessene Bikarbonat erhöhte sich von 21 ± 0,50 mM bei gesunden Mäusen im Verlauf des nephrotischen Syndroms auf 26 ± 1 mM bei der Vehikelgruppe und auf 23 ± 0,5 mM in der amiloridbehandelten Gruppe. Der Natriumgehalt sank in der Vehikelgruppe von 148 ± 1 mM auf 138 ± 3 mM im Verlaufe des nephrotischen Syndroms ab, während er sich in der Gruppe unter Amiloridtherapie gleichbleibend bei 145 ± 1 mM zeigte. Das Kalium stieg ebenfalls im Verlauf des nephrotischen Syndroms von 4,70 ± 0,08 mM bei gesunden Tieren auf 5,7 ± 0,2 mM bei der Vehikelgruppe bzw. auf 5,5 ± 0,3 mM unter Amiloridtherapie an. Das Calcium, der Hämatokritwert und der Hämoglobinwert zeigten sich bei allen drei Gruppen auf einem ähnlichen Niveau.

3.2.10 Zusammenfassung

4 h nach Amilorid-Injektion erreichte die Amiloridkonzentration im Urin einen Höhepunkt und war nach 24 h nicht mehr nachweisbar. Während des nephrotischen Syndroms konnte bei der Vehikelgruppe bzw. unter Behandlung von 5 mg/kg KG und 10 mg/kg KG Amilorid an Tag 8 bzw Tag 10 gleichermaßen ein Anstieg der Proteinurie über 120 mg/g Kreatinin gezeigt werden. Parallel kam es zu einem Absinken des Plasmaalbumins. Die Mäuse der Vehikelgruppe nahmen massiv an Gewicht zu. Die Amiloriddosen 5 mg/kg KG und 10 mg/kg KG konnten die Ödementstehung teilweise bzw. vollständig verhindern. Bei den Mäusen mit Vehikelbehandlung kam es zu einer vermehrten Natriumretention. 4 h nach Amiloridgabe konnte die Natriumretention effektiv umgekehrt werden und es kam zu einer deutlichen Natriuresis. Die Urin-Urokinaseaktivität zeigte bei der Vehikelbehandlung eine ansteigende Tendenz. 24 h nach der Amiloridbehandlung (10 mg/kg KG) war die Urokinaseaktivität nur leicht vermindert. 4 h nach Amiloridgabe (10 mg/kg KG) konnte die Urokinaseaktivität effektiv gehemmt werden. Dies zeigte sich auch bei der Messung der Plasminaktivität. Während sich unter Vehikelbehandlung und 24 h nach Amiloridgabe (10 mg/kg KG) eine ähnlich hohe Plasminaktivität zeigte, war die Plasminaktivität 4 h nach Amiloridgabe (10 mg/kg KG) fast vollständig inhibiert. Dies war auch im Westernblot zu sehen. Aldosteron stieg bei der Dosierung 10 mg/kg KG bis Tag 10 auf das Zehnfach an, wohingegen es bei der Vehikelgruppe nur auf das Doppelte anstieg. Harnstoff stieg sowohl bei der Vehikelgruppe, als auch unter der Amiloriddosierung von 10 mg/kg KG gleichmaßen an.

3.3 Teilversuch 3: Auswirkung einer genetischen Deletion der Urokinase bei Mäusen

Im Folgenden werden die Wildtyp-Mäuse als $uPA^{+/+}$, die heterozygoten Mäuse mit $uPA^{+/-}$ und die Knockout-Mäuse mit $uPA^{-/-}$ bezeichnet.

3.3.1 Proteinurie und Plasma-Albumin-Konzentration

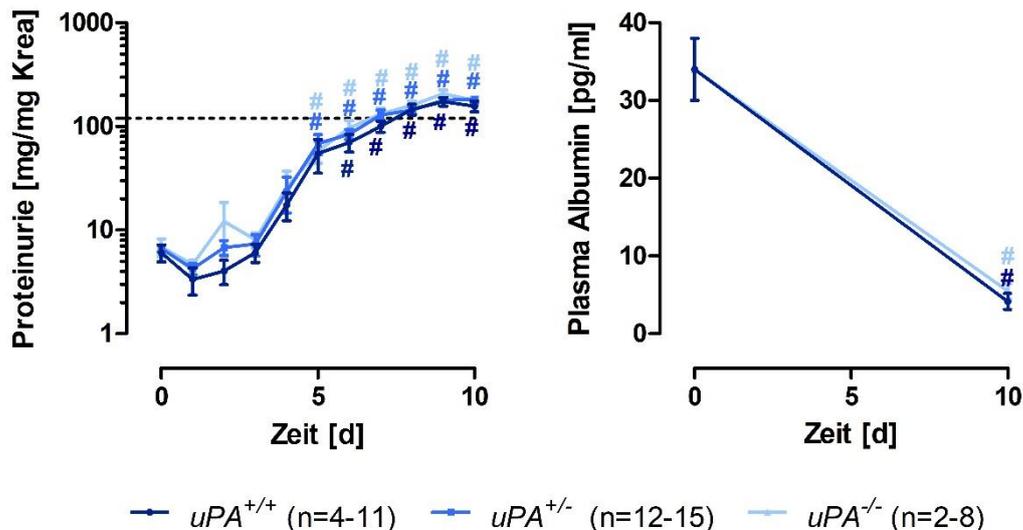


Abbildung 26 : uPA – Knockout – Proteinurie und Plasma Albumin [2]

Links: Zeitlicher Verlauf der Proteinurie in [mg/mg Krea] gestrichelte Linie: Nephrotische Schwelle von 120 mg/mg Krea; Rechts: Zeitlicher Verlauf des Plasma Albumins an Tag 0 und Tag 10; # $p < 0,05$ zu Tag 0; * $p < 0,05$ zu $uPA^{+/+}$ am selben Tag, n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Gemittelt war das Proteinurie-Niveau aller Versuchstiere gleich. Ausgehend von einem Wert von 6 ± 1 mg/mg Krea bei $uPA^{+/+}$ - Mäuse, 7 ± 1 mg/mg Kreatinin bei $uPA^{+/-}$ - Mäuse und 7 ± 1 mg/mg Kreatinin bei $uPA^{-/-}$ - Mäuse kam es zu einem gleichförmigen Anstieg der Proteinurie. Nach Überschreiten der nephrotischen Schwelle von 120 mg/mg Kreatinin an Tag 7 bzw. Tag 8 pendelten sich alle Genotypen auf ein ähnliches Proteinurieniveau ein. Die $uPA^{+/+}$ - Mäuse wiesen Werte von 157 ± 19 mg/mg Kreatinin, die $uPA^{+/-}$ - Mäuse von 183 ± 13 mg/mg Kreatinin und die $uPA^{-/-}$ - Mäuse von 178 ± 15 mg/mg Kreatinin auf. Sowohl bei $uPA^{+/+}$ -Mäusen, als auch bei $uPA^{-/-}$ - Mäusen zeigte sich gleichermaßen ein Abfall der Plasma-Albumin-Konzentration von 34 ± 4 pg/ml an Tag 0 auf 4 ± 1 pg/ml ($uPA^{+/+}$ - Mäuse) bzw. auf 6 ± 1 pg/ml ($uPA^{-/-}$ - Mäuse) an Tag 10. Die Werte an Tag 10 waren jeweils signifikant niedriger als die Ausgangswerte an Tag 0.

3.3.2 Gewicht

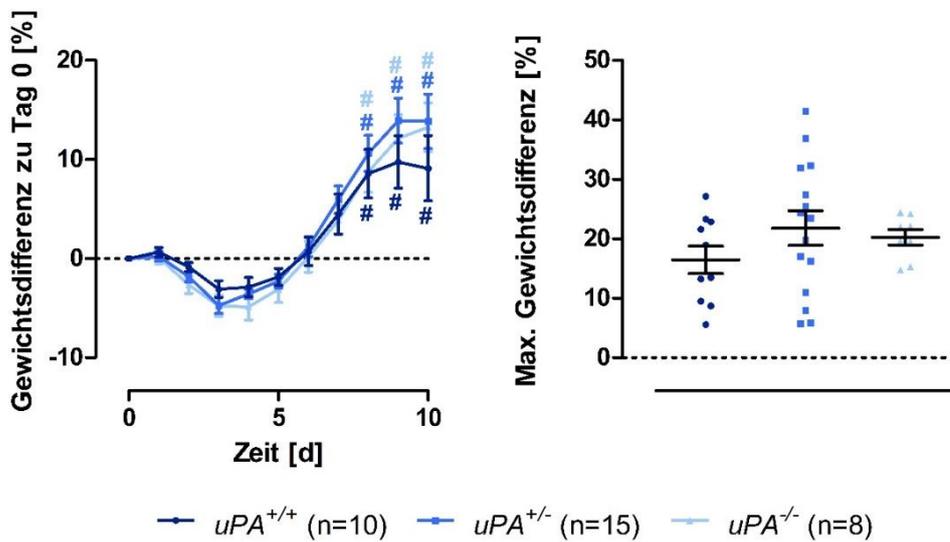


Abbildung 27 : uPA-Knockout – Gewicht [2]

Links: Gewichtsverlauf als Differenz zu Tag 0 in [%], gestrichelte Linie: Ausgangsgewicht; Rechts: Maximale Gewichts-differenz zwischen vorrausgegangenem Minimum und Maximum in [%]; # $p < 0,05$ zu Tag 0; * $p < 0,05$ zu $uPA^{+/+}$ am selben Tag, n = Anzahl der jeden Tag gewogenen Mäuse

Das mittlere Ausgangsgewicht der $uPA^{+/+}$ - Mäuse lag bei $23,39 \pm 0,77$ g, das Gewicht der $uPA^{+/-}$ - Mäuse bei $24,74 \pm 0,55$ g und das Gewicht der $uPA^{-/-}$ - Mäuse lag bei $24,76 \pm 0,97$ g. Nach einem anfänglichen Gewichtsverlust nach Doxorubicininjektion, stieg das Gewicht der Tiere gleichmaßen bis zu einem Maximum an Tag 9 bzw. 10 an. Die $uPA^{+/+}$ - Mäuse zeigten an Tag 9 ein Gewichtsmaximum von $25,68 \pm 1,06$ g bzw. 10 ± 3 %. Die $uPA^{+/-}$ - Mäuse erreichten ein Tag 9 ein Gewicht von $28,17 \pm 0,80$ g bzw. 14 ± 2 % des Ausgangsgewichts. Das Gewichtsmaximum der $uPA^{-/-}$ - Mäuse zeigte sich an Tag 10 mit einem Gewicht von $27,94 \pm 0,83$ g und einer Gewichts-differenz zu Tag 0 von 13 ± 2 %. Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede im Gewichtsanstieg.

Die maximale Gewichtszunahme war bei allen Genotypen vergleichbar. Sie lag für $uPA^{+/+}$ - Mäuse bei $3,86 \pm 0,55$ g bzw. 16 ± 2 %. Die $uPA^{+/-}$ - Mäuse und die $uPA^{-/-}$ - Mäuse zeigten eine mittlere Gewichtszunahme von $5,35 \pm 0,68$ g bzw. 22 ± 3 % ($uPA^{+/-}$) und $4,94 \pm 0,24$ g bzw. 20 ± 1 % ($uPA^{-/-}$).

3.3.3 Natriurese

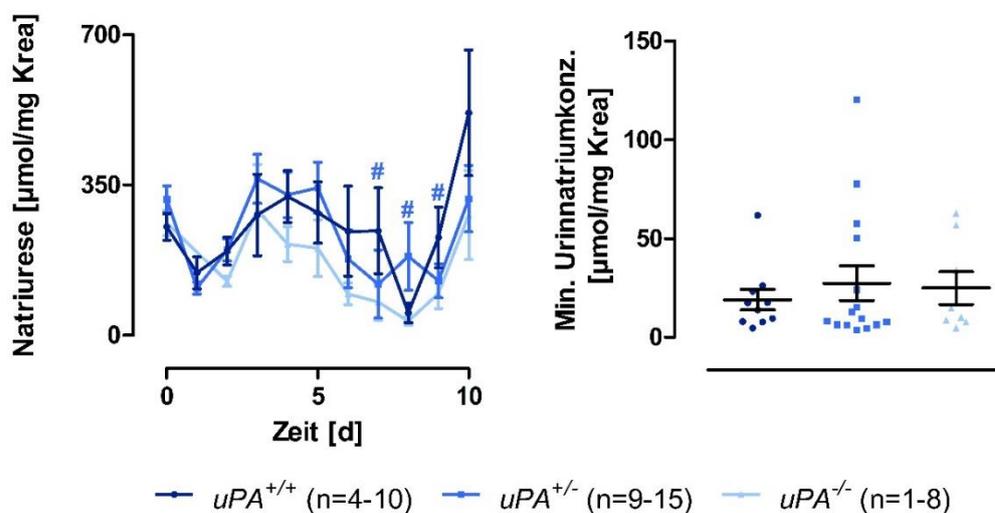


Abbildung 28 : uPA-Knockout – Natriurese [2]

Links: Zeitlicher Verlauf der Natriurese in $[\mu\text{mol/mg Krea}]$; Rechts: Minimale Natriumkonzentration gemessen zwischen Tag 5 und Tag 10 in $[\mu\text{mol/mg Krea}]$; # $p < 0,05$ zu Tag 0; * $p < 0,05$ zu $uPA^{+/+}$ am selben Tag, n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Bei allen Genotypen zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der mittleren Natriumausscheidung. Die Natriurese der $uPA^{+/+}$ - Mäuse betrug $253 \pm 31 \mu\text{mol/mg Kreatinin}$, die der $uPA^{+/-}$ - Mäuse $317 \pm 31 \mu\text{mol/mg Kreatinin}$ und die der $uPA^{-/-}$ - Mäuse $262 \pm 30 \mu\text{mol/mg Kreatinin}$ an Tag 0. Im Verlauf der ersten zwei Tage sank die Natriumexkretion leicht ab und stieg bis Tag 4 wieder auf das Ausgangsniveau. Ab Tag 4 kam es gleichermaßen zu einer vermehrten Natriumretention, so dass die Natriurese um Tag 7 bis 8 ihr Minimum fand. Die Natriumkonzentration im Urin betrug hierbei bei den $uPA^{+/+}$ - Mäusen an Tag 8 $52 \pm 22 \mu\text{mol/mg Kreatinin}$. Die $uPA^{+/-}$ - Mäuse hatten an Tag 7 ihre minimale Natriumkonzentration mit $119 \pm 80 \mu\text{mol/mg Kreatinin}$ und die $uPA^{-/-}$ - Mäuse zeigten ein Minimum ebenfalls an Tag 8 mit $33 \pm 10 \mu\text{mol/mg Kreatinin}$. Ab Tag 7 bzw. 8 stieg die Natriumausscheidung und es zeigte sich ein Anstieg bei allen Gruppen bis Tag 10.

Die mittleren, minimalen Natriumkonzentrationen betragen bei den $uPA^{+/+}$ - Mäusen $19 \pm 5 \mu\text{mol/mg Kreatinin}$, bei den $uPA^{+/-}$ - Mäusen $27 \pm 9 \mu\text{mol/mg Kreatinin}$ und bei den $uPA^{-/-}$ - Mäusen $25 \pm 8 \mu\text{mol/mg Kreatinin}$. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen.

3.3.4 Plasma-Aldosteron und -Harnstoff-Konzentration

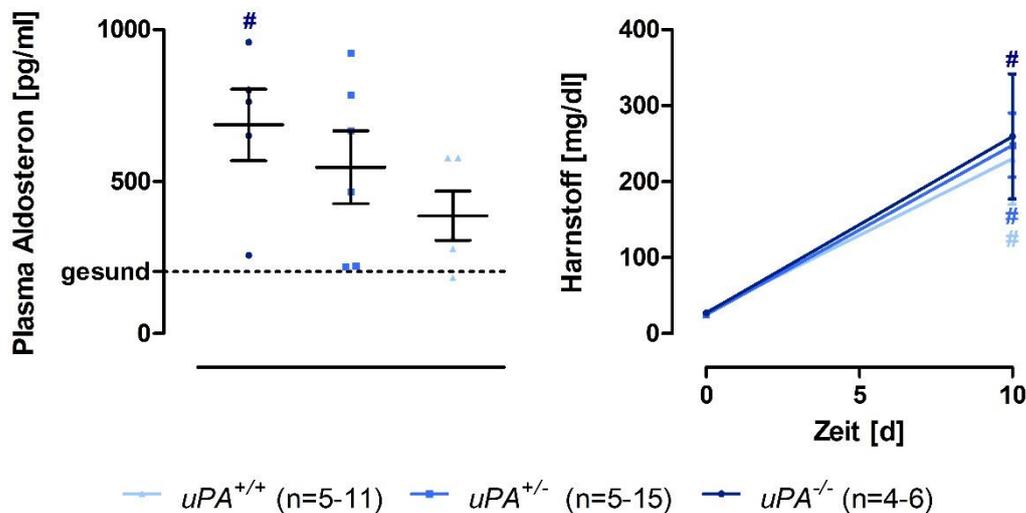


Abbildung 29 : *uPA*-Knockout – Plasma Aldosteron [2]

Links: Aldosteronkonzentration im Plasma an Tag 10 [pg/ml]; # $p < 0,05$ zu Tag 0; * $p < 0,05$ zu *uPA^{+/+}* am selben Tag; Rechts: Zeitlicher Verlauf der Harnstoffkonzentration im Plasma an Tag 0 und 10 [mg/dl]; # $p < 0,05$ zu Tag 0, n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Im Verlauf des nephrotischen Syndroms zeigten die *uPA^{+/+}*- Mäuse einen signifikant höheren Anstieg des Aldosterons im Plasma auf 687 ± 118 pg/ml im Vergleich zu 547 ± 120 pg/ml bei den *uPA^{+/-}*-Mäusen und 388 ± 81 pg/ml bei den *uPA^{-/-}* - Mäusen an Tag 10.

Die rechte Seite der Abbildung 29 zeigt den Verlauf der Harnstoffkonzentration im Plasma. Alle Genotypen starteten auf einem niedrigen Level. Die Harnstoffkonzentration betrug hierbei bei den *uPA^{+/+}*- Mäusen 29 ± 2 mg/dl, bei den *uPA^{+/-}* - Mäusen 25 ± 2 mg/dl und bei den *uPA^{-/-}* - Mäusen 28 ± 2 mg/dl. Der Harnstoff im Plasma stieg bis Tag 10 auf 230 ± 60 mg/dl bei *uPA^{+/+}*- Mäusen, auf 248 ± 42 mg/dl bei den *uPA^{+/-}* - Mäusen und auf 259 ± 82 mg/dl bei den *uPA^{-/-}* - Mäusen an. Zwischen den unterschiedlichen Genotypen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

3.3.5 Urokinase- und Plasminaktivität im Urin

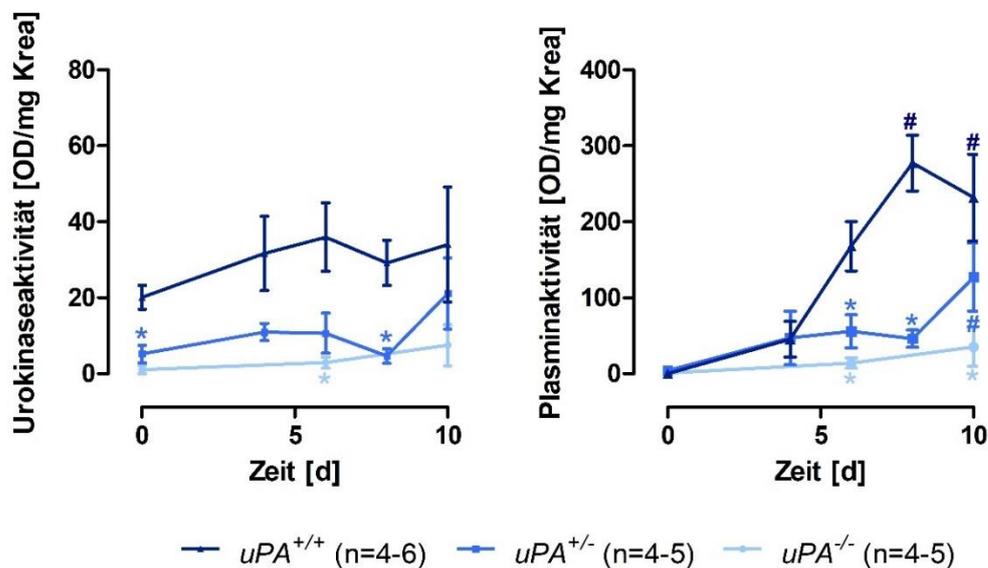


Abbildung 30 : *uPA*-Knockout - Urokinase- und Plasminaktivität [2]

Links: Zeitlicher Verlauf der Urokinaseaktivität in [OD/mg Krea] gemessen im Urin; Rechts: Zeitlicher Verlauf der Plasminaktivität in [OD/mg Krea] gemessen im Urin; OD @ 405 nm; # $p < 0,05$ zu Tag 0; * $p < 0,05$ zu *uPA*^{+/+} am selben Tag, n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Die Urokinaseaktivität im Urin stieg bei *uPA*^{+/+}- Mäusen von 22 ± 3 OD/mg Kreatinin an Tag 0 bis auf 34 ± 15 OD/mg Kreatinin an Tag 10 an. Bei den *uPA*^{+/-}- Mäusen lag die Urokinaseaktivität an Tag 0 bei 5 ± 2 OD/mg Kreatinin und stieg bis Tag 10 auf 21 ± 9 OD/mg Kreatinin an. Bei den *uPA*^{-/-}- Mäusen war eine minimale Aktivität von 1 ± 1 OD/mg Kreatinin an Tag 0 und 8 ± 5 OD/mg Kreatinin an Tag 10 detektierbar. Sowohl die Werte der *uPA*^{+/-}- Mäuse an Tag 6 und 8, als auch die Werte der *uPA*^{-/-}- Mäuse an Tag 6 und 10 waren signifikant niedriger als die Werte der jeweiligen *uPA*^{+/+}- Mäuse. Bei den *uPA*^{+/+}- Mäusen kam es zu einem starken Anstieg der Plasminaktivität im Urin von 0 OD/mg Kreatinin an Tag 0 auf ein Maximum von 277 ± 37 OD/mg Kreatinin an Tag 8. Die *uPA*^{+/-}- Mäuse zeigten eine deutlich niedrigere Plasminaktivität von 4 ± 4 OD/mg Kreatinin an Tag 0 und 127 ± 45 OD/mg Kreatinin an Tag 10. Die Plasminaktivität der *uPA*^{-/-}- Mäuse war nur minimal detektierbar bei Werten von 1 ± 1 OD/mg Kreatinin an Tag 0 bzw. 35 ± 26 OD/mg Kreatinin an Tag 10. Die Werte der *uPA*^{+/-}- Mäuse an Tag 6 und 8 und die Werte der *uPA*^{-/-}- Mäuse an Tag 6 sind signifikant niedriger als die jeweiligen Werte der *uPA*^{+/+}- Mäuse.

3.3.6 Westernblot zur Untersuchung der Plasminogenkonversion bei genetischer uPA-Defizienz

Die Bande bei 105 kDa entspricht dem Plasminogen-Zymogen, die Bande bei 75 kDa entspricht der schweren Kette.

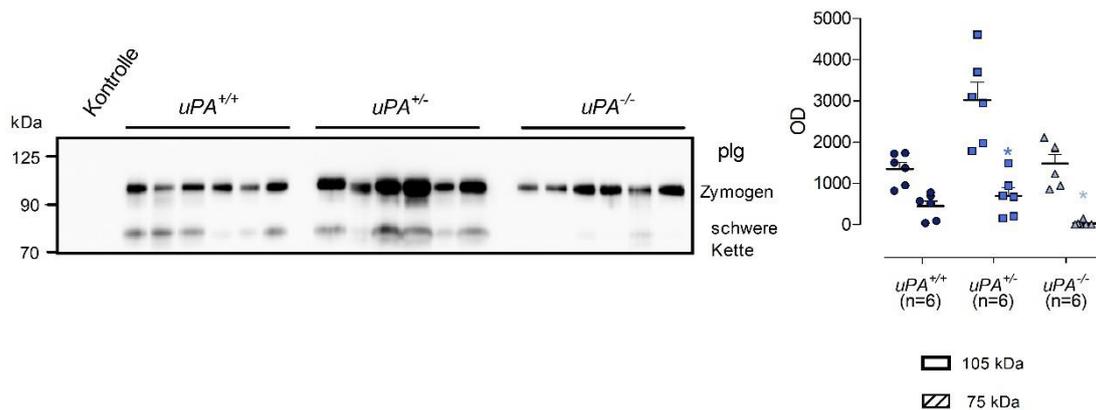


Abbildung 31 : uPA-Knockout - Plasmin Westernblot [2]

Links: WB mit Urin der *uPA*^{+/+} -, *uPA*^{+/-} - und *uPA*^{-/-} - Mäuse; Rechts: Auswertung OD des WB; * p < 0,05 zu *uPA*^{+/+} am selben Tag; Herstellung und Auswertung erfolgte durch Matthias Wörn

Im Kontrollurin gesunder Mäuse war Plasminogen nicht darstellbar. Bei den *uPA*^{+/+}- Mäusen war eine stärkere Bande bei 105 kDa und eine schwächere Bande bei 75 kDa zu erkennen. Bei der Auswertung des Urins der *uPA*^{+/-} - Mäuse zeigte sich eine starke Bande bei 105 kD und eine schwache Bande bei 75 kDa. Die *uPA*^{-/-} - Mäuse setzten eine minimale Menge an Plasminogen um. Entsprechend zeigte sich eine sehr starke Bande bei 105 kDa. Die untere Bande bei 75 kDa war kaum vorhanden.

Die rechte Seite der Abbildung 31 zeigt die berechnete optische Dichte des Westernblots und beschreibt die Verhältnisse der Banden bei 105 kDa und 75 kDa. Die OD der Bande bei 75 kDa der *uPA*^{+/+}- Gruppe lag bei 446 ± 128 die der *uPA*^{+/-} - Mäusen bei 692 ± 201 und die Bande der *uPA*^{-/-} - war mit 27 ± 23 kaum nachweisbar.

3.3.7 Blutgasanalyse

	gesund	nephrotisch	nephrotisch
	<i>uPA</i> ^{+/+}	<i>uPA</i> ^{+/+}	<i>uPA</i> ^{-/-}
venöser pH	7,28 ± 0,01	7,30 ± 0,02	7,30 ± 0,02
std HCO ₃ ⁻ , mM	22 ± 0,40	24 ± 1,2	25 ± 1,2
Na ⁺ , mM	148 ± 1	138 ± 3 #	143 ± 1 #
K ⁺ , mM	4,70 ± 0,07	5,7 ± 0,21 #	6,3 ± 0,55 #
Ca ⁺⁺ , mM	1,10 ± 0,01	1,00 ± 0,02 #	1,15 ± 0,06 *
Hct, %	47 ± 0	46 ± 3	40 ± 3
cHbc, g/dl	15,6 ± 0,2	15,3 ± 0,8	13,2 ± 1,0

Table 9 : *uPA*-ko – BGA [2]

Erste Spalte: Gemessene BGA Parameter; Zweite Spalte: Parameter im Blut gesunder *uPA*^{+/+} - Mäuse an Tag 0 vor Doxorubicininjektion; Dritte Spalte: Parameter im Blut nephrotischer *uPA*^{+/+} - Mäuse an Tag 10; vierte Spalte: Parameter im Blut nephrotischer *uPA*^{-/-} - Mäuse an Tag 10; # p < 0,05 zur gesunden *uPA*^{+/+} - Maus, * p < 0,05 zu *uPA*^{+/+} am selben Tag

Tabelle 9 zeigt die BGA-Analysen der verschiedenen Kohorten. In der zweiten Spalte werden die Werte gesunder Mäuse gezeigt, in der dritten Spalte sind die Werte nephrotischer *uPA*^{+/+} - Mäuse und in der vierten Spalte sind die BGA-Werte nephrotischer *uPA*^{-/-} - Mäuse gezeigt. Der venöse pH-Wert wurde im Verlauf des nephrotischen Syndroms leicht alkalisch. Das Bikarbonat stieg von 21 ± 0,40 mM leicht auf 26 ± 1 mM bei den nephrotischen *uPA*^{+/+} - Mäusen und auf 25 ± 1 mM bei den nephrotischen *uPA*^{-/-} - Mäusen an. Der Natriumgehalt sank in der *uPA*^{+/+} - Gruppe von 148 ± 1 mM auf 138 ± 3 mM ab, während er in der *uPA*^{-/-} - Gruppe während des nephrotischen Syndroms auf einem ähnlichen Niveau bei 143 ± 1 mM blieb. Das Kalium stieg ebenfalls im Verlauf des nephrotischen Syndroms von 4,70 ± 0,08 mM bei gesunden Tieren auf 5,7 ± 0,2 mM bei der nephrotischen *uPA*^{+/+} - Gruppe bzw. auf 6,3 ± 0,6 mM bei den *uPA*^{-/-} - Mäusen an. Das Calcium war durchgehend konstant mit Werten von 1,04 ± 0,01 mM und 1,00 ± 0,02 mM. Bei den *uPA*^{-/-} - Mäusen war das Calcium mit 1,15 ± 0,06 mM leicht erhöht. Der Hämatokritwert senkte sich leicht auf 46 ± 4 % bei den *uPA*^{+/+} - Mäusen ab. Die *uPA*^{-/-} - Mäuse zeigten einen deutlichen Hämatokritabfall auf 40 ± 3 %. Der Hämoglobinwert blieb bei beiden Gruppen auf einem ähnlichen Niveau. Bei den *uPA*^{-/-} - Mäusen sank dieser auf 13,2 ± 1,0 g/dl ab.

3.3.8 Langzeitüberleben

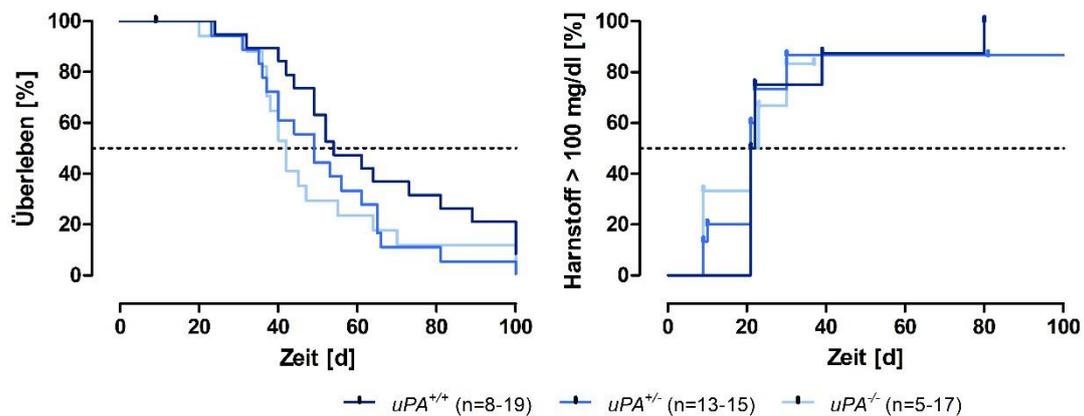


Abbildung 32 : uPA-Knockout – Langzeitüberleben und Verlauf Harnstoff

Links: Abbildung des Langzeitüberlebens über 100 Tage für $uPA^{+/+}$ -, $uPA^{+/-}$ - und $uPA^{-/-}$ - Mäuse in [%] $p=0,06$ (ns); Rechts: Abbildung des Verlaufes von Harnstoff mit dem Endpunkt Plasma Harnstoff > 100 [mg/dl] in [%] $p = 0,93$; \$ $p < 0,05$ zu $uPA^{+/+}$; n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Das Langzeitüberleben nephrotischer $uPA^{+/+}$ -, $uPA^{+/-}$ - und $uPA^{-/-}$ - Mäuse wurde über den Zeitraum von 100 Tagen beobachtet. Das mittlere Überleben der $uPA^{+/+}$ - Tiere lag bei 54 Tagen, das der $uPA^{+/-}$ - Mäuse bei 49 Tagen und das der $uPA^{-/-}$ - Mäuse bei 42 Tagen. In Abhängigkeit vom Genotyp zeigte sich in keiner der Gruppen ein Überlebensvorteil.

Auf der rechten Seite in Abbildung 32 ist der Anstieg des Plasmaharnstoffes im Verlauf gezeigt. Endpunkt war hier ein gemessener Harnstoff über 100 mg/dl. Dieser Endpunkt war im Mittel bei den $uPA^{+/+}$ - Mäusen nach 21 Tagen, bei $uPA^{+/-}$ - Mäusen ebenfalls nach 21 Tagen und bei $uPA^{-/-}$ - Mäusen nach 22 Tagen erreicht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

3.3.9 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Proteinurie bei allen Genotypen sehr ähnlich verlief und die Schwelle von > 120 mg/mg Kreatinin an Tag 7 bzw. Tag 8 überschritten wurde. Parallel dazu kam es bis Tag 10 zu einer Hypalbuminämie. Die $uPA^{+/+}$ - Mäuse zeigten den bekannten Urokinaseaktivitätsverlauf. Die $uPA^{+/-}$ - Mäuse zeigten nur ein Drittel bis ein Viertel der Urokinaseaktivität der $uPA^{+/+}$ - Mäuse und bei den $uPA^{-/-}$ - Mäusen konnten lediglich Spuren einer Aktivität gemessen werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Plasminaktivität. Die $uPA^{+/+}$ - Mäuse zeigten den bekannten Aktivitätsverlauf, wohingegen bei den $uPA^{+/-}$ - Mäusen nur die Hälfte der Plasminaktivität gemessen werden konnte. Bei den $uPA^{-/-}$ - Mäusen war eine minimale Aktivität detektierbar. Diese Ergebnisse konnten im Plasmin-Westernblot bestätigt werden. Es zeigte sich bei $uPA^{+/-}$ - Mäusen eine verminderte Konversion des Plasminogens in aktives Plasmin. Bei $uPA^{-/-}$ - Mäusen war keine Spaltung des Plasminogens zu sehen. Bei der Ödementstehung zeigten sich keine Unterschiede zwischen den $uPA^{+/+}$ -, den $uPA^{+/-}$ - und den $uPA^{-/-}$ - Mäusen. Auch bezüglich der Natriumretention zeigte sich bei den verschiedenen Genotypen kein Unterschied. Aldosteron zeigte im Plasma sowohl bei den $uPA^{+/+}$ -, als auch bei den $uPA^{-/-}$ - Mäusen einen ähnlichen Anstieg. Der ausgeschiedene Harnstoff nahm bei allen Genotypen gleichmaßen zu. In der BGA waren ein Kaliumanstieg und ein Hämatokritabfall bei den nephrotischen $uPA^{-/-}$ - Mäusen auffällig. Das Langzeitüberleben der drei Genotypen und der Harnstoffanstieg im Verlauf zeigten keine signifikanten Unterschiede.

3.4 Teilversuch 4: Amiloridbehandlung der $uPA^{-/-}$ - Mäuse

3.4.1 Urinamilorid-Konzentration

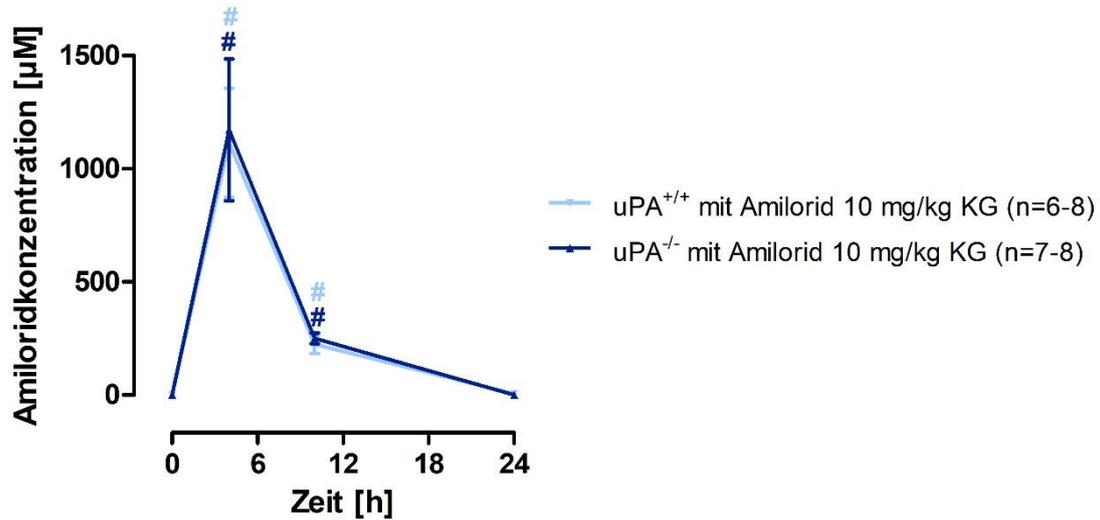


Abbildung 33: Amiloridbehandlung der $uPA^{-/-}$ - Maus – Urinamilorid [2]

Zeitlich Verlauf in Stunden – Amiloridkonzentration der Dosierung 10 mg/kg KG bei $uPA^{+/+}$ -Mäuse und $uPA^{-/-}$ -Mäusen in [µM]; # $p < 0,05$ zum Zeitpunkt der Injektion (0 h), n=Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Unter der Amiloriddosierung von 10 mg/kg KG zeigte sich sowohl bei $uPA^{+/+}$ -Mäusen, als auch bei $uPA^{-/-}$ - Mäuse gleichermaßen ein Anstieg der Amiloridkonzentration im Urin mit einem Maximum von 1115 ± 241 µM bei $uPA^{+/+}$ -Mäusen bzw. 1172 ± 313 µM bei $uPA^{-/-}$ - Mäusen 4 h nach Amiloridgabe. Bei beiden Genotypen war 24 h nach Gabe kein Amilorid im Urin mehr detektierbar.

3.4.2 Proteinurie

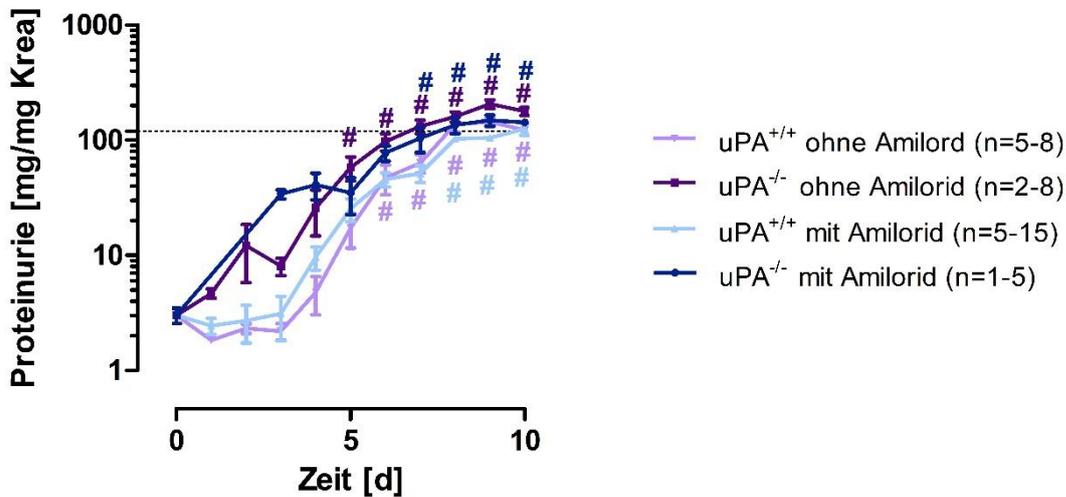


Abbildung 34: Amiloridbehandlung der *uPA*^{-/-} - Maus – Proteinurie [2]

Zeitlicher Verlauf der Proteinurie in [mg/mg Krea] gestrichelte Linie: Proteinurieschwelle von 120 mg/mg Krea; # $p < 0,05$ zu Tag 0; * $p < 0,05$ zu *uPA*^{+/+} am selben Tag, n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Gemittelt war das Proteinurieniveau aller Versuchstiere gleich. Ausgehend von einem annähernd gleichen Proteinurielevel an Tag 0 stieg die Proteinurie bei allen Gruppen gleichermaßen an.

Die *uPA*^{-/-} Mäuse ohne Amiloridbehandlung überschritten die Schwelle von 120 mg/mg Kreatinin an Tag 7 mit 132 ± 18 mg/mg Kreatinin. Die *uPA*^{+/+}-Gruppe ohne Amiloridbehandlung und die *uPA*^{-/-} Mäuse mit Amiloridtherapie (10 mg/kg KG) überschritten die Schwelle an Tag 8 mit einer Proteinurie von 137 ± 20 mg/mg Kreatinin beziehungsweise 136 ± 22 mg/mg Kreatinin. Die Gruppe der *uPA*^{-/-} Mäuse ohne Amiloridbehandlung zeigte eine Überschreitung der Proteinurieschwelle an Tag 10 mit einer Proteinurie von 125 ± 15 mg/mg Kreatinin.

Bis Tag 10 pendelten sich alle Gruppen auf ein ähnliches Proteinurieniveau ein. Die *uPA*^{+/+} Mäuse ohne Amilorid lagen dann bei einem Wert von 123 ± 6 mg/mg Kreatinin, die *uPA*^{+/+} Mäuse mit Amiloridbehandlung bei 125 ± 15 mg/mg Kreatinin, die *uPA*^{-/-} Mäuse ohne Amilorid bei 178 ± 15 mg/mg Kreatinin und die *uPA*^{-/-} Mäuse mit Amiloridbehandlung bei 142 ± 8 mg/mg Kreatinin.

3.4.3 Gewicht

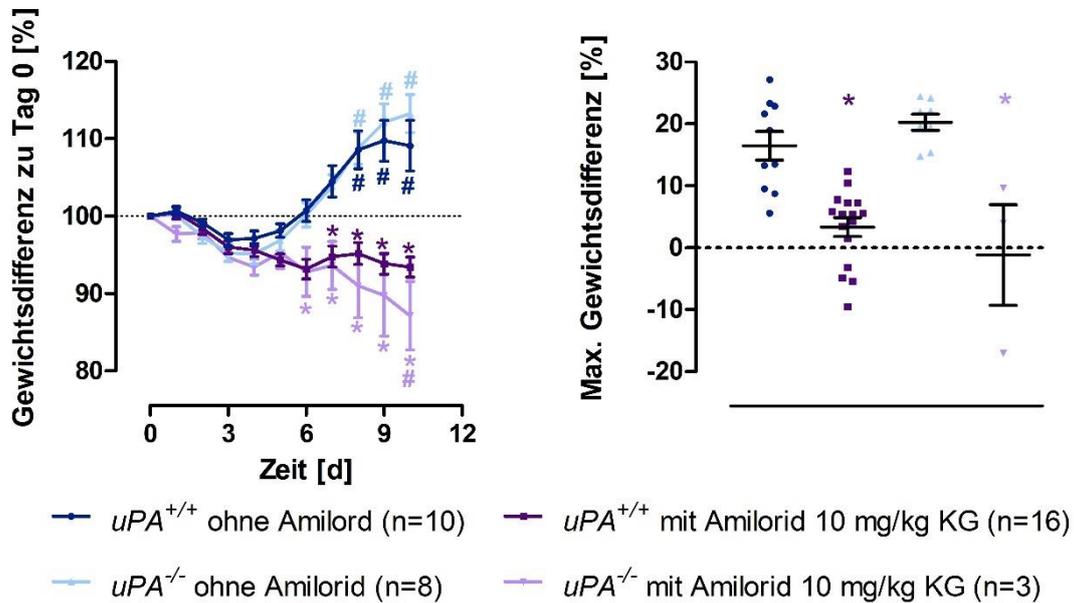


Abbildung 35: Amiloridbehandlung der *uPA*^{-/-} - Maus – Gewicht [2]

Links: Gewichtsverlauf als Differenz zu Tag 0 in [%], gestrichelte Linie: Ausgangsgewicht; Rechts: Maximale Gewichtsänderung zwischen vorrausgegangenem Minimum und Maximum in [%]; # $p < 0,05$ zu Tag 0, * $p < 0,05$ zu *uPA*^{+/+} am selben Tag, n = Anzahl der jeden Tag gewogenen Mäuse

Auf der linken Seite von Abbildung 35 ist die Gewichtsänderung zu Tag 0 gezeigt. Die Ausgangsgewichtsänderung aller Gruppen ist jeweils 0 %. Die *uPA*^{+/+}- Mäuse hatten an Tag 9 ein Maximum von $25,68 \pm 1,06$ g bzw. 10 ± 3 %, während das Gewichtsmaximum der *uPA*^{-/-} - Mäuse an Tag 10 $27,94 \pm 0,83$ g bzw. 13 ± 2 % betrug. Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Gewichtsanstieges. Die amiloridbehandelten Mäuse mit der Dosis 10 mg/kg KG verloren an Gewicht und nahmen ab Tag 6 nicht mehr zu. An Tag 10 hatten sie ein Gewicht von $25,54 \pm 0,49$ g bzw. -7 ± 1 %. Die *uPA*^{-/-} - Mäuse, die mit Amilorid in einer Dosierung von 10 mg/kg KG behandelt wurden, hatten ein Anfangsgewicht von $30,78 \pm 1,33$ g. Analog zu den *uPA*^{+/+}- Mäusen verloren die *uPA*^{-/-} - Mäusen bis Tag 6 ähnlich viel Gewicht. Ab Tag 6 verringerte sich ihr Gewicht erneut massiv bis zu einem Minimum von $25,40 \pm 0,78$ g bzw. -18 ± 3 % an Tag 10. Die Gewichtsverläufe der Tiere unter Amiloridtherapie waren an Tag 7, 8, 9 und 10 bei den *uPA*^{+/+}- Mäusen und an Tag 6, 7, 8, 9 und 10 bei den *uPA*^{-/-}

Ergebnisse

$^{-}$ - Mäusen signifikant niedriger als bei der Vergleichsgruppe der $uPA^{+/+}$ - Mäuse ohne Amiloridtherapie.

Auf der rechten Seite ist die maximale Gewichtsänderung in Prozent gezeigt. Diese betrug bei den $uPA^{+/+}$ - Mäusen ohne Amiloridbehandlung 16 ± 2 %. Eine ähnliche Gewichtsänderung zeigte sich bei den $uPA^{-/-}$ - Mäusen ohne Amiloridbehandlung mit 20 ± 1 %. Die $uPA^{+/+}$ - Mäuse mit Amiloridbehandlung waren signifikant niedriger als die Vergleichsgruppe der $uPA^{+/+}$ - Mäuse ohne Behandlung mit 3 ± 2 %, ebenso wie die $uPA^{-/-}$ - Mäuse unter Amiloridbehandlung mit -1 ± 8 %.

3.4.4 Plasma-Aldosteron-Konzentration

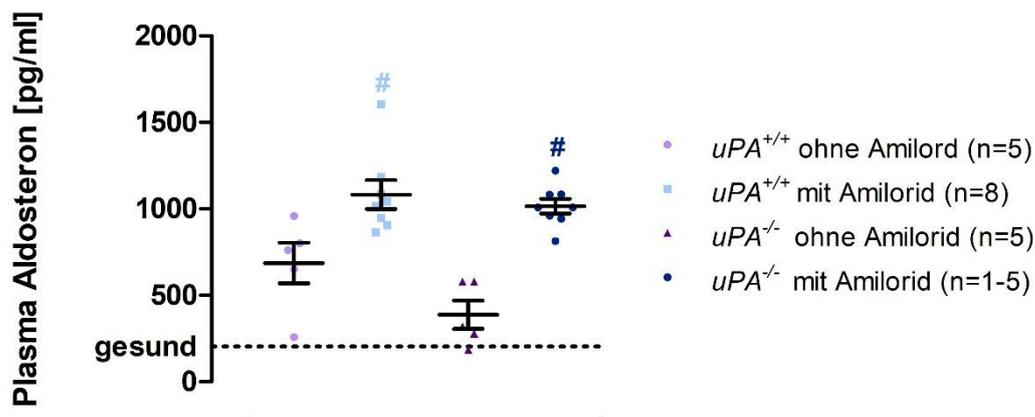


Abbildung 36: Amiloridbehandlung der $uPA^{-/-}$ - Maus – Plasma Aldosteron [2]

Zeitlicher Verlauf der Aldosteronkonzentration im Plasma an Tag 0 und Tag 10 [pg/ml] ; # $p < 0,05$ zu Tag 0; * $p < 0,05$ zu $uPA^{+/+}$ ohne Amilorid am selben Tag, n = Anzahl der an dem jeweiligen Tag gemessenen Probe

Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Aldosteronkonzentration im Plasma. Das Plasma-Aldosteron der Vehikelgruppe stieg von einem Ausgangswert von 202 ± 32 pg/ml an Tag 0 auf 566 ± 184 pg/ml an Tag 10 signifikant an. Die Mäuse, die mit 10 mg/kg KG Amilorid behandelt wurden, zeigten einen deutlichen Anstieg der Aldosteronkonzentration auf 2213 ± 612 pg/ml an Tag 10. Auch bei den $uPA^{-/-}$ - Mäusen ohne Amiloridbehandlung kam es zu einem leichten Anstieg auf 388 ± 81 pg/ml an Tag 10. Die $uPA^{-/-}$ - Mäuse mit Amiloridbehandlung zeigten einen signifikanten Anstieg der Plasmaaldosteronkonzentration auf 1015 ± 42 pg/ml an Tag 10. Dieser Anstieg war ebenfalls signifikant.

3.4.5 Zusammenfassung

Alle Mäuse zeigten den für das nephrotische Syndrom im Mausmodell typischen Proteinurieverlauf. Die $uPA^{+/+}$ - Mäuse und die $uPA^{-/-}$ - Mäuse ohne Amiloridbehandlung zeigten eine für das nephrotische Syndrom typische Gewichtszunahme. Im Gegensatz dazu stagnierte der Gewichtsverlauf unter Amiloridbehandlung (10 mg/kg KG) gleichermaßen bei beiden Genotypen. Die $uPA^{-/-}$ - Mäuse verloren unter Amiloridtherapie sogar an Gewicht. Das Plasmaaldosteron stieg ebenfalls bei beiden Genotypen unter Amiloridtherapie signifikant an, im Gegensatz zu Mäusen beider Genotypen ohne Amiloridbehandlung.

4 Diskussion

4.1 Mausmodell

Für die Untersuchung des nephrotischen Syndroms wurde das Doxorubicin-Mausmodell verwendet. Es basiert auf der Podozytentoxizität durch Doxorubicin und ist auf bestimmte Mauslinien beschränkt [69]. Der von uns verwendete Mausstamm 129 S1/SvImJ ist sensibel auf Doxorubin. Mit einer Doxorubicindosis von 7,25 µg/g KG bei männlichen Mäusen, bzw. 6,8 µg/g KG bei weiblichen Mäusen konnte eine derartige Nierenschädigung erreicht werden, dass die Mäuse klinisch die Symptome eines nephrotischen Syndroms zeigten [69].

Studienmodelle an Tieren, insbesondere an Maus und Ratte sind sehr gut geeignet, um das nephrotische Syndrom zu untersuchen. Sie bieten neben der raschen Reproduktion der Versuchstiere, sowie die Möglichkeit, das Genom zu verändern, auch den Vorteil der schnellen Induktion des nephrotischen Syndroms [86].

Doxorubicin, welches in diesem Versuchsaufbau verwendet wurde, gehört zur Wirkstoffgruppe der Anthrazykline [86]. Es wird bei Dosen zwischen 5 und 20 µg/g KG zu ungefähr 34 % über die Galle und zu 6-8 % über den Urin ausgeschieden [87]. Hierbei kommt es zu einer Akkumulation des Doxorubicin in der Niere, die so zu der Nephrotoxizität bei empfänglichen Nagern führen kann [88]. Dabei wird beim Mausstamm 129 S1/SvImJ ein Podozytenschaden verursacht, der beim Menschen nicht auftritt. Im Doxorubicin-Maus-Modell zeigt sich als erstes Symptom eine Proteinurie mit Albuminurie. Die Nierenschädigung durch Doxorubicin wird als sehr ähnlich zur Schädigung bei einer FSGS beim Menschen beschrieben [89-91]. Im Bezug auf die Induktion des nephrotischen Syndroms zeigt sich eine starke Dosis-Wirkungsbeziehung des Doxorubicins [92]. Eine einmalige Injektion reicht bereits aus, um das nephrotische Syndrom zu initiieren [69].

Die gewebetoxische Wirkung des Doxorubicins ist als Nachteil zu werten, sie kann zu paravaskulären Gewebnekrosen führen [70]. Der alternative

Diskussion

Applikationsweg in eine Schwanzvene zeigt ähnliche histopathologische Gewebsveränderungen, führt aber seltener zum erwünschten Effekt der Induktion des nephrotischen Syndroms (66% vs. 100%) [70].

Leichte Dosisveränderungen von Doxorubicin verursachen bereits ein chronisches, beziehungsweise akutes Nierenversagen [7]. Dies geschieht bei Dosisänderungen von 0,5 µg/g KG und ist mit der totalen Bioverfügbarkeit durch i.v. Injektion zu erklären [89].

Es zeigt sich eine erhöhte Toxizität des Doxorubicins in hochproliferativen Geweben, wie dem Knochenmark, dem Magendarmtrakt und in Gonadengewebe [86]. Weiterhin zeigte sich 24 h nach Injektion eine starke Gewichtsabnahme, die für mehrere Tage anhält. Mögliche Ursachen für den Gewichtsverlust sind orale Mukosaläsionen, beziehungsweise eine generelle Inappetenz. Diese wurden durch regelmäßige Gewichtskontrollen der Tiere und des verbleibenden Futters quantifiziert [86].

Nach Abwägen aller Vor- und Nachteile erschien das Doxorubicin-Modell als ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Urokinase im experimentellen nephrotischen Syndrom der Maus. Für die verwendete Mauslinie 129 S1/SvImJ existiert bezüglich des nephrotischen Syndroms eine breite Datenlage und ist das einzige Mausmodell, bei der eine Natriumretention beschrieben ist [2, 42, 69, 71]. Die Methodik der Spritztechnik ist erprobt und wird seit Jahren im Labor unserer Forschungsgruppe praktiziert [70, 71].

Um die Rolle der Urokinase im experimentellen nephrotischen Syndrom zu untersuchen, eignete sich neben dem pharmakologischen Ansatz auch ein Knockout-Modell. Durch einen milden Phänotyp der homozygoten Knockout-Maus gab es keine Einschränkungen hinsichtlich der Aussagekraft der Experimente [57].

4.2 Experimentelles nephrotisches Syndrom im Mausmodell

Das nephrotische Syndrom wurde am Doxorubicin-Mausmodell untersucht. Hierbei zeigte sich ein analoger Symptomkomplex zwischen Maus und Mensch.

Laborchemisch war eine massiv gesteigerte Proteinurie, die an Tag 7 die Schwelle von 120 mg/mg Kreatinin überschritt, nachweisbar, sowie eine, sich parallel dazu entwickelnde, Hypalbuminämie. Zusätzlich zeigte sich bei der Überschreitung der Proteinurieschwelle von 120 mg/mg Kreatinin eine deutliche Ödembildung mit einer Gewichtszunahme von durchschnittlich 16%. Diese war verbunden mit einer vermehrten Natriumretention, bis hin zu einer minimalen Natriumkonzentration im Urin von nur 19 µmol/mg Kreatinin. Als Folge zeigte sich eine gesteigerte Aldosteronausschüttung um fast das Dreifache. Aufgrund der Nierenschädigung kam es zu einem Plasmaharnstoffanstieg um das Doppelte im Verlauf. Im Plasma zeigte sich klinisch eine Lipidämie. Im Urin konnte im Verlauf eine vermehrte uPA-Aktivität mit konsekutiver Steigerung der Plasminaktivität detektiert werden.

Die gemessenen Parameter ähneln in ihrer Gesamtheit sehr dem nephrotischen Syndrom des Menschen und sind so eine passende Grundlage zur Erforschung des nephrotischen Syndroms [69]. Auch beim Patienten zeigt sich eine deutliche Proteinurie von > 3,5 g [4]. Analog zu den Tierexperimenten muss auch beim Patienten eine Proteinurieschwelle überschritten werden, um die fulminante Ausprägung eines nephrotischen Syndroms zu erreichen [93]. Durch den deutlichen erhöhten Verlust großmolekularer Proteine, vor allem Albumin, kommt es sowohl beim Menschen, als auch bei der Maus zu einer Hypalbuminämie [93]. Die Lipidämie, die sich bei der Blutentnahme der Mäuse optisch, wie zu sehen in Abbildung 17, darstellte zeigt sich beim Patienten laborchemisch als Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie [4]. Ödeme beim Patienten präsentieren sich unterschiedlich stark, je nach Ätiologie des auslösenden Krankheitsbildes [93].

4.3 Theorie der Ödementstehung im experimentellen nephrotischen Syndrom der Maus

Wir konnten zeigen, dass es bei nephrotischen Mäusen zu einem Aldosteronanstieg, sowie zu einer vermehrten Natriumresorption während des nephrotischen Syndroms kam. Dies kann eine Folge der Hypovolämie, bedingt durch einen verringerten intravasalen onkotischen Druck, sein. Als Folge käme

Diskussion

es zu einer vermehrten Ausschüttung von Vasopressin und Aldosteron, die konsekutiv in einer vermehrten Natrium- und Wasserretention in der Niere resultiert. Dies würde zur Ödementstehung führen [41] und entspräche der Underfill-Theorie als Erklärungsversuch der Ödementstehung.

Ein weiterer Mechanismus zur Ödementstehung ist die Overfilltheorie. Hierbei kommt es durch eine ENaC-Aktivierung, bedingt durch frei filtrierte aktive Serinproteasen wie Plasmin, zu einer verstärkten Natriumretention. Dem osmotischen Gradienten folgt Wasser, das sich durch den entstandenen Overfill in den Gefäßen in das Interstitium verlagert [41]. Gleichzeitig besteht eine verstärkte Natriumretention, die den osmolaren Druck in Richtung Intravasalraum verschiebt. Ein Gewichtsanstieg von bis zu 20 % zeigt die massive Ödembildung.

Die klinischen Befunde und die Zusammenschau anderer Studien sprechen gegen den alleinigen Erklärungsversuch durch die Underfill-Theorie. Unabhängig von der Albumingabe beim nephrotischen Syndrom und dem dadurch resultierenden Ausgleich des Blutvolumens und die Normalisierung des RAAS, findet weiterhin eine vermehrte Natriumresorption mit daraus folgender Ödembildung statt [17, 63, 94]. Dahingegen kann eine alleinige Diuretikagabe erfolgreich bei der Therapie der Ödeme sein [95]. Die Unterdrückung des RAAS mit einem Aldosteronrezeptorantagonisten wie Spironolacton führt bei den meisten Patienten nicht zu einem Anstieg der Natriumausscheidung [41, 63, 94].

Ratten mit Nebennierenentfernung und experimentell verursachtem nephrotischen Syndrom entwickelten eine Natriumretention trotz des Mangels an Aldosteron [96].

Weiterhin zeigten Ichikawa et al., dass es bei einer einseitigen PAN-induzierten Albuminurie bei Ratten an der betroffenen Niere zu einer Proteinurie kam. Es war nur in der erkrankten Niere eine Natriumretention nachzuweisen [97]. Dies spricht ebenfalls gegen die Underfill-Theorie.

Gleichzeitig weisen einige Befunde auf die Overfill-Theorie hin. Rattenmodelle zeigten beim experimentellen nephrotischen Syndrom eine erhöhte Expression des ENaCs an der apikalen Seite der Tubuluszellen [96, 98, 99]. Andersen et al. untersuchten in einer klinischen Studie den Urin von 20 Kindern mit

idiopathischem nephrotischen Syndrom. Es zeigte sich hierbei ein deutlicher Anstieg an aktivem Plasmin [100]. Auch die alleinige Behandlung nephrotischer Mäuse mit Aprotinin, einem Serinproteaseinhibitor, führt zu einer Ödemreduktion [42].

Beide Theorien sind nicht hinreichend aussagekräftig, um eine vollumfängliche Erklärung des nephrotischen Syndroms zu bieten. Auch im Mausmodell kann hier keine klare Aussage getroffen werden.

Beide Theorien könnten sich in ihrer Beschreibung des Pathomechanismus ergänzen, wobei die Ausprägung einzelner Symptome des nephrotischen Syndroms klinisch stark von Patient zu Patient variieren kann. Das eine Extrem sind Vasokonstriktion und hypovolämische Nephrosis mit hohen Renin- und Aldosteronwerten, das andere Extrem sind klinische Zeichen einer massiven Hypervolämie mit niedrigen Renin- und Aldosteronwerten, die sich nach Behandlung der Hypervolämie normalisieren [101].

4.4 Natriumtransport beim nephrotischen Syndrom

Im Verlauf des nephrotischen Syndroms zeigte sich bei allen Mäusen eine Abnahme der Natriumausscheidung. Bedingt durch die hohe Natriumrückresorption war im Mausmodell um Tag 8 nahezu kein Natrium im Urin nachweisbar. Die verstärkte Natriumretention korrelierte mit der Ödembildung der Mäuse. Im Verlauf des nephrotischen Syndroms stieg sowohl die Plasminkonzentration im Urin, als auch die Aldosteronkonzentration im Serum an. Dies deutet auf eine erhöhte ENaC-Aktivierung, entweder bedingt durch eine Plasminaktivierung oder den Einfluss des RAAS oder beides, hin [34, 102].

Die alleinige Behandlung mit Amilorid, einem direkten ENaC-Hemmer, in einer Dosierung von 10 mg/kg KG verhindert die Aszitesbildung und steigert die Natriumausscheidung deutlich. Die Natrium- und somit die Volumenregulation zeigt sich also abhängig von der ENaC-Aktivität.

Auch in Studien zeigt sich während des nephrotischen Syndroms sowohl eine Erhöhung der ENaC-Aktivität, als auch eine vermehrte Aktivität der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase [34, 103].

Diskussion

Es wurde im PAN-Rattenmodell eine erhöhte Na^+/K^+ -ATPase Aktivität gemessen, die mit der verringerten Natriumausscheidung korreliert [104]. Feraille et al. vermuteten, dass eine Dysregulation eines Subtyps der Na^+/K^+ -ATPase die Primärursache der Natriumretention im experimentellen nephrotischen Syndrom der Ratte sei [105]. Die erhöhte Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität ist unabhängig von hormoneller Beeinflussung durch beispielsweise Aldosteron [104]. Deschenes et al. bestätigten diese Ergebnisse und zeigten, dass die erhöhte Natriumretention durch die erhöhte Na^+/K^+ -ATPase unabhängig von Proteinurie, Vasopressin und Calcineurinaktivität ist [106]. Allerdings kam es bei den verschiedenen Rattenmodellen nur zu Aszites, wenn die Proteinurie mit einer merklichen Minderung der Natriumausscheidung assoziiert war [106].

4.5 ENaC-Aktivierung und Rolle des RAAS

Der ENaC (epithelialer Natriumkanal) befindet sich hauptsächlich im Tubulussystem der Niere. Seine Regulation spielt, wie oben bereits beschrieben, eine wichtige Rolle bei der Ödementstehung des nephrotischen Syndroms [11]. Beim nephrotischen Syndrom der Maus zeigte sich im Verlauf eine massive Natriumretention. Diese ist vermutlich bedingt durch eine starke ENaC Aktivierung, die durch verschiedene Pathomechanismen verursacht sein kann. Der ENaC kann über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert werden. Eine wesentliche Aufgabe des RAAS ist die Natriumregulation durch einen vermehrten Einbau bereits vorhandener ENaCs aus Endosomen in die apikale Zellmembran über eine vermehrte Aldosteronausschüttung [11]. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Natriumrückresorption [102]. Die Beteiligung beim nephrotischen Syndrom wird allerdings kontrovers diskutiert [41].

Beim experimentellen nephrotischen Syndrom der Maus zeigte sich sowohl bei den $uPA^{+/-}$, als auch bei den $uPA^{-/-}$ Mäusen ein signifikanter Aldosteronanstieg. Dahingegen provozierte die Amiloridbehandlung einen deutlichen Aldosteronanstieg. Dies ist als Reaktion auf die ENaC-Blockade durch Amilorid zu werten und weniger als Reaktion auf einen „underfill“.

Diskussion

Die Varianz von Plasmorenin und Aldosteronwerten schwankte bei einer Gruppe von 70 nephrotischen Patienten mit Nidrigsalzdiät sehr. Trotzdem korrelierten der Plasmaaldosteronwert und die Natriumausscheidung negativ miteinander [42, 107]. Weiterhin zeigen nephrotische Patienten nicht kontinuierlich erhöhte Renin- und Aldosteronlevel [108]. Es wurde außerdem im PAN-Rattenmodell gezeigt, dass weder durch eine Adrenalektomie [96, 109], noch durch eine pharmakologische Blockade von ACE- [110] oder Angiotensinrezeptoren [51, 97] die Natriumretention inhibiert werden konnte. Auch die Blockade von Aldosteronrezeptoren durch Canrenoat ändert die Natriumausscheidung oder die Aszitesentstehung im PAN-Rattenmodell nicht [111].

Zusammenfassend zeigt sich in diesen Studien, dass zwar das Aldosteron, als Ausdruck für das aktivierte Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, oft erhöht ist und auch Argin-Vasopressin ansteigen kann, trotzdem muss der Pathomechanismus der Natriumretention während des nephrotischen Syndroms unabhängig von der Aldosteronausschüttung sein [54].

Die ENaC-Aktivierung durch Proteolyse wäre als Mechanismus diesbezüglich anzuführen und spielt sich an zwei Stellen der Untereinheiten des ENaCs ab. Die proteolytische Spaltung an drei möglichen Schnittstellen der α -Untereinheit durch Furin läuft bereits intrazellulär ab, bevor der Kanal die Plasmamembran erreicht hat [43]. Dort wird eine Proteinkette, bestehend aus 43 Aminosäuren, abgespalten [43]. Der zweite Schritt in der Aktivierungskaskade des ENaCs ist die Spaltung in der γ -Untereinheit. Diese Schnittstelle kann durch verschiedene Proteasen, unter anderem Protsasin [20, 21], Transmembran-Protease Serin 4 [21], Matriptase [21], Cathepsin B [22], Elastase [23], Kallikrein [24] und Plasmin [25] erzeugt werden und führt so zu einer endoluminalen ENaC-Aktivierung [112]. Durch zweimaliges Schneiden kommt es zu einer hohen Offenwahrscheinlichkeit der davor fast vollständig inaktiven Kanäle [43, 103].

Es ist weiterhin bekannt, dass die Urokinase den ENaC *in vitro* durch Schneiden an der γ -Untereinheit direkt aktivieren kann [59, 103]. Auch aktiviert die Urokinase Plasminogen, welches in der aktiven Form ebenfalls die Offenwahrscheinlichkeit des ENaCs erhöht [19, 25, 47].

In Oozyten, die die ENaC-Untereinheiten exprimieren, konnte der Natriumtransport durch kombinierte Gabe von Plasminogen und Urokinase erhöht werden [25]. Weiterhin sorgt Aprotinin als Serinproteaseinhibitor für eine effektive Inhibition der Ödementstehung beim experimentellen nephrotischen Syndrom der Maus [42]. Auch Amilorid als direkter ENaC-Blocker zeigt bei nephrotischen Mäusen eine ähnliche Ödemverhinderung wie Aprotinin [42]. Dies spricht für die proteolytische ENaC-Aktivierung als Hauptursache der Ödementstehung. Es erklärt die Ergebnisse der Studie von Ichikawa et al., die zeigten, dass es auch nach einer unilateralen Puromycininjektion zu einer vermehrten Natriumrückresorption kommt [97].

Die Zusammenschau der Studien gibt den deutlichen Hinweis auf intrarenale Faktoren, wie beispielsweise aberrant filtrierte Serinproteasen, die die vermehrte Natriumresorption ursächlich auslösen.

Diese beiden Pathomechanismen sind, auch in Zusammenschau mit den oben diskutierten Ergebnissen dieser Dissertation als wichtigste Ursache für die Ödementstehung beim experimentellen nephrotischen Syndrom der Maus zu sehen.

4.6 Plasminaktivierung durch Urokinase

Im Urin der nephrotischen Maus zeigte sich eine deutliche Proteinurie mit einem hohen Plasminanteil. Es wurde vermutet, dass Urokinase der Hauptaktivator für Plasmin während des nephrotischen Syndroms ist [52].

Im nephrotischen Syndrom wird aufgrund der defekten Glomeruli neben anderen Proteinen vermehrt Plasminogen nach intratubulär filtrierte. Dort wird Plasminogen enzymatisch zur Serinprotease Plasmin aktiviert [52]. Mögliche Aktivierungsweisen sind beispielsweise durch die tubulusständige Urokinase oder durch Plasma-Kallikrein beschrieben worden [2, 46].

Im Verlauf des nephrotischen Syndroms konnte im Urin der Wildtypmaus eine vermehrte uPA-Aktivität detektiert werden. Damit verbunden kam es auch zu einer Steigerung der Plasminaktivität.

Diskussion

Unter der Amiloriddosierung von 10 mg/kg KG konnte die Urokinaseaktivität effektiv gehemmt werden. Es zeigte sich auch bei der Plasminaktivität eine signifikant niedrigere Aktivität im Vergleich zu Mäusen unter Vehikeltherapie. Dies bestätigte sich im Westernblot. In der Messung des Urins war eine deutliche Bande bei 105 kDa, dies entspricht Plasminogen, und eine sehr schwache (bei Amilorid 5 mg/kg KG) bzw. keine (bei Amilorid 10 mg/kg KG) Bande bei 75 kDa, entsprechend dem aktiven Plasmin, zu sehen.

Die Plasminaktivierung durch Urokinase konnte definitiv an genetischen uPA-Knockout-Modellen bewiesen werden. Hier zeigten sich bei *uPA^{+/+}*- Mäuse den bekannten Urokinaseaktivitätsverlauf, währenddessen die *uPA^{+/-}*- Mäuse nur ein Drittel bis ein Viertel der Urokinaseaktivität und die *uPA^{-/-}*- Mäuse lediglich Spuren einer Aktivität zeigten. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Plasminaktivität. Die *uPA^{+/+}*- Mäuse zeigten den bekannten Aktivitätsverlauf, wohingegen bei den *uPA^{+/-}*- Mäusen nur die Hälfte der Plasminaktivität gemessen werden konnte. Bei den *uPA^{-/-}*- Mäusen war lediglich eine minimale Aktivität messbar. Diese Ergebnisse konnten im Plasmin-Westernblot bestätigt werden.

Urokinase ist folglich der Hauptaktivator von Plasminogen im Tubulussystem nach aberranter Filtration von Plasminogen.

Auch in der Literatur wurde Urokinase als einer der Hauptaktivatoren von Plasmin im Urin oft diskutiert [25, 47]. Dies wurde an Tiermodellen durch eine Amiloridhemmung der Urokinase untersucht [2, 52]. Bekannt ist, dass Amilorid die Urokinase *in vitro* mit einer K_i von 7 μM hemmt [35]. Staehr et al. zeigten die Hemmung der Urokinase durch Amilorid *in vivo* am PAN-Modell der Ratte. Unter einer Amiloriddosis von 2 mg/kg KG pro Tag kam es zu einer verminderten Aktivität der Urokinase. Im Westernblot war unter Amiloridbehandlung kein aktives Plasmin nachweisbar. Die Ödementstehung konnte in dieser Dosierung stark reduziert werden [52].

Dies bestätigt die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation.

4.7 Wirkweise Amilorid

Amilorid ist ein kaliumsparendes Diuretikum mit einem dualen Hemmprofil. Die Wirkung des Amilorids beruht auf einer Urokinasehemmung und einer ENaC-Blockade [35]. Durch beide Mechanismen sorgt dieses Medikament im Tiermodell und beim Menschen für eine Hemmung der Ödementstehung beim nephrotischen Syndrom [2, 113].

Um die Amiloridwirkweise auf Ödembildung am Mausmodell zu untersuchen, wurden die Tiere mit Vehikel und Amilorid in den Dosierungen 5 mg/kg KG und 10 mg/kg KG behandelt.

Es zeigte sich, dass Amilorid die Urokinase effektiv hemmt. Die Verhinderung der Ödementstehung durch Amilorid basiert allerdings nur auf der ENaC-Blockade und nicht auf einer Urokinaseinhibition.

Die effiziente Wirkung von Amilorid auf die Ödembildung wurde bereits mehrfach am Rattenmodell gezeigt [52, 111]. Hierbei wurde stets davon ausgegangen, dass die Verhinderung der Ödeme sowohl durch eine Urokinase-, als auch durch die ENaC-Hemmung bedingt wird. Dies konnte anhand der Ergebnisse, die die Experimente mit *uPA*^{-/-}- Mäusen lieferten, widerlegt werden.

4.8 Therapie des nephrotischen Syndroms mit Amilorid

Es konnte bestätigt werden, dass Amilorid eine wichtige Rolle bei der Behandlung der nephrotischen Ödeme spielt. Die Therapie des nephrotischen Syndroms besteht bis dato aus der Gabe eines Schleifendiuretikums. Diese wird bei Therapieversagen um ein Thiazid erweitert. In Ausnahmefällen wird Albumin substituiert. Amilorid zeigt hingegen bereits in geringen Dosierungen eine effektive ENaC-Blockade und wäre somit eine kausale Therapieoption der Ödeme [113].

Hinrichs et al. beschreiben die klinische Wirksamkeit von Amilorid bei therapieresistenten Ödemen. In diesem Case report wird der Fall eines 38-jährigen Patienten mit nephrotischem Syndrom auf Grund einer diabetischen Nephropathie bei langjährigem Diabetes mellitus Typ 1 geschildert. Trotz einer Therapie mit Thiaziden, β -Blockern, Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten, ACE-Hemmern

Diskussion

und Aldosteronantagonisten konnte keine suffiziente Blutdrucksenkung und Ödemrückbildung erzielt werden. Erst mit der Gabe von Amilorid in einer Dosierung von 5 mg/Tag konnte der Blutdruck auf Normwerte gesenkt werden und der Patient verlor 7 kg Körpergewicht [113].

Unruh et al. verglichen die Wirkung und die Resultate von Hydrochlorthiazid und Amilorid bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und nicht-nephrotischer Proteinurie. Der Gewichtsverlust war bei beiden Patientengruppen ähnlich. Amilorid verursachte einen höheren Kaliumanstieg (Kaliumdifferenz von $0,88 \pm 0,30$ mmol/L), verglichen mit Hydrochlorthiazid. Zwei der Patienten entwickelten unter Amiloridbehandlung eine akute Niereninsuffizienz und eine Hyperkaliämie [114]. Eine amiloridinduzierte Hyperkaliämie muss als wichtige und häufige Nebenwirkung beachtet werden [113-115].

Amilorid ist also, trotz zu beachtender Nebenwirkungen, ein potentes Diuretikum, das auch bei therapieresistenten Ödemen eingesetzt werden kann.

4.9 Ausblick

Die Frage nach dem detaillierten Mechanismus der Ödementstehung des nephrotischen Syndroms ist klinisch hochrelevant.

Wie zuvor gezeigt, ist eine Erkenntnis dieser Dissertation, dass die tubuläre Urokinase der Hauptaktivator von aberrant filtriertem Plasminogen im Urin ist. Trotz des stark verminderten aktiven Urin-Plasmins kam es dennoch zu einer ENaC-Aktivierung und zu Ödemen. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass der Einfluss der Urokinase für die Ödementstehung von untergeordneter Rolle ist. Daher hat die weitere Forschung im Bereich der proteolytischen ENaC-Aktivierung hohe klinische Relevanz.

Die gute Wirksamkeit der Ödembehandlung mit Amilorid war an Mäusen evident [2]. Weitere klinische Studien müssen zeigen, ob bei Therapieversagern in der Ödembehandlung bei einem nephrotischen Syndrom die Gabe von Amilorid empfohlen werden kann. Eine randomisierte interventionelle Studie mit Amilorid ist an unserer Klinik angelaufen (AMILOR).

Die neuen Erkenntnisse über die Bedeutung der Proteinurie beziehungsweise Proteasurie beim nephrotischen Syndrom könnten zu einem Umdenken des diuretischen Therapieregimes hin zu einem vermehrten Einsatz von Amilorid führen.

5 Zusammenfassung

Das nephrotische Syndrom ist ein Symptomkomplex aus Proteinurie, Hyperlipidämie und Ödemen.

Während des nephrotischen Syndroms gelangt Plasminogen durch aberrante Filtration in den Tubulus und wird durch die tubulusständige Urokinase zu aktivem Plasmin konvertiert. Dies könnte zu einer proteolytischen Aktivierung des epithelialen Natriumkanals ENaC und zu einer vermehrten Natriumretention führen.

In dieser Dissertation wurde die Rolle der Urokinase bei der Entstehung von Ödemen beim experimentellen nephrotischen Syndrom der Maus untersucht und geprüft, ob die Hemmung der Urokinase möglicherweise protektiv auf die Ödemenstehung im Rahmen des nephrotischen Syndroms wirkt.

Das nephrotische Syndrom wurde anhand des Doxorubicinmodells an Mäusen untersucht. Hierbei wurde die Urokinase pharmakologisch durch Amilorid in den Dosierungen 5 mg/kg KG und 10 mg/kg KG inhibiert und es wurden *uPA*^{+/-}-Mäuse und *uPA*^{-/-}-Mäuse bezüglich der Ödemenstehung untersucht.

Es zeigte sich, dass die Amiloridtherapie über Hemmung der Urokinaseaktivität im Urin die Plasminogenaktivierung verhindert und die Mäuse über eine ENaC-Blockade vor einer Natriumretention und Ödembildung schützt. Bei *uPA*^{-/-}-Mäusen kam es bei fehlender Urokinaseaktivität im Urin ebenfalls zu einer fast vollständig verminderten Plasminogenaktivierung. Dennoch zeigte sich bei *uPA*^{+/-}-Mäusen eine starke Natriumretention und eine Ödemenstehung, vergleichbar mit nephrotischen Wildtyp-Mäusen. Bei *uPA*^{-/-}-Mäusen, die mit Amilorid behandelt wurden, konnte die Natriumretention und somit die Ödembildung effektiv verhindert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die tubulusständige Urokinase hauptverantwortlich für die Konversion von aberrant filtriertem Plasminogen zu Plasmin im Urin ist. Dies ist jedoch für die Ödemenstehung nicht essentiell. Die antiödematöse Wirkung von Amilorid beruht auf der ENaC-Blockade.

6 Anhang

Body weight changes

0 -	Normal
1 -	<10% weight loss
2 -	10-15% weight loss
3 -	>20% weight loss

Physical condition

	<u>Haircoat</u>		<u>Eyes and Nose</u>
0 -	Normal, well-groomed	0 -	Normal
1 -	Rough haircoat,	1 -	Eyes closed or squinted – no discharge
2 -	Rough coat, hair loss, ungroomed	2 -	Eyes closed or squinted – discharge or porphyrin staining

Behavior

	<u>Activity</u>		<u>Posture</u>
0 -	Normal	0 -	Normal
1 -	Decreased activity, locomotion after slight stimulation	1 -	Sitting in hunched up position
2 -	Inactive, less alert, locomotion after moderate stimulation	2 -	Hunched posture/ head on cage floor
3 -	Self-mutilation, either very restless or immobile, or no locomotion after moderate stimulation	3 -	Lying prone on cage floor

Abbildung 33: Scoring system zur Beurteilung des Allgemeinzustandes der Maus während des Experimentes

Bei > 8 Punkten sofortige Euthanasie

Literaturverzeichnis

1. Warnock, D.G., et al., *Blood pressure and amiloride-sensitive sodium channels in vascular and renal cells*. Nat Rev Nephrol, 2014. **10**(3): p. 146-57.
2. Bohnert, B.N., et al., *Urokinase-type plasminogen activator (uPA) is not essential for epithelial sodium channel (ENaC)-mediated sodium retention in experimental nephrotic syndrome*. Acta Physiol (Oxf), 2019: p. e13286.
3. Haerteis, S., et al., *Proteolytic activation of the human epithelial sodium channel by trypsin IV and trypsin I involves distinct cleavage sites*. J Biol Chem, 2014. **289**(27): p. 19067-78.
4. G., H., *Innere Medizin*. 2015.
5. Citak, A., et al., *Hemostatic problems and thromboembolic complications in nephrotic children*. Pediatr Nephrol, 2000. **14**(2): p. 138-42.
6. Lehnert, H., Werdan K., *Innere Medizin*. 2006.
7. Bohnert, B.N., et al., *Impact of phosphorus restriction and vitamin D-substitution on secondary hyperparathyroidism in a proteinuric mouse model*. Kidney Blood Press Res, 2015. **40**(2): p. 153-65.
8. Prinsen, B.H., et al., *Transferrin synthesis is increased in nephrotic patients insufficiently to replace urinary losses*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(5): p. 1017-25.
9. Kim, J.S., et al., *Secondary Focal Segmental Glomerulosclerosis: From Podocyte Injury to Glomerulosclerosis*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 1630365.
10. Haim Garty, L.G.P., *Epithelial Sodium Channels: Function, Structure and Regulation*. Physiological reviews, 1997.
11. Hamm, L.L., Z. Feng, and K.S. Hering-Smith, *Regulation of sodium transport by ENaC in the kidney*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2010. **19**(1): p. 98-105.
12. Rossier, B.C., et al., *Epithelial sodium channels*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 1994. **3**(5): p. 487-96.
13. Kellenberger, S. and L. Schild, *Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure*. Physiol Rev, 2002. **82**(3): p. 735-67.
14. Canessa, C.M., et al., *Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits*. Nature, 1994. **367**(6462): p. 463-7.
15. Svenningsen, P., et al., *Mechanisms of renal NaCl retention in proteinuric disease*. Acta Physiol (Oxf), 2013. **207**(3): p. 536-45.
16. Palmer, L.G., A. Patel, and G. Frindt, *Regulation and dysregulation of epithelial Na⁺ channels*. Clin Exp Nephrol, 2012. **16**(1): p. 35-43.
17. Ray, E.C., et al., *Sodium retention and volume expansion in nephrotic syndrome: implications for hypertension*. Adv Chronic Kidney Dis, 2015. **22**(3): p. 179-84.
18. Hughey, R.P., et al., *Epithelial sodium channels are activated by furin-dependent proteolysis*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18111-4.
19. Carattino, M.D., R.P. Hughey, and T.R. Kleyman, *Proteolytic processing of the epithelial sodium channel gamma subunit has a dominant role in channel activation*. J Biol Chem, 2008. **283**(37): p. 25290-5.
20. Vallet, V., et al., *An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel*. Nature, 1997. **389**(6651): p. 607-10.
21. Vuagniaux, G., et al., *Synergistic activation of ENaC by three membrane-bound channel-activating serine proteases (mCAP1, mCAP2, and mCAP3) and serum- and glucocorticoid-regulated kinase (Sgk1) in Xenopus Oocytes*. J Gen Physiol, 2002. **120**(2): p. 191-201.

Literaturverzeichnis

22. Alli, A.A., et al., *Cathepsin B is secreted apically from Xenopus 2F3 cells and cleaves the epithelial sodium channel (ENaC) to increase its activity.* J Biol Chem, 2012. **287**(36): p. 30073-83.
23. Caldwell, R.A., R.C. Boucher, and M.J. Stutts, *Neutrophil elastase activates near-silent epithelial Na⁺ channels and increases airway epithelial Na⁺ transport.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **288**(5): p. L813-9.
24. Picard, N., et al., *Defective ENaC processing and function in tissue kallikrein-deficient mice.* J Biol Chem, 2008. **283**(8): p. 4602-11.
25. Passero, C.J., et al., *Plasmin activates epithelial Na⁺ channels by cleaving the gamma subunit.* J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36586-91.
26. Masilamani, S., et al., *Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney.* J Clin Invest, 1999. **104**(7): p. R19-23.
27. Ergonul, Z., G. Frindt, and L.G. Palmer, *Regulation of maturation and processing of ENaC subunits in the rat kidney.* Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(3): p. F683-93.
28. <https://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=amilorid>. Zugriff 08.11.18, 16.28 Uhr.
29. Baer, J.E., et al., *The potassium-sparing and natriuretic activity of N-amidino-3,5-diamino-6-chloropyrazinecarboxamide hydrochloride dihydrate (amiloride hydrochloride).* J Pharmacol Exp Ther, 1967. **157**(2): p. 472-85.
30. Epstein, M. and D.A. Calhoun, *Aldosterone blockers (mineralocorticoid receptor antagonism) and potassium-sparing diuretics.* J Clin Hypertens (Greenwich), 2011. **13**(9): p. 644-8.
31. Palmer, L.G. and O.S. Andersen, *Interactions of amiloride and small monovalent cations with the epithelial sodium channel. Inferences about the nature of the channel pore.* Biophys J, 1989. **55**(4): p. 779-87.
32. Kellenberger, S., I. Gautschi, and L. Schild, *Mutations in the epithelial Na⁺ channel ENaC outer pore disrupt amiloride block by increasing its dissociation rate.* Mol Pharmacol, 2003. **64**(4): p. 848-56.
33. Lu, M., et al., *Small molecule activator of the human epithelial sodium channel.* J Biol Chem, 2008. **283**(18): p. 11981-94.
34. Svenningsen, P., et al., *Urinary serine proteases and activation of ENaC in kidney--implications for physiological renal salt handling and hypertensive disorders with albuminuria.* Pflugers Arch, 2015. **467**(3): p. 531-42.
35. Vassalli, J.D. and D. Belin, *Amiloride selectively inhibits the urokinase-type plasminogen activator.* FEBS Lett, 1987. **214**(1): p. 187-91.
36. GmbH, r., *Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels/ Fachinformation: Amilorid comp. -ratiopharm 5 mg/50 mg Tabletten.* 2015.
37. Busch, A.E., et al., *Blockade of epithelial Na⁺ channels by triamterenes - underlying mechanisms and molecular basis.* Pflugers Arch, 1996. **432**(5): p. 760-6.
38. Kleyman, T.R. and E.J. Cragoe, Jr., *Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport.* J Membr Biol, 1988. **105**(1): p. 1-21.
39. Kolkhof, P. and L. Barfacker, *30 YEARS OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR: Mineralocorticoid receptor antagonists: 60 years of research and development.* J Endocrinol, 2017. **234**(1): p. T125-t140.
40. Crew, R.J., J. Radhakrishnan, and G. Appel, *Complications of the nephrotic syndrome and their treatment.* Clin Nephrol, 2004. **62**(4): p. 245-59.
41. Bockenhauer, D., *Over- or underfill: not all nephrotic states are created equal.* Pediatr Nephrol, 2013. **28**(8): p. 1153-6.
42. Bohnert, B.N., et al., *Aprotinin prevents proteolytic epithelial sodium channel (ENaC) activation and volume retention in nephrotic syndrome.* Kidney Int, 2018. **93**(1): p. 159-172.

Literaturverzeichnis

43. Artunc, F., et al., *Proteasuria-The impact of active urinary proteases on sodium retention in nephrotic syndrome*. Acta Physiol (Oxf), 2019. **225**(4): p. e13249.
44. Artunc, F., et al., *FP278CHARACTERIZATION AND QUANTIFICATION OF PROTEASURIA IN NEPHROTIC SYNDROME*. Vol. 33. 2018. i125-i125.
45. Schork, A., et al., *Association of Plasminuria with Overhydration in Patients with CKD*. Clin J Am Soc Nephrol, 2016. **11**(5): p. 761-9.
46. Haerteis, S., et al., *Plasma kallikrein activates the epithelial sodium channel in vitro but is not essential for volume retention in nephrotic mice*. Acta Physiol (Oxf), 2018. **224**(1): p. e13060.
47. Kleyman, T.R., M.D. Carattino, and R.P. Hughey, *ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases*. J Biol Chem, 2009. **284**(31): p. 20447-51.
48. Zandi-Nejad, K., et al., *Why is proteinuria an ominous biomarker of progressive kidney disease?* Kidney Int Suppl, 2004(92): p. S76-89.
49. D'Agati, V.D., F.J. Kaskel, and R.J. Falk, *Focal segmental glomerulosclerosis*. N Engl J Med, 2011. **365**(25): p. 2398-411.
50. Passero, C.J., R.P. Hughey, and T.R. Kleyman, *New role for plasmin in sodium homeostasis*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2010. **19**(1): p. 13-9.
51. Svenningsen, P., et al., *Plasmin in nephrotic urine activates the epithelial sodium channel*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(2): p. 299-310.
52. Staehr, M., et al., *Aberrant glomerular filtration of urokinase-type plasminogen activator in nephrotic syndrome leads to amiloride-sensitive plasminogen activation in urine*. Am J Physiol Renal Physiol, 2015. **309**(3): p. F235-41.
53. Bolon, I., et al., *Plasminogen mediates the pathological effects of urokinase-type plasminogen activator overexpression*. Am J Pathol, 2004. **164**(6): p. 2299-304.
54. Svenningsen, P., O. Skott, and B.L. Jensen, *Proteinuric diseases with sodium retention: Is plasmin the link?* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012. **39**(1): p. 117-24.
55. Svenningsen, P., et al., *Physiology and pathophysiology of the plasminogen system in the kidney*. Pflugers Arch, 2017. **469**(11): p. 1415-1423.
56. Draxler, D.F. and R.L. Medcalf, *The fibrinolytic system-more than fibrinolysis?* Transfus Med Rev, 2015. **29**(2): p. 102-9.
57. Carmeliet, P., et al., *Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice*. Nature, 1994. **368**(6470): p. 419-24.
58. Sappino, A.P., et al., *Sites of synthesis of urokinase and tissue-type plasminogen activators in the murine kidney*. J Clin Invest, 1991. **87**(3): p. 962-70.
59. Chen, Z., et al., *Regulation of epithelial sodium channels in urokinase plasminogen activator deficiency*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. **307**(8): p. L609-17.
60. Zhu, M., et al., *Identification of a novel inhibitor of urokinase-type plasminogen activator*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(4): p. 1348-56.
61. Rieder, S.C., et al., *[CME: Nephrotic Syndrome in Adults: Presentation, Diagnosis, Therapy]*. Praxis (Bern 1994), 2019. **108**(5): p. 347-355.
62. Mogyorosi, A. and S. Sonkodi, *AT1 receptor antagonists: a challenge for ACE inhibitors in diabetic nephropathy*. Diabetes Metab Res Rev, 1999. **15**(1): p. 55-8.
63. Usberti, M., et al., *Considerations on the sodium retention in nephrotic syndrome*. Am J Nephrol, 1995. **15**(1): p. 38-47.
64. Brown, E.A., et al., *Lack of effect of captopril on the sodium retention of the nephrotic syndrome*. Nephron, 1984. **37**(1): p. 43-8.
65. Roberts I, f.t.C.I.G.A. and Reviewers, *Human albumin administration in critically ill patients: systematic review of randomised controlled trials*. Bmj, 1998. **317**(7153): p. 235-40.

Literaturverzeichnis

66. Collins, S., M. Myatt, and B. Golden, *Dietary treatment of severe malnutrition in adults*. Am J Clin Nutr, 1998. **68**(1): p. 193-9.
67. Reid, C.J., et al., *Nephrotic syndrome in childhood complicated by life threatening pulmonary oedema*. Bmj, 1996. **312**(7022): p. 36-8.
68. laboratory, T.J. *C57BL/6-Plau tm1.1Bug/J*. 2019 [cited 20.05.2019].
69. Artunc, F., et al., *Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 in doxorubicin-induced nephrotic syndrome*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(6): p. F1624-34.
70. Bohnert BN, D.T., Daiminger S et al, *Retrobulbar sinus injection is superior to lateral tail vein injection in inducing experimental nephrotic syndrome by doxorubicin in mice*. in preparation, 2018.
71. Bohnert, B.N. and F. Artunc, *Induction of Nephrotic Syndrome in Mice by Retrobulbar Injection of Doxorubicin and Prevention of Volume Retention by Sustained Release Aprotinin*. J Vis Exp, 2018(135).
72. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
73. GmbH, B.-R.L., *Bio-Rad Protein Assay LIT33 - instruction manual*.
74. MacIntyre I.: *Advances in Clinical Chemistry - Flame Photometry*. Amsterdam, Elsevier, 1961.
75. GmbH, L.T.E.L., *Creatinin, Jaffé, kinetisch, ohne Enteiweißung (LT-CR 0121) - instruction manual*. 2006.
76. Hervey, G.R., *Determination of creatinine by the Jaffe reaction*. Nature, 1953. **171**(4364): p. 1125.
77. Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH: *Harnstoff, UV, kinetisch (LT-UR 0010) - instruction manual*.
78. Weber J.A.: *The enzymatic determination of urea using the Greiner G 300*. J Clin Chem Clin Biochem 1984; **22**:195-197.
79. Cryopep: *pNAPEP 1344 - instruction manual*, 2015
80. Friberger P., Knos M., Gustavsson S., Aurell L., Claeson G.: *Methods for determination of plasmin, antiplasmin and plasminogen by means of substrate S-2251*. Haemostasis 1978; **7**:138-145
81. Chromogenix: *S-2251 - instruction manual*, 2008.
82. Hnasko, T.S. and R.M. Hnasko, *The Western Blot*. Methods Mol Biol, 2015. **1318**: p. 87-96.
83. Brown, R.D., C.A. Strott, and G.W. Liddle, *Site of stimulation of aldosterone biosynthesis by angiotensin and potassium*. J Clin Invest, 1972. **51**(6): p. 1413-8.
84. Perschel, F.H., et al., *Rapid screening test for primary hyperaldosteronism: ratio of plasma aldosterone to renin concentration determined by fully automated chemiluminescence immunoassays*. Clin Chem, 2004. **50**(9): p. 1650-5.
85. Castellino, F.J. and V.A. Ploplis, *Structure and function of the plasminogen/plasmin system*. Thromb Haemost, 2005. **93**(4): p. 647-54.
86. Pereira Wde, F., et al., *The experimental model of nephrotic syndrome induced by Doxorubicin in rodents: an update*. Inflamm Res, 2015. **64**(5): p. 287-301.
87. Tavoloni, N. and A.M. Guarino, *Disposition and metabolism of adriamycin in the rat*. Pharmacology, 1980. **21**(4): p. 244-55.
88. Lee, V.W. and D.C. Harris, *Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis*. Nephrology (Carlton), 2011. **16**(1): p. 30-8.
89. Wang, Y., et al., *Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events*. Kidney Int, 2000. **58**(4): p. 1797-804.

Literaturverzeichnis

90. Chen, C.A., et al., *Reduced podocyte expression of alpha3beta1 integrins and podocyte depletion in patients with primary focal segmental glomerulosclerosis and chronic PAN-treated rats*. J Lab Clin Med, 2006. **147**(2): p. 74-82.
91. Okuda, S., et al., *Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease*. Kidney Int, 1986. **29**(2): p. 502-10.
92. Fogo, A., et al., *Serial micropuncture analysis of glomerular function in two rat models of glomerular sclerosis*. J Clin Invest, 1988. **82**(1): p. 322-30.
93. Mace, C. and S.S. Chugh, *Nephrotic syndrome: components, connections, and angiopoietin-like 4-related therapeutics*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(11): p. 2393-8.
94. Brown, E.A., et al., *Evidence that some mechanism other than the renin system causes sodium retention in nephrotic syndrome*. Lancet, 1982. **2**(8310): p. 1237-40.
95. Kapur, G., et al., *Treatment of severe edema in children with nephrotic syndrome with diuretics alone--a prospective study*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(5): p. 907-13.
96. de Seigneux, S., et al., *Increased expression but not targeting of ENaC in adrenalectomized rats with PAN-induced nephrotic syndrome*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(1): p. F208-17.
97. Ichikawa, I., et al., *Role for intrarenal mechanisms in the impaired salt excretion of experimental nephrotic syndrome*. J Clin Invest, 1983. **71**(1): p. 91-103.
98. Kim, S.W., et al., *Increased apical targeting of renal ENaC subunits and decreased expression of 11betaHSD2 in HgCl2-induced nephrotic syndrome in rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(3): p. F674-87.
99. Kim, S.W., et al., *Increased expression and apical targeting of renal ENaC subunits in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome in rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(5): p. F922-35.
100. Andersen, R.F., et al., *Remission of nephrotic syndrome diminishes urinary plasmin content and abolishes activation of ENaC*. Pediatr Nephrol, 2013. **28**(8): p. 1227-34.
101. Meltzer, J.I., et al., *Nephrotic syndrome: vasoconstriction and hypervolemic types indicated by renin-sodium profiling*. Ann Intern Med, 1979. **91**(5): p. 688-96.
102. Patel, S., et al., *Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies*. Biomed Pharmacother, 2017. **94**: p. 317-325.
103. Ji, H.L., et al., *Proteolytic regulation of epithelial sodium channels by urokinase plasminogen activator: cutting edge and cleavage sites*. J Biol Chem, 2015. **290**(9): p. 5241-55.
104. Vogt, B. and H. Favre, *Na+,K(+)-ATPase activity and hormones in single nephron segments from nephrotic rats*. Clin Sci (Lond), 1991. **80**(6): p. 599-604.
105. Feraille, E., et al., *Mechanism of enhanced Na-K-ATPase activity in cortical collecting duct from rats with nephrotic syndrome*. J Clin Invest, 1993. **91**(4): p. 1295-300.
106. Deschenes, G. and A. Doucet, *Collecting duct (Na+/K+)-ATPase activity is correlated with urinary sodium excretion in rat nephrotic syndromes*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(4): p. 604-15.
107. Geers, A.B., et al., *Functional relationships in the nephrotic syndrome*. Kidney Int, 1984. **26**(3): p. 324-30.
108. Vande Walle, J.G., et al., *Volume regulation in children with early relapse of minimal-change nephrosis with or without hypovolaemic symptoms*. Lancet, 1995. **346**(8968): p. 148-52.
109. Lourdel, S., et al., *Hyperaldosteronemia and activation of the epithelial sodium channel are not required for sodium retention in puromycin-induced nephrosis*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(12): p. 3642-50.
110. Pedraza-Chaverri, J., et al., *Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria*,

Literaturverzeichnis

- hypoproteinemia, and renin-angiotensin-aldosterone system on sodium retention. Rev Invest Clin, 1990. 42(1): p. 29-38.*
111. Deschenes, G., et al., *Collecting duct is a site of sodium retention in PAN nephrosis: a rationale for amiloride therapy. J Am Soc Nephrol, 2001. 12(3): p. 598-601.*
 112. Rossier, B.C. and M.J. Stutts, *Activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by serine proteases. Annu Rev Physiol, 2009. 71: p. 361-79.*
 113. Hinrichs, G.R., et al., *Amiloride resolves resistant edema and hypertension in a patient with nephrotic syndrome; a case report. Physiol Rep, 2018. 6(12): p. e13743.*
 114. Unruh, M.L., et al., *Trial of Amiloride in Type 2 Diabetes with Proteinuria. Kidney Int Rep, 2017. 2(5): p. 893-904.*
 115. Chiu, T.F., et al., *Rapid life-threatening hyperkalemia after addition of amiloride HCl/hydrochlorothiazide to angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. Ann Emerg Med, 1997. 30(5): p. 612-5.*

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Ferruh Artunc.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Prof. Dr. med. Ferruh Artunc und Herrn Dr. med. Bernhard Bohnert von mir eigenständig durchgeführt.

Die Auswertungen der Proben mit der Westernblot-Technik erfolgten durch Herrn Matthias Wörn. Die Genotypisierung der gezüchteten Mäuse erfolgte durch Frau Andrea Janessa.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den

Sophie Elisabeth Daiminger

8 Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Poster:

„Urokinase ist nicht essenziell für die Ödementstehung beim experimentellen nephrotischen Syndrom“

Sophie Daiminger, Bernhard Bohnert, Matthias Wörn, Sandip Kanse, Ferruh Artunc

Auf dem Kongress für Nephrologie 2016; 8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie; 10.-13. September 2016, Berlin

„Urokinase-type Plasminogen Activator Is Not Required For Edema Formation During Experimental Nephrotic Syndrome“

Ferruh Artunc, Bernhard Bohnert, Matthias Wörn, Sophie Daiminger

Auf dem Kongress der American Society of Nephrology 2016; Kidney Week 2016; 15.-20. November 2016, Chicago

Paper:

„Urokinase-type plasminogen activator (uPA) is not essential for epithelial sodium channel (ENaC)-mediated sodium retention in experimental nephrotic syndrome.“, Bernhard N. Bohnert, Sophie Daiminger, Matthias Wörn, Florian Sure, Tobias Staudner, Alexandr V. Ilyaskin, Firas Batbouta, Andrea Janessa, Jonas C. Schneider, Daniel Essigke, Sandip Kanse, Silke Haerteis, Christoph Korbmacher, Ferruh Artunc, Acta Physiol (Oxf). 2019 Apr 21:e13286. doi: 10.1111/apha.13286.

„Retrobulbar Sinus Injection of Doxorubicin is More Efficient Than Lateral Tail Vein Injection at Inducing Experimental Nephrotic Syndrome in Mice: A Pilot Study.“, Bernhard N. Bohnert, Thomas Dörffel, Sophie Daiminger, Carsten Calaminus, Sandro Aidone, Almuth Falkenau, Antje Semrau, Mai J. Le, Franz

Veröffentlichungen

Iglauer, Ferruh Artunc, *Laboratory Animals* 2019 Jan 24:23677218824382. doi: 10.1177/0023677218824382.

„Aprotinin prevents proteolytic epithelial sodium channel (ENaC) activation and volume retention in nephrotic syndrome.“, Bernhard N. Bohnert, Martina Menacher, Andrea Janessa, Matthias Wörn, Anja Schork, Sophie Daiminger, Hubert Kalbacher, Hans-Ulrich Häring, Christoph Daniel, Kerstin Amann, Florian Sure, Marko Bertog, Silke Haerteis, Christoph Korbmacher, Ferruh Artunc, *Kidney Int.* 2018 Jan;93(1):159-172. doi: 10.1016/j.kint.2017.07.023. Epub 2017 Oct 14.

9 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Ferruh Artunc für die Überlassung dieses spannenden Themas und die freundliche und umfassende Betreuung. Vielen Dank für die Geduld, die ausführlichen Erklärungen und vor allem für den ansteckenden wissenschaftlichen Arbeitsanspruch, der mich immer wieder beflügelt hat.

Besonderen Dank hat auch Dr. med. Bernhard Bohnert verdient, der mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Die zusätzliche Stärkung mit Kuchen, Kaffee und Käsespätzle hat die Zeit im Labor sehr angenehm gemacht.

Vielen Dank an die Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des nephrologischen Labors, insbesondere an Andrea Janessa, die mir mit Ihrem Wissen bei den kleineren und größeren Problemen des Laboralltags stets weiterzuhelfen wussten.

Weiterhin möchte ich meinen MitdoktorandInnen danken, die mich bei der Wochenend- und Ferienbetreuung der Mäuse unterstützt haben.

Schließlich möchte ich meiner Familie für die seelische Unterstützung und die vielen wertvollen Ratschläge danken. Mein herzlicher Dank gebührt hier vor allem meinem Vater, der immer ein offenes Ohr für mich hatte und nicht müde wurde, sich wieder und wieder meine Dissertation durchzulesen und sie mit mir zu diskutieren. Danke!