

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin II
Prof. Dr. Lars Maier
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Renale Expression neuer Ischämie marker bei
experimenteller Herzinsuffizienz

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Jesko Ingold

2015

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin II
Prof. Dr. Lars Maier
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Renale Expression neuer Ischämie marker bei experi-
menteller Herzinsuffizienz

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Jesko Ingold

2015

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Luchner

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Schweda

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2015

GLIEDERUNG

1	<u>Einleitung</u>	<u>Seite</u>
1.1	Definition und Klassifikation des kardioresalen Syndroms	8
1.2	Epidemiologie des kardioresalen Syndroms	9
1.3	Ätiologie und Pathophysiologie des kardioresalen Syndroms	9
1.3.1	Typ 1: Das akute kardioresale Syndrom	9
1.3.2	Typ 2: Das chronische kardioresale Syndrom	11
1.3.3	Typ 3: Das akute renokardiale Syndrom	12
1.3.4	Typ 4: Das chronische renokardiale Syndrom	12
1.3.5	Typ 5: Das sekundär kardioresale Syndrom	13
1.4	Kardioresale Biomarker	14
1.4.1	Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL)	14
1.4.2	Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1)	16
1.4.3	Interleukin-18 (Il-18)	17
1.4.4	N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG)	17
1.5	Vasopeptidase-Inhibitoren	19
1.5.1	Omapatrilat	20
1.6	Fragestellung	22
2	<u>Material und Methoden</u>	
2.1	Nierengewebe, PLVD-Modell, Primerdesign	23
2.2	RNA-Extraktion	24
2.3	RNA-Vermessung	26
2.4	Transkription in cDNA	26
2.5	Real-Time-PCR mittels TaqMan	27
2.6	Gelelektrophorese der PCR-Produkte	36

2.7	Gelextraktion	36
2.8	Klonierung mittels TOPO 2.1 Vektor und Transformation in DH5alpha	37
2.9	Sequenzierung	39
2.10	Korrelation der NGAL-und Il-18 Expression mit der BNP-Expression und der linksventrikulären Pumpfunktion	39
2.11	Immunhistochemie	39
3	<u>Ergebnisse</u>	
3.1	NGAL-Expression	42
3.1.1	Grafische Darstellung der quantitativen Ergebnisse	42
3.1.2	Korrelation der NGAL-Expression mit der BNP-Expression und der linksventrikulären Pumpfunktion	52
3.1.3	Immunhistochemische Darstellung der NGAL-Expression	53
3.2	KIM-1-Expression	57
3.3	NAG-Expression	58
3.4	Il-18-Expression	59
3.4.1	Grafische Darstellung der quantitativen Ergebnisse	59
3.4.2	Korrelation der Il18-Expression mit der BNP-Expression und der linksventrikulären Pumpfunktion	68
3.4.3	Immunhistochemische Darstellung der Il-18-Expression	69

4	<u>Diskussion</u>	
4.1	NGAL (Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin)	73
4.2	KIM-1 (Kidney-Injury-Molecule-1)	75
4.3	NAG (N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase)	76
4.4	Il-18 (Interleukin-18)	77
4.5	Vasopeptidase-Inhibition durch Omapatrilat	79
4.6	Korrelation der renalen NGAL- und Il-18-Expression mit der kardialen BNP-Expression und der linksventrikulären Pumpfunktion	80
5	<u>Zusammenfassung</u>	82
6	<u>Limitationen</u>	84
7	<u>Literaturverzeichnis</u>	85
8	<u>Danksagung</u>	89

1 Einleitung

1.1 Definition und Klassifikation des kardiorenenalen Syndroms

Das kardiorenenale Syndrom beschreibt eine gleichzeitig auftretende Insuffizienz von Herz und Nieren, wobei eine kardial bedingte akute oder chronische Pathophysiologie eine renal bedingte akute oder chronische Krankheit hervorrufen kann und umgekehrt (1). Ronco, Chionh et al. haben 2009 das kardiorenenale Syndrom in fünf Subtypen gegliedert (2). Diese Klassifikation berücksichtigt die Pathophysiologie, den zeitlichen Verlauf und das Ausmaß der kardialen und renalen Schädigung.

Der Typ 1 des kardiorenenalen Syndroms beschreibt eine plötzliche Verschlechterung der kardialen Pumpleistung (beispielsweise ein kardiogener Schock oder eine akute dekompensierte Herzinsuffizienz), welche zu einer akuten renalen Schädigung führt (akutes kardiorenenales Syndrom). Typ 2 basiert auf einer chronischen kardialen Dysfunktion (beispielsweise eine chronische Herzinsuffizienz). Dieses verursacht eine progressive, chronische Nierendysfunktion (chronisches kardiorenenales Syndrom). Der Typ 3 spiegelt sich in einer abrupten Störung der Nierenfunktion wider (z.B. akuter Niereninfarkt oder Glomerulonephritis), wodurch es zu einer akuten kardialen Schädigung (akutes Koronarsyndrom, Arrhythmien) kommt (akutes renokardiales Syndrom). Der vierte beschriebene Typ des kardiorenenalen Syndroms geht von einer chronischen Nierenschädigung aus, die zu einer Verminderung des kardialen Pumpvermögens und zur kardialen Hypertrophie beitragen kann (chronisches renokardiales Syndrom). Typ 5 kennzeichnet einen systemischen Zustand (z.B. Sepsis), welcher gleichzeitig sowohl zur kardialen als auch zur renalen Schädigung beiträgt (sekundär kardiorenenales Syndrom) (2).

1.2 Epidemiologie des kardiorenenalen Syndroms

Im Folgenden werden die Epidemiologien der unterschiedlichen Komponenten des kardiorenenalen Syndroms beleuchtet. Die Prävalenz der akuten und chronischen Herzinsuffizienz ist altersabhängig. In der fünften Lebensdekade beträgt sie 1 %, in der sechsten 3 % und in der achten 10 %. Dabei sind Männer häufiger betroffen als Frauen (m:w = 1,5:1) (3). Die häufigsten Ursachen sind die Hypertonie und die koronare Herzkrankheit (4). Das akute Nierenversagen tritt in der Klinik mit einem Anteil von ca. 5 % aller Intensivpatienten auf. Die Inzidenz der chronischen Niereninsuffizienz in Westeuropa beträgt 0,01 % im Jahr. Die Prävalenz der Niereninsuffizienz beträgt 12 % (5).

1.3 Ätiologie und Pathophysiologie des kardiorenenalen Syndroms

Da die Ätiologie und Pathophysiologie primär entweder kardialen oder renalen Ursprungs ist, wird im Folgenden auf die Ätiologien und Pathophysiologien der unterschiedlichen Typen des kardiorenenalen Syndroms eingegangen.

1.3.1 Typ 1: Das akute kardiorenale Syndrom

Ein akutes Herzversagen löst ein akutes Nierenversagen aus. Ursächlich hierfür können eine akute dekompensierte chronische Herzinsuffizienz, ein kardiogener Schock, ein akutes Rechtsherzversagen oder ein hypertensives Lungenödem sein. Die Nierenfunktion kann sich jedoch wieder erholen, wenn die kardiale Dekompensation nur von kurzer Dauer ist. Ist dies nicht der Fall, entwickelt sich Typ 2 des kardiorenenalen Syndroms (2). Die Herzinsuffizienz ist definiert als das Unvermögen des Herzens, ein ausreichendes Herzzeitvolumen bei einem normalen enddiastolischen Füllungsdruck zu gewährleisten (6). Die World Health Organization definiert die Herzinsuffizienz als verminderte körperliche Belastbarkeit aufgrund einer

ventrikulären Funktionsstörung. Die New York Heart Association (NYHA) gliedert die Herzinsuffizienz in 4 Stadien:

NYHA I: Herzkrankheit ohne Beschwerden bei normaler körperlicher Belastung

NYHA II: Beschwerden bei starker körperlicher Belastung, Beschwerdefreiheit in Ruhe oder bei leichter Belastung

NYHA III: Beschwerden bei leichter körperlicher Belastung, Beschwerdefreiheit nur in Ruhe

NYHA IV: Beschwerden auch in Ruhe

Im Folgenden wird nun die akute Herzinsuffizienz beschrieben, welche zu renalen Schädigungen führen kann. Ursächlich können ein myokardiales Pumpversagen (akutes Koronarsyndrom, hypertone Krise, Myokarditis), eine mechanische Behinderung der Ventrikelfüllung (Perikardtamponade) oder tachykarde beziehungsweise bradykarde Herzrhythmusstörungen sein (5). Zu Beginn einer akuten Herzinsuffizienz kann der Körper Kompensationsmechanismen einschalten. Eine Sympathikusaktivierung mit erhöhter Katecholaminausschüttung steigert zunächst die Herzfrequenz und die Kontraktilität. Im weiteren Verlauf kommt es dann jedoch zu einer Downregulation der kardialen Betarezeptoren. Dadurch vermindert sich die positiv inotrope Wirkung der Katecholamine am Herzen; die vasokonstriktorische Wirkung an peripheren Alpharezeptoren bleibt erhalten, und es kommt zu einer Erhöhung der Nachlast (5,6). Ein weiterer Kompensationsmechanismus ist die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Dieses wird auch über den juxtaglomerulären Apparat der Nieren kontrolliert, welcher als Antwort auf die Hypoperfusion bei beginnender Herzinsuffizienz vermehrt Renin bildet. Dies führt zur zusätzlichen Vasokonstriktion und Erhöhung der Nachlast. Ferner bewirkt das vermehrt gebildete

Aldosteron eine Zunahme der Wasser- und Natriumretention, wodurch auch die Vorlast zunimmt (7). Die anfänglichen Kompensationsmechanismen verschlechtern also die Hämodynamik bei fortschreitender Erkrankung. Es werden mit der Zeit vermehrt natriuretische Peptide gebildet (u.a. brain natriuretic peptide=BNP) welche vasodilatatorisch und natriuretisch-diuretisch wirken. Am Herzen selber entwickelt sich eine Hypertrophie mit darauffolgender Dilatation, wodurch die kardiale Insuffizienz noch weiter verschlechtert wird. Kommt es zum Versagen von allen physiologischen und therapeutischen Kompensationsmöglichkeiten, um eine ausreichende kardiale Pumpleistung aufrechtzuerhalten, besteht eine dekompensierte Herzinsuffizienz. Die daraus resultierende Hypoperfusion der Nieren kann zu renalen Ischämien führen (6).

1.3.2. Typ 2: Das chronische kardioresnale Syndrom

Eine chronisch eingeschränkte Herzfunktion verursacht eine chronische Nierenerkrankung. Die nicht ausreichende Pumpleistung führt zu einer peripheren Minderperfusion mit den daraus resultierenden Durchblutungsminderungen der Niere (2). Die chronische Herzinsuffizienz entwickelt sich in einem Zeitraum von Monaten bis Jahren. Hier treten die gleichen Kompensationsmechanismen mit ähnlichen Folgen (s.o.) wie bei der akuten Herzinsuffizienz auf. Ferner entwickelt sich hier ein instabiler Flüssigkeitshaushalt. Durch eine sehr starke Diuretikagabe kann die Nierenfunktion noch weiter verschlechtert werden. Auf der anderen Seite führt eine Volumenüberladung zu einer Erhöhung des venösen Rückstroms bis hin in das Nierenvenensystem (5,6).

1.3.3 Typ 3: Das akute renokardiale Syndrom

Beim akuten renokardialen Syndrom führt ein akutes Nierenversagen zu einer kardialen Dysfunktion (2). Die akute Niereninsuffizienz ist definiert in der plötzlichen und abrupten Verschlechterung der renalen Funktion innerhalb von 48 Stunden. Es kommt zur Retention von stickstoffhaltigen Ausscheidungssubstanzen wie Harnstoff und Kreatinin sowie zu einer Dysregulation des Wasser- und Elektrolythaushalts (8). Dies kann durch die daraus folgende Überwässerung zu einem Lungenödem und schließlich zu einer beginnenden akuten Rechtsherzinsuffizienz führen. Ferner kommt es häufig durch die Elektrolytentgleisung zu einer Hyperkaliämie, welche Arrhythmien auslöst und sogar zum Herzstillstand führen kann.

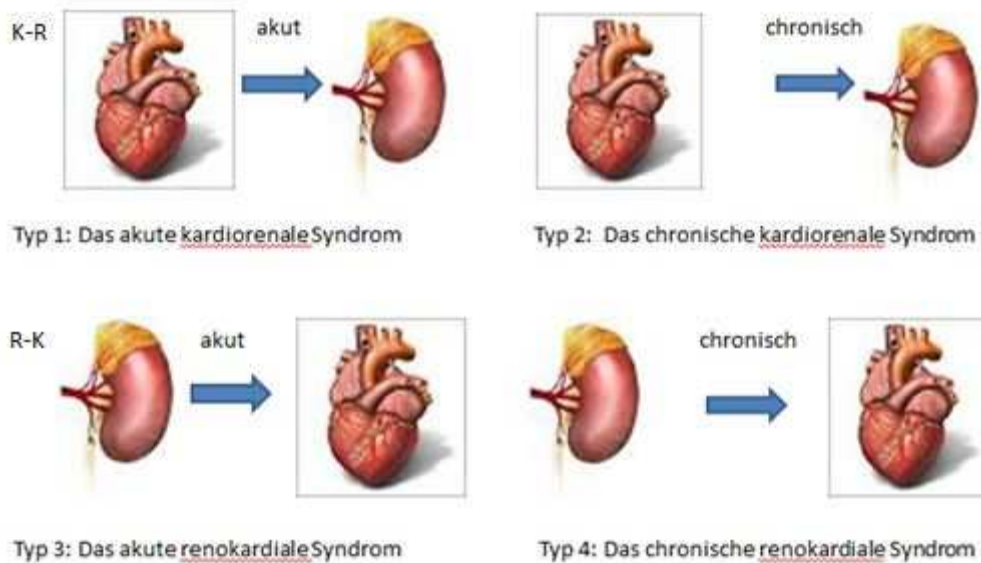
1.3.4. Typ 4: Das chronische renokardiale Syndrom

Eine chronische Nierenerkrankung verschlechtert die kardiale Funktion und erhöht das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse. Die linksventrikuläre Hypertrophie und die akzelerierte Artherosklerose können sich im weiteren Verlauf entwickeln (2). Die National Kidney Foundation (NKF) hat die chronische Niereninsuffizienz in 5 Stadien eingeteilt. Stadium 0 charakterisiert ein erhöhtes Risiko für eine Niereninsuffizienz. Eine Nierenschädigung bei normaler Nierenfunktion wird im Stadium 1 beschrieben. Stadium 2 kennzeichnet eine Nierenschädigung bei milder Niereninsuffizienz. Die mittelschwere und schwere Niereninsuffizienz sind in 4 und 5 dargestellt. Das Nierenversagen spiegelt sich im Stadium 5 wider. Das Ausmaß der Schädigung wird anhand der glomerulären Filtrationsrate bestimmt (5). Eine irreversible Verminderung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktionen beider Nieren führt zu einer chronischen Niereninsuffizienz.

1.3.5. Typ 5: Das sekundär kardioresnale Syndrom

Bei diesem Typ des kardioresnalen Syndroms können Systemerkrankungen wie autoimmunologische Dysfunktionen (Kollagenosen oder Vaskulitiden), eine Sepsis oder ein septischer Schock zu parallelen und unabhängigen Schädigungen von Herz und Nieren führen (2). Ein weiteres Beispiel ist der Diabetes mellitus. Dieser führt durch eine Makroangiopathie mit Früharteriosklerose zu einer koronaren Herzkrankheit. Außerdem führt die Mikroangiopathie zur diabetischen Nephropathie mit Entwicklung einer Glomerulosklerose (Morbus Kimmelstiel-Wilson) und unspezifischen vaskulären und tubulointerstitiellen Nierenveränderungen (5).

Verschiedene Typen des kardioresnalen Syndroms



Modifiziert nach Ronco, Chionh et al. (2)

1.4 Kardiorenale Biomarker

Seit einigen Jahren stehen neue kardiorenale Biomarker im Fokus, deren diagnostische und prognostische Werte bei der Herzinsuffizienz und beim Nierenversagen diskutiert werden. Zu diesen Markern zählen u.a. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), Kidney-Injury-Molecule I (KIM-1), N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG) und Interleukin-18 (Il-18), welche im Folgenden ausführlicher beleuchtet werden. NGAL, KIM-1 und NAG sind bei Patienten mit akutem Nierenversagen im Urin erhöht und weisen auf eine tubuläre Schädigung hin. Ferner sind sie früher beim akuten Nierenversagen messbar und sensitiver als Plasma-Kreatinin (9). Außerdem zeigen sich auch bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz erhöhte Urinkonzentrationen von NGAL, KIM-1 und NAG (10, 11).

1.4.1 Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)

NGAL wird mit einer Größe von 25 kDa zu den „low-molecular-weight-Proteinen“ gezählt, die zur Lipocalinfamilie gehören. Es wurde erstmals 1993 als Protein-Komplex mit MMP-9 (Matrix-Metalloproteinase-9) charakterisiert. Dieser Protein-Komplex konnte aus neutrophilen Granulozyten, nachdem diese bestimmten Stimuli ausgesetzt waren, isoliert werden (10). Ferner spielt NGAL (auch bekannt als Lipocalin-2 oder Siderocalin) eine Rolle bei der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen durch spezifische Bindungen von Eisen (12). Die Verbindung zwischen NGAL und renaler Schädigung wurde erstmals 2003 an einem Mausmodell dargelegt. Wenige Stunden nach einem ischämischen oder nephrotoxischen Ereignis in der Niere zeigen sich sowohl im Serum als auch im Urin erhöhte NGAL-Spiegel. Diese bestehen bereits 24 bis 48 Stunden vor erhöhten Serum-Kreatinin Werten. Ebenfalls zeigte sich bei Mäusen mit einer Cisplatin induzierten Nephrotoxizität eine deutlich erhöhte NGAL-Konzentration im Urin (13). Beim Menschen zeigte eine Studie von Jungbauer et al.

jedoch keine signifikante Korrelation zwischen Urinkonzentration und Schwere der chronischen Herzinsuffizienz und reduzierter linksventrikulärer Funktion (14). Allerdings bestehen weitere Studien, die den Nutzen von NGAL beim akuten Nierenversagen im Zuge der Herzinsuffizienz beschreiben. Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz aufgrund einer koronaren Herzkrankheit zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen Urin-NGAL und Serum-Kreatinin sowie zwischen Serum-NGAL und NYHA-Stadium (15). Ferner konnten Damman et al. zeigen, dass bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz erhöhte NGAL-Werte im Urin vorliegen, welche auch in positiver Korrelation zu Serum-Kreatinin- und -NT-pro-BNP-Konzentrationen stehen. Eine tubuläre Schädigung bei chronischer Herzinsuffizienz muss aufgrund erhöhter NGAL-Konzentrationen im Urin in Betracht gezogen werden (11). Bolignano et al. konnten außerdem demonstrieren, dass NGAL-Konzentrationen im Urin durchaus mit der Schwere der chronischen Herzinsuffizienz korrelieren. Hier wurde die höchste Konzentration bei Patienten im NYHA-Stadium 4 gefunden. Somit scheint NGAL auch einen prognostischen Wert in Bezug auf das Überleben bei chronischer Herzinsuffizienz zu haben (16). Eine aktuelle Studie von Jungbauer et al. hat gezeigt, dass NGAL bei Patienten mit einem akuten kardiorenenalen Syndrom signifikant erhöhte Urinkonzentrationen im Vergleich zu gesunden Patienten aufweist. In dieser Studie entwickelten mehr als ein Drittel von 60 Patienten, welche mit akuter dekompensierter Herzinsuffizienz stationär aufgenommen wurden, ein akutes Nierenversagen. Die erhöhten NGAL-Werte wurden zwei Tage nach Beginn der Therapie und einen Tag vor Kreatininanstieg detektiert. Diese Studie verdeutlicht, dass NGAL ebenfalls eine diagnostische Bedeutung für das akute kardiorenale Syndrom hat (17).

1.4.2 Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1)

KIM-1 ist ein transmembranöses Glykoprotein, welches zum Einen aus einer Immunglobulin-ähnlichen Domäne (mit einem Cystein-Rest) und zum Anderen aus einer Threonin-/Serin- und prolinreichen Domäne besteht. Letzteres ist charakteristisch für muzinähnliche O-glykolisierte Proteine. KIM-1 ist ebenfalls bekannt als Hepatitis A Viruszellrezeptor Typ 1 (18). In gesundem Nierengewebe lässt sich keine KIM-1-Expression feststellen; es finden sich hier auch keine KIM-1-Konzentrationen im Urin (18). Das Molekül wird in den Epithelien des proximalen Tubulus sowohl beim Menschen als auch bei Nagetieren nach ischämischer oder nephrotoxischer Schädigung exprimiert (18). Das lösliche KIM-1, welches im Urin erscheint, ist 90kDa groß (19). Es zeigt sich, dass KIM-1 im Vergleich zu Gesunden in höheren Konzentrationen im Urin bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz vorkommt. Außerdem zeigt KIM-1 eine positive und signifikante Korrelation mit NT-pro BNP bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und eine weitere positive Korrelation mit dem Alter. Mit zunehmender Schwere der Herzinsuffizienz (höheres NYHA-Stadium) sowie mit einer zunehmend schlechter werdenden linksventrikulären Funktion und mit einer erhöhten Flüssigkeitsretention steigt auch die KIM-1-Konzentration im Urin. Es besteht jedoch keine Korrelation zwischen KIM-1 und Kreatinin sowie mit der GFR. KIM-1 hat einen statistisch signifikant prognostischen Wert in Bezug auf die Gesamtmortalität der chronischen Herzinsuffizienz. KIM-1 kann somit dazu beitragen, diejenigen herzinsuffizienten Patienten zu erkennen, welche eine renale Dysfunktion und ein kardiorenales Syndrom entwickeln (14). Es gibt mehrere Charakteristika, warum KIM-1 als Biomarker für ein kardiorenales Syndrom in Frage kommt: Das Molekül zeigt einen signifikanten Anstieg bezogen auf die Schwere der chronischen Herzinsuffizienz bzw. des kardiorenenalen Syndroms. Zudem hat es einen

prognostischen Wert für das Gesamtüberleben und weist auf eine renal-tubuläre Mitbeteiligung bei chronischer Herzinsuffizienz hin (14).

1.4.3 Interleukin-18 (Il-18)

Il-18 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches konstitutiv in einer gesunden Niere im Bereich des distalen Konvoluts, des Verbindungstubulus und des Sammelrohrs exprimiert wird (20). In einer Fall-Kontroll-Studie zeigen sich bei Nierenerkrankungen erhöhte Il-18 Spiegel im Urin im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen (24). Diese erhöhten Il-18 Spiegel im Urin zeigen sich auch im zeitlichen Verlauf deutlich vor erhöhten Serum-Kreatinin Werten (22). Da Il-18 jedoch als proinflammatorisches Zytokin auch eine wichtige Rolle bei der Sepsis spielt, können die Il-18 Messungen von mehreren Variablen, wie beispielsweise Entzündungen und autoimmunologischen Erkrankungen beeinflusst werden. Es ist bekannt, dass Plasma Il-18-Spiegel bei einigen pathophysiologischen Zuständen, wie z.B. bei der entzündlichen Arthritis, bei entzündlichen Darmerkrankungen, beim systemischen Lupus erythematodes, bei Psoriasis, Hepatitis oder bei der multiplen Sklerose erhöht sind. Daher handelt es sich bei Il-18 um einen möglichen Biomarker für das kardiorenale Syndrom und insbesondere für akute Nierenerkrankungen; jedoch limitieren die proinflammatorischen Eigenschaften dieses Zytokins und dessen Hochregulation bei entzündlichen Erkrankungen den Nutzen in Bezug auf Sensitivität und Spezifität (8).

1.4.4 N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG)

NAG ist ein 130 kDa großes lysosomales Enzym der renalen Tubulusepithelien. Die proximalen Tubulusepithelien sezernieren regelmäßig während der physiologischen Exozytose geringe Mengen an NAG in den Urin. Eine erhöhte Aktivität des Enzyms im Urin würde also auf eine Schädigung im Bereich des proximalen Tubulus hinweisen. Ähnlich wie KIM-1 zeigt auch NAG

eine signifikante Korrelation mit der Schwere der chronischen Herzinsuffizienz. Bei Patienten mit NYHA-Stadium >3 und einer geschädigten linksventrikulären Funktion, lassen sich erhöhte NAG-Konzentrationen im Urin feststellen (14). Eine erhöhte NAG-Konzentration im Urin kann allerdings auch eine erhöhte lysosomale Aktivität ohne Zellschädigung anzeigen (23). Eine erhöhte urinale NAG Exkretion zeigte sich bei akuten Nierenerkrankungen unterschiedlicher Ätiologie, induziert durch toxische Stoffe, nach Herzoperationen oder nach Nierentransplantationen (24). Insgesamt lässt sich für NAG ein signifikanter prognostischer Wert bezüglich der Gesamtmortalität der Herzinsuffizienz feststellen (14). Ähnlich wie bei KIM-1 gibt es mehrere Charakteristika, warum NAG als Biomarker des kardioresalen Syndroms in Frage kommt: Das Molekül zeigt einen signifikanten Anstieg (jedoch weniger stark als KIM-1) bezogen auf die Schwere der chronischen Herzinsuffizienz bzw. des kardioresalen Syndroms. Zudem hat es einen prognostischen Wert für das Gesamtüberleben und weist auf eine renal-tubuläre Mitbeteiligung bei chronischer Herzinsuffizienz hin (14).

Die Analyse dieser neuen Biomarker, welche eine renal-tubuläre Schädigung bei Herzinsuffizienz indizieren, zeigt, dass die Niere eine wichtige Rolle bei der chronischen Herzinsuffizienz und beim kardioresalen Syndrom spielt. Die Prognose der Herzinsuffizienz hängt nicht nur vom Ausmaß der kardialen Schädigung, sondern auch von der Schwere einer Nierenschädigung ab. Renal-tubuläre Schädigungen sind nicht nur beim akuten Nierenversagen, sondern auch bei der chronischen Herzinsuffizienz vorhanden.

1.5 Vasopeptidase-Inhibitoren

In allen kardiovaskulären Erkrankungen besteht eine Dysbalance zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation mit einer erhöhten Tendenz zur Vasokonstriktion. ACE-Hemmer inhibieren durch Blockung des Angiotensin-Converting-Enzyms I die Entstehung von Angiotensin II, einer vasokonstriktorisch wirkenden Substanz. Vasopeptidase-Inhibitoren (VPIs) sind eine Klasse von Medikamenten, die zusätzlich zur Aktivität eines ACE-Hemmers die Unterbindung des Abbaus von natriuretischen Peptiden bewirken. Die Neutrale Endopeptidase (NEP) ist für den enzymatischen Abbau von natriuretischen Peptiden und Kininen hauptverantwortlich. Diese Stoffe besitzen vasodilatatorische Eigenschaften (25). VPIs hemmen sowohl die NEP, als auch das ACE (26). Diese Kombination vermindert somit die Vasokonstriktion und erhöht die Vasodilatation. Ein Medikament mit Eigenschaften eines VPIs ist also nützlich in der Behandlung des Bluthochdrucks und der Herzinsuffizienz. Mehrere klinische Studien haben die Effizienz der Vasopeptidase-Inhibitoren in der Therapie des Hypertonus dargelegt. Die Rolle dieser Medikamente bei der Herzinsuffizienz ist jedoch nicht eindeutig, da verschiedene Studien unterschiedliche Resultate demonstrieren haben (27). Allerdings führt eine Kombination aus NEP-Hemmung und Inhibition des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) zu weniger physiologischen, kompensatorischen Antworten als eine NEP-Hemmung allein (28). Eine alleinige Hemmung der NEP führt auch zu einer Kumulation von Endothelin, einer vasokonstriktorischen Substanz, welche von diesem Enzym auch abgebaut wird. Daher ist der zusätzliche Effekt der ACE-Hemmung essentiell (29). Ein wichtiger Vertreter der Vasopeptidase-Inhibitoren ist Omapatrilat, welches im Folgenden ausführlicher besprochen wird. Eine neue Variante der dualen RAAS- und NEP-Inhibition sind die sogenannten ARNI (Angiotensin-Rezeptor-Nephrylsin-Inhibitoren), z.B. die Substanz LCZ 696. Dieses ist ein Kombinationspräparat bestehend aus Valsartan (einem AT1-Blocker) und Sacubitril (einem

Nephrylsin-Inhibitor). In einer klinischen Studie von 2012 konnte gezeigt werden, dass dieses Präparat bei Patienten mit Herzinsuffizienz die Konzentration an NT-proBNP deutlich stärker reduzierte als es ein AT1-Blocker allein tut. Ob diese Effekte jedoch einen langzeitigen Nutzen darstellen, muss in weiteren Studien getestet werden (30). Eine aktuelle Studie von 2014 verglich auch den Nutzen von LCZ 696 mit Enalapril. Diese Studie wurde vorzeitig gestoppt, da sich LCZ 696 im Vergleich zu Enalapril deutlich überlegen zeigte in Bezug auf Mortalität und Hospitalisierung bei Herzinsuffizienz (31).

1.5.1 Omapatrilat

Omapatrilat ist ein Mercaptoacyl-Derivat eines bityklischen Thiazepinon-Dipeptids. Es ist ein einzelnes Molekül mit gleicher Potenz und Affinität zur ACE- und NEP-Hemmung. Omapatrilat ist effektiv in der Therapie des Bluthochdrucks und in deutlich geringerem Ausmaß in der Behandlung der Herzinsuffizienz (28). In der Monotherapie reduziert Omapatrilat in über 65% der behandelten Patienten den Blutdruck. Da dieses Medikament ein sehr gutes Toleranzprofil zeigt, kann es auch bei schwierigen Patienten in der Behandlung eines systolischen Hypertonus oder beim Diabetes eingesetzt werden (32). Die Pharmakokinetik von Omapatrilat zeigt, dass eine einmal-tägliche Dosierung für einen antihypertensiven Effekt von über 24 Stunden ausreicht. Ferner wird sowohl bei Patienten mit niedrigen Renin-Konzentrationen, als auch bei Patienten mit hohen Renin-Konzentrationen der Blutdruck herabgesetzt. Dies lässt auf eine Unabhängigkeit des Renin-Angiotensin-Systems schließen. Beim Herabsetzen des systolischen und diastolischen Blutdrucks zeigt Omapatrilat eine ähnliche und zum Teil bessere Effektivität als Lisinopril oder Amlodipin. Allerdings scheint die Wirkung auf den systolischen Blutdruck noch effektiver zu sein als auf den diastolischen (33, 34). In der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz konnte gezeigt werden, dass Omapatrilat hier

keinen wesentlichen prognostischen Vorteil gegenüber der Wirkung eines ACE-Hemmers hat. Eine frühzeitige Therapie mit Omapatrilat kann jedoch kardiales Remodelling verhindern und vermindert die linksventrikuläre BNP-Expression. Eine rechtzeitige Behandlung mit einem Vasopeptidase-Inhibitor stellt eine vielversprechende neue Therapie der chronischen Herzinsuffizienz dar (34).

1.6 Fragestellung

Die Fragestellungen dieser Arbeit sind:

- ob die vier genannten kardiorenenalen Biomarker im Nierengewebe der herzinsuffizienten Kaninchen nachweisbar sind,
- ob eine differenzielle Expression dieser Marker im Vergleich zu den gesunden Tieren vorliegt,
- ob differenzielle Expressionen in der renalen Medulla oder im renalen Cortex zu beobachten sind,
- ob die renale Expression der neuen Biomarker mit dem Ausmaß der Herzinsuffizienz (BNP-Expression, Pumpfunktion) korreliert
- und ob der Vasopeptidase-Inhibitor Omapatrilat einen Einfluss auf die renale Expression der Marker hat.

2 Material und Methoden

2.1.1 Nierengewebe

Es wurden Nierengewebsproben der Kaninchenrasse *Oryctolagus cuniculus* (Chinchilla bastard) untersucht, die bereits aus Vorversuchen stammten. Bei 9 Kaninchen war mittels Schrittmacher eine tachykardie-induzierte Herzinsuffizienz ausgelöst worden. Innerhalb der herzinsuffizienten Gruppe wurden 4 Tiere mit Omapatrilat behandelt. 5 Kaninchen dienten als gesunde Kontrolle. Von jedem Tier waren zwei Nierengewebsproben vorhanden, jeweils eine Probe aus dem Nierencortex und eine weitere aus der Nierenmedulla.

2.1.2 Das Progressive left ventricular dysfunction Modell (PLVD-Modell)

Das PLVD-Modell wurde entwickelt, um bei Kaninchen in einer gewissen Zeit eine schrittmacher-induzierte Herzinsuffizienz zu erzeugen. Die Kaninchen aus denen die hier untersuchten Nierengewebsproben stammen wurden solch einem Modell unterzogen. Dabei wurden bei den Tieren nach Schrittmacher-Implantation in einem Zeitraum von ca. 30 Tagen unter Schrittmacherkontrolle Herzfrequenzen beginnend bei 330 bpm (beats per minute) bis hin zu 380 bpm induziert. Das Ziel dieses Modells war es, zunächst eine frühe links-ventrikuläre Dysfunktion (ELVD) zu induzieren, welche im weiteren Verlauf zur chronischen Herzinsuffizienz führt. Die ELVD ist definiert durch einen signifikanten Verlust der links-ventrikulären systolischen Funktion mit kardialer Dilatation, jedoch ohne klinische Zeichen einer Herzinsuffizienz (35).

2.1.3 Primerdesign

PCR-Primer sind normalerweise 15-30 Nukleotide lang. Der GC-Inhalt beträgt 40-60 %, und diese Nukleotide sollten einheitlich auf der gesamten Länge des Primers verteilt sein. Der

Primer sollte weder selbst-komplementär, noch komplementär zu einem anderen Primer in der Reaktion sein, um zum Beispiel die Ausbildung von Primer-Dimeren zu verhindern. Für die Abschätzung der Schmelztemperatur (T(m)) wird folgende Formel verwendet:

$$T(m) = 4(G+C) + 2(A+T) [^{\circ}\text{C}]$$

G,C,A und T entsprechen dabei der Anzahl der entsprechenden Nukleotide im Primer. In dieser Arbeit wurde das Primer-Design mittels SOP ("qPCR primer design for non-human, not fully annotated genome sequences (e. g. rabbit *Oryctolagus cuniculus*") erstellt. Zunächst erfolgte ein Abgleich der Gennomenklatur der Human Genome Organization (HUGO) (36). Anschliessend wurde die entsprechende Sequenz über den Genome Browser der Genome Bioinformatics Group of the University of California Santa Cruz (UCSC) abgerufen (37).

HUGO-Gennamen:

KIM-1 = HAVCR1 (hepatitis A virus cellular receptor 1, 5q33.2, Synonyms: TIM-1)

NGAL = LCN2 (lipocalin 2, 9q34, Synonyms: NGAL)

NAG = NAGLU (N-acetylglucosaminidase, alpha 17q21.2 Synonyms: NAG)

IL-18 = IL18 (interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor) 11q22.2-q22.3 Approved Symbol: IL18)

Im letzten Schritt erfolgte das Mapping der jeweiligen Sequenzen auf dem Kaninchen-Genom.

2.2 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurden der Qiagen Kit RNeasyMini (Nr. 74104) und der RNase-Free DNase Set (Nr. 79254) verwendet.

Das bei -80°C gelagerte Gewebe wurde zunächst auf Trockeneis gelegt. Anschließend wurde jede Gewebeprobe in saubere Folien gewickelt und mit einem Hammer zerkleinert. Ca. 30 mg

jeder Probe wurden dann in ein Homogenisator-Röhrchen gegeben. Vor der Homogenisierung wurden zur vollständigen Lyse der Gewebszellen in jedes Röhrchen 600 µl RLT Puffer der Firma Qiagen (enthält β-Mercaptoethanol) pipettiert. Im nächsten Schritt wurden die Röhrchen schließlich in den Homogenisator FastPrep24 der Firma MP-Biomedicals (manual Fast Prep 116004-500) gestellt, und es erfolgte die Homogenisierung der Gewebsproben. Daraufhin wurde das entstandene Lysat 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Cups pipettiert.

Zu jedem Überstand wurde im Folgenden 600 µl 70%-iger Ethanol hinzugegeben und mit diesem gemischt. Anschließend erfolgte die Übertragung der Lösung auf eine Qiagen-Säule (in einem 2 ml Cup stehend). Nach zweimaliger Zentrifugierung (jeweils 15 Sekunden bei 8000g) wurde der Durchfluss verworfen und die Säulen mit 700 µl RW1 Puffer gewaschen. (Firma Qiagen). Nach einer weiteren Zentrifugierung (wieder 15 s bei 8000g) wurden 80 µl DNase-Lösung auf die Säulen gegeben. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurde erneut 700 µl RW1 Puffer gewaschen. Anschließend kam es zur erneuten Zentrifugierung (s.o.) und zur Waschung mit 500 µl RPE-Puffer (Firma Qiagen). Dieses wurde dann noch einmal wiederholt. Im letzten Schritt der Reinigung wurden die Säulen 2 Minuten lang bei 8000g nochmals zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugierung wurden die Säulen in frische 1,5 ml Cups gestellt. Damit die Eluation der RNA erfolgen konnte, wurden 40 µl RNase-freies Wasser auf die Mitte der Membranen der Säulen pipettiert. Die Säulen wurden kurz bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann eine Minute lang bei 8000g zentrifugiert. Die gelöste RNA befand sich nun im 1,5 ml Cup. Zur Lagerung wurde sie bei -80°C eingefroren.

2.3 RNA-Vermessung

Bevor mit der gewonnenen RNA weitergearbeitet werden konnte, musste von jeder Probe die RNA-Konzentration bestimmt werden. Dies geschah mittels NanoDrop 1000 Spektrophometer (Firma Thermo Scientific). Hierzu wurde das Messgerät zunächst mit autoklaviertem H₂O gewaschen und einem Kleenex abgetrocknet. Anschließend erfolgte die Vermessung von 1 µl gelöster RNA. Die RNA-Konzentration wurde in ng/µl angegeben.

2.4 Transkription in cDNA

Damit die Genexpression der kardioresalen Marker KIM-1, NGAL, NAG und IL-18 mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestimmt werden konnte, musste die gewonnene RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dies geschah mit Hilfe der Reversen Transkriptase.

Es wurde zunächst ein Mastermix angefertigt, welcher aus folgenden Reagenzien bestand:

- a. 1 µl dNTPs (Promega PCR Nucleotide Mix 10 mM Nr. C114H)
- b. 4 µl 5 x Puffer (Promega M-MLVRT 5 x Buffer Nr. M531A)
- c. 1 µl Reverse Transkriptase (Promega M-MLVRT Nr. M170B 200 Units)
- d. 1 µl RNasin (Promega RNase Inhibitor Nr. N211B)
- e. 3 µl autoklaviertes H₂O

Für die Umschreibung wurde dann folgender Ansatz angesetzt:

- a. x µl RNA (je nach RNA-Konzentration entsprechend 1 µg)
- b. 1 µl Oligo-dT Primer (Promega Random Primer Nr. C118A)
- c. y µl autoklaviertes H₂O (auffüllen auf insgesamt 10 µl)

Dieser Ansatz wurde gemischt und zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine 3-minütige Inkubation bei 70°C. Nach diesem Schritt wurden dann zu jeder Probe 10 µl Mastermix (s.o.) gegeben, sodass ein Endvolumen von 20 µl entstand. Diese Lösung wurde wieder gemischt und zentrifugiert. Im Folgenden erfolgte eine weitere Inkubation für eine Stunde bei 37°C. Nach dieser Stunde wurde die Lösung sofort für weitere 2 Minuten bei 95°C inkubiert (dadurch wurde die Aktivität der Reversen Transkriptase gestoppt). Im letzten Schritt wurde die entstandene cDNA-Lösung mit autoklaviertem H₂O (Volumen = 130 µl) auf ein Endvolumen von 150 µl aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

Zur Überprüfung einer korrekten Transkription lief von einer RNA-Probe ein „Reverse-Transkriptase-Minus“-Ansatz mit. Dies bedeutet, dass in einem angefertigten Mastermix anstelle der Reverse-Transkriptase 1 µl autoklaviertes H₂O hinzugegeben wurde.

2.5 Real-Time-PCR mittels TaqMan

Für die Real-Time-PCR mittels TaqMan (Firma Bio-Rad) wurden von jeder Probe 6 µl cDNA der ursprünglichen 150 µl cDNA-Lösung verwendet. Ferner wurden die jeweiligen Primer (forward + reverse) für KIM-1, NGAL, NAG, Il-18 und HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) als Referenzgen hinzugeben. 10 µl der ursprünglichen Konzentration jeder Forward- und Reverse-Primerlösung (100 µM) wurden mit 190 µl autoklaviertem H₂O auf 200 µl verdünnt. Damit enthielten die endgültigen Primerlösungen 5 µM jedes Primers, wovon jeweils 1 µl in der PCR eingesetzt wurde.

Die Primersequenz für KIM-1 lautet:

Forward Primer: 5' –GGTCTCTACCTATGCTCATC- 3'

Reverse Primer: 5' –CAAAGGTCATCTGAAGACT- 3'

Die Primersequenz für NGAL lautet:

Forward Primer: 5' –AACCTGGGCAACATCAAGAG- 3'

Reverse Primer: 5' –TGGCATACTGGCTGTAGTCG- 3'

Die Primersequenz für NAG lautet:

Forward Primer: 5'-GGCCATCTGGCAACGGGTGT-3'

Reverse Primer: 5'-TAGCGGTAGCTGTGGGGCCT-3'

Die Primersequenz für Il-18 lautet:

Forward Primer: 5' –GAGGATATGCCCGATTCTGA- 3'

Reverse Primer: 5' –AGAGAGGCTTACAGCCATGC- 3'

Die Primersequenz für HPRT lautet:

Forward Primer: 5' –CGGCCCGTTATGGCGACTC- 3'

Reverse Primer: 5' –ACACCCTTTCCAAGTCCTCGACGTA- 3'

Ferner wurde für die TaqMan-PCR ein Fluoreszenzfarbstoff benötigt. Hierzu wurde SYBR Green I (Firma Molecular Probes, Inc.) verwendet. Insgesamt ergab sich in der Gesamtheit ein PCR-Reaktionsvolumen von 20 µl. Dieses setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

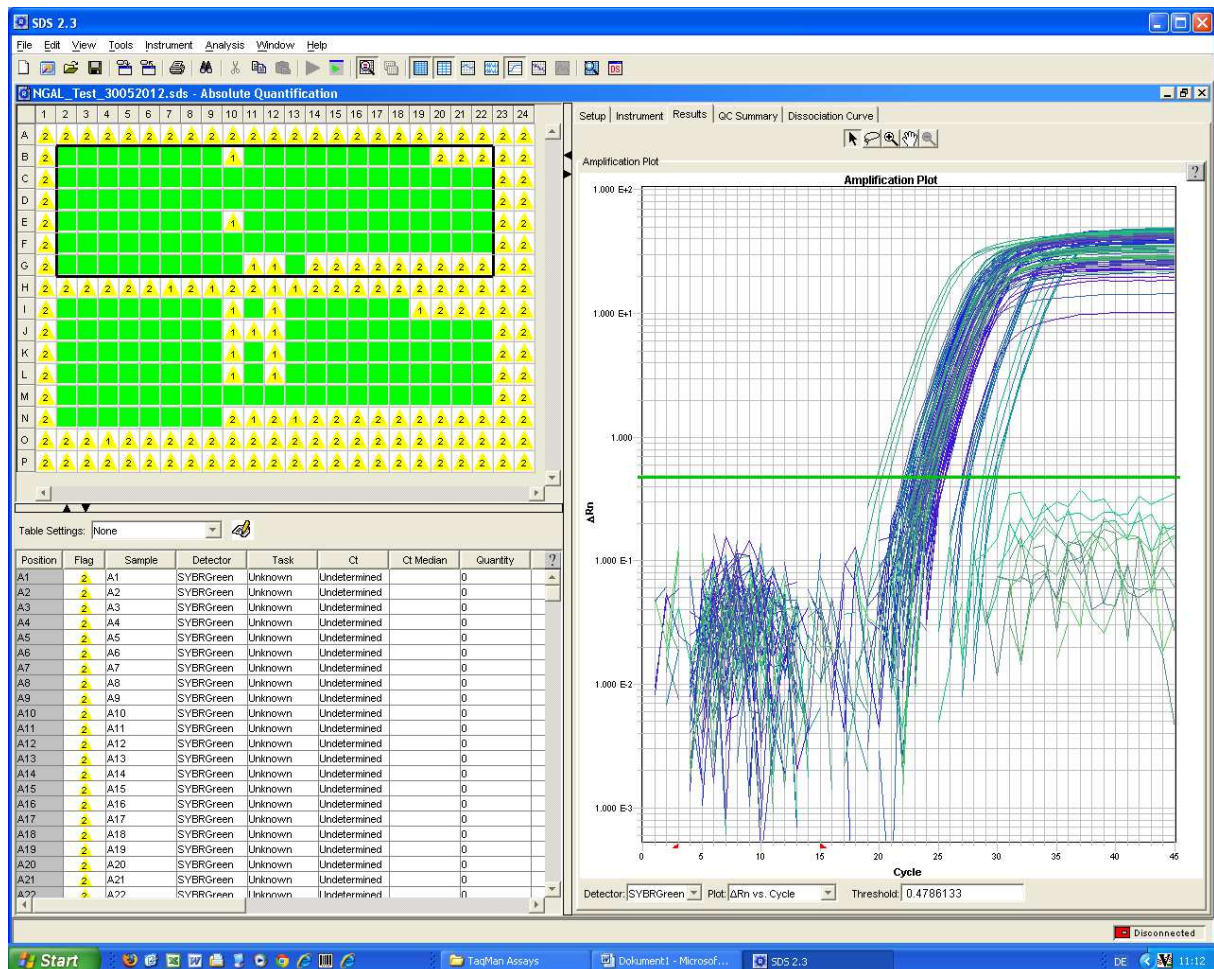
- a. 6 µl Template cDNA
- b. 10 µl SYBR Green I
- c. 1 µl Forward-Primer
- d. 1 µl Reverse-Primer

e. 2 µl autoklaviertes H₂O

Um die Reproduzierbarkeit der PCRs zu überprüfen, wurden für jeden der vier zu untersuchenden Marker (KIM-1, NGAL, NAG und Il-18) insgesamt drei Real-Time-PCRs durchgeführt, innerhalb derer jede cDNA-Probe dreifach untersucht wurde. Als Referenzgen wurde in jedem Versuch HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) verwendet. Dadurch wurde die Expression des jeweiligen Zielgens normalisiert. Für die Auswertung der Experimente erfolgte in jeder Reaktion die Erstellung einer Standardkurve der jeweiligen Zielgene und von HPRT. Hierfür wurde aus den unterschiedlichen cDNA-Proben ein cDNA-Pool erstellt. Für die PCR wurden dann 6 µl der unverdünnten cDNA, 6 µl einer 1:10, 6 µl einer 1:100 und 6 µl einer 1:1000-verdünnten cDNA eingesetzt sowie autoklaviertes H₂O. Diese Standards wurden am Ende der PCR logarithmisch gegen ihre jeweiligen CT-Werte aufgetragen (der CT-Wert beschreibt den PCR-Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt). Die Quantität der einzelnen Proben konnte so anhand der jeweiligen CT-Werte abgelesen werden.

Die Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte mittels der „Relativen-Standardkurven-Methode“ und statistisch mittels Mann-Whitney-U-Test.

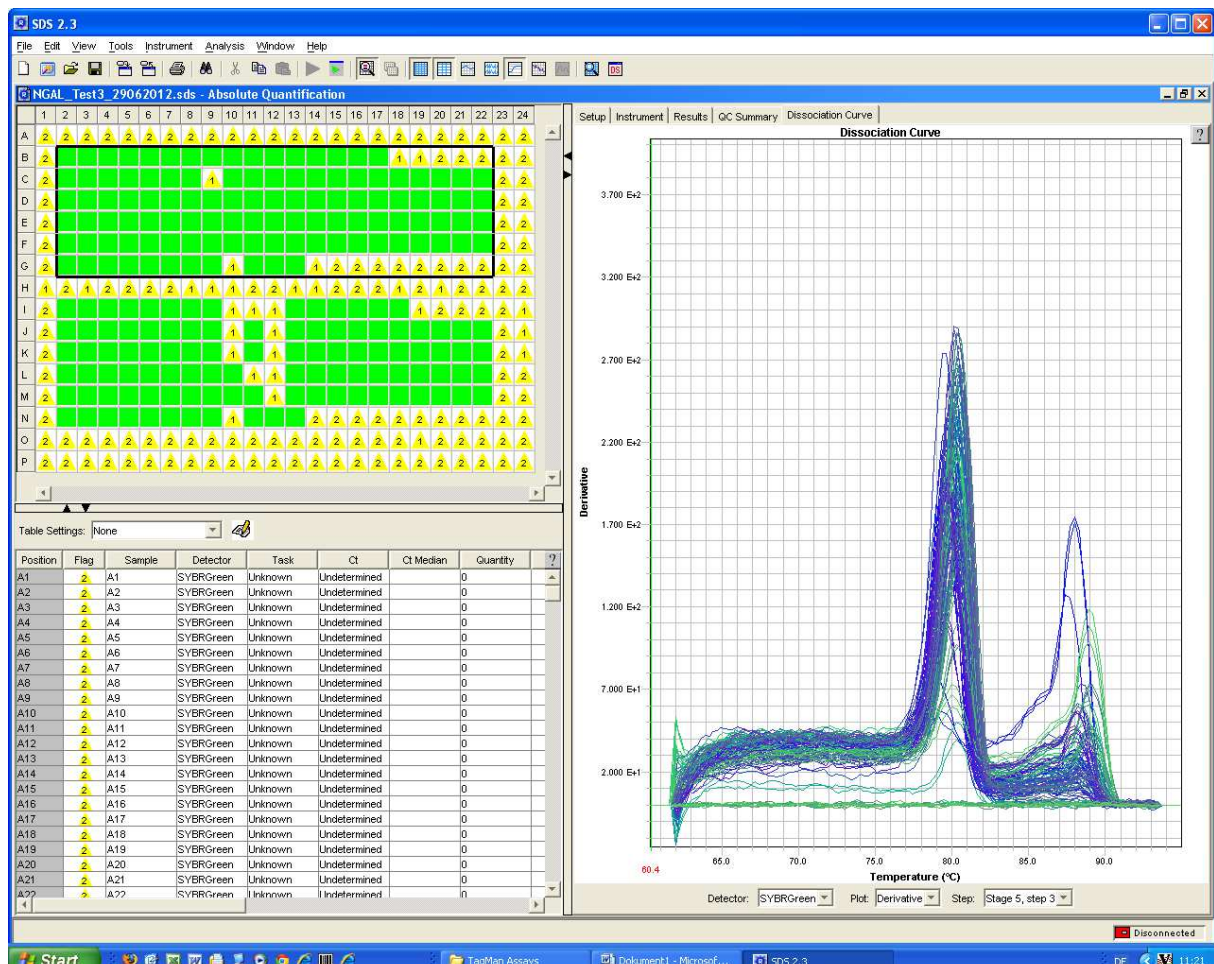
Am Beispiel der NGAL-Ergebnisse wird im Folgenden die Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time-PCR dargestellt.



Die Grafik zeigt die Fluoreszenzkurve für NGAL. In dieser quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge an gebildeten PCR-Produkten zu, wodurch eine Quantifizierung des Zielgens möglich wird. Auf der Abszisse sind die jeweiligen PCR-Zyklen repräsentiert; auf der Ordinate wird die Zunahme des Fluoreszenzsignals dargestellt. Zu Beginn einer PCR ist die DNA-Menge begrenzt (Startphase). Zum Schluss einer PCR ist die DNA-Menge der Zielsequenz so stark angestiegen, dass immer häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren und so die PCR hemmen (Plateauphase). Zwischen Startphase und Plateauphase liegt die exponentielle Phase, in der sich die Zielsequenz unter optimalen Bedingungen verdoppelt. Der Anfang der exponentiellen Phase wird zur Quantifizierung benutzt. Dabei wird der Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig

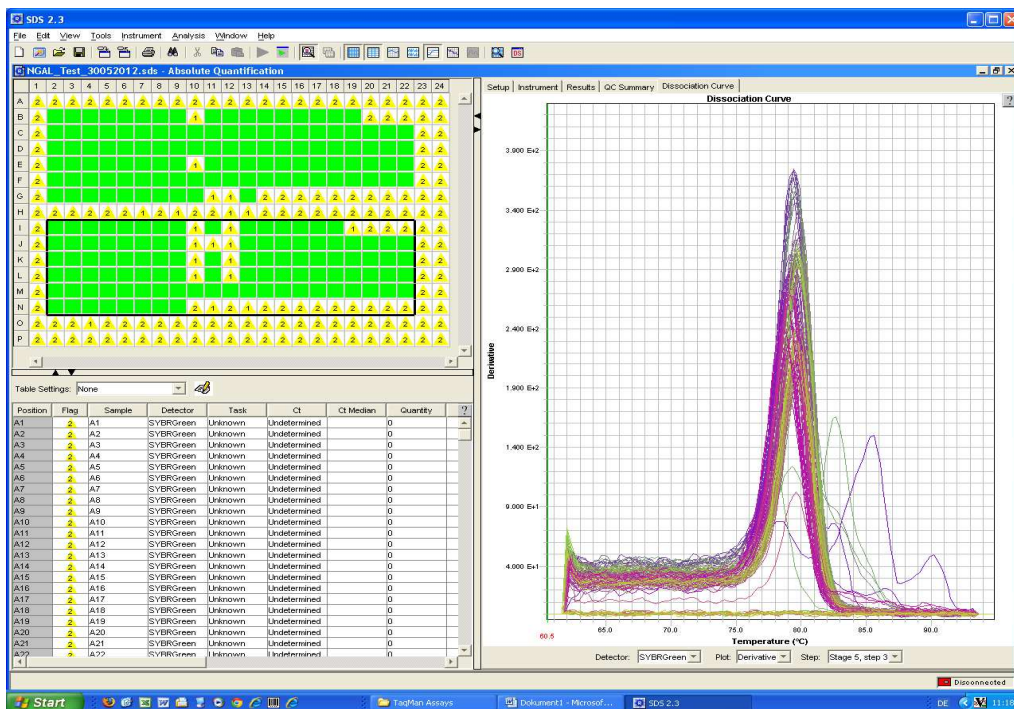
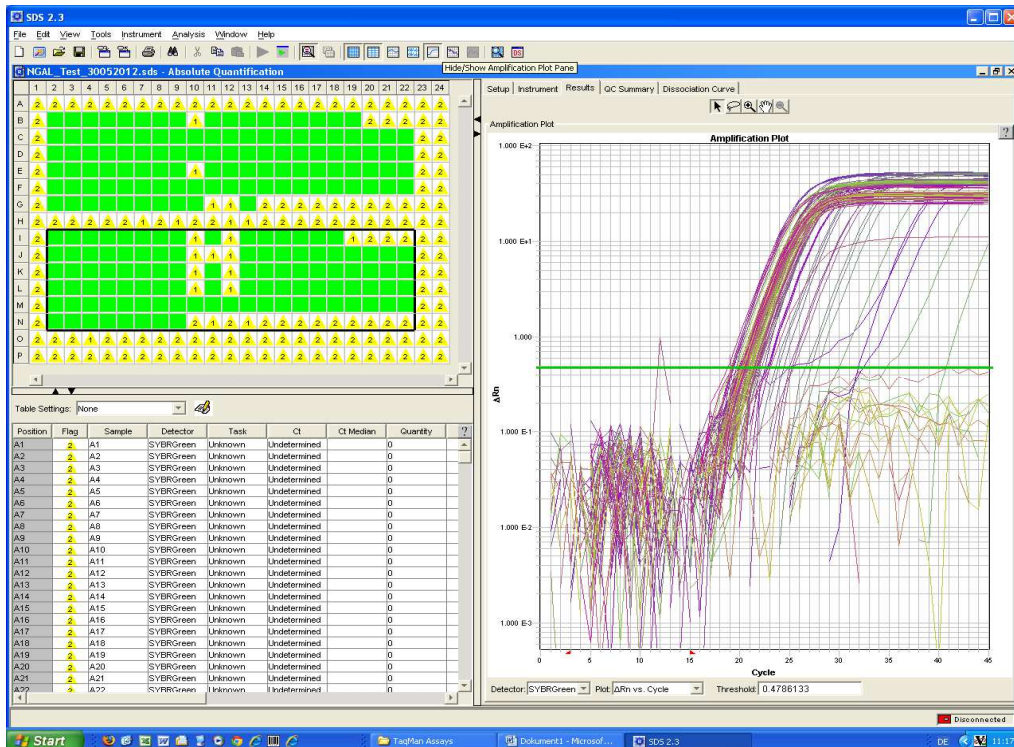
signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt als CT-Wert (=Threshold-Cycle = Schwellenwertzyklus = grüne Linie) angegeben.

Um die Spezifität des amplifizierten PCR-Produktes zu beurteilen, wird das DNA-Fragment durch kontinuierliche Temperaturerhöhung aufgeschmolzen. Die Schmelzpunktanalyse zeigt nur den Peak des Zielgens. Bei dieser Reaktion hat der Farbstoff (SYBR Green I) nicht nur mit der NGAL-Zielsequenz, sondern auch mit Primer-Dimern oder PCR-Beiprodukten reagiert. Dieses weitere PCR-Fragment hat nun einen zusätzlichen Peak mit einem geringeren Schmelzpunkt verursacht (siehe Abbildung unten).

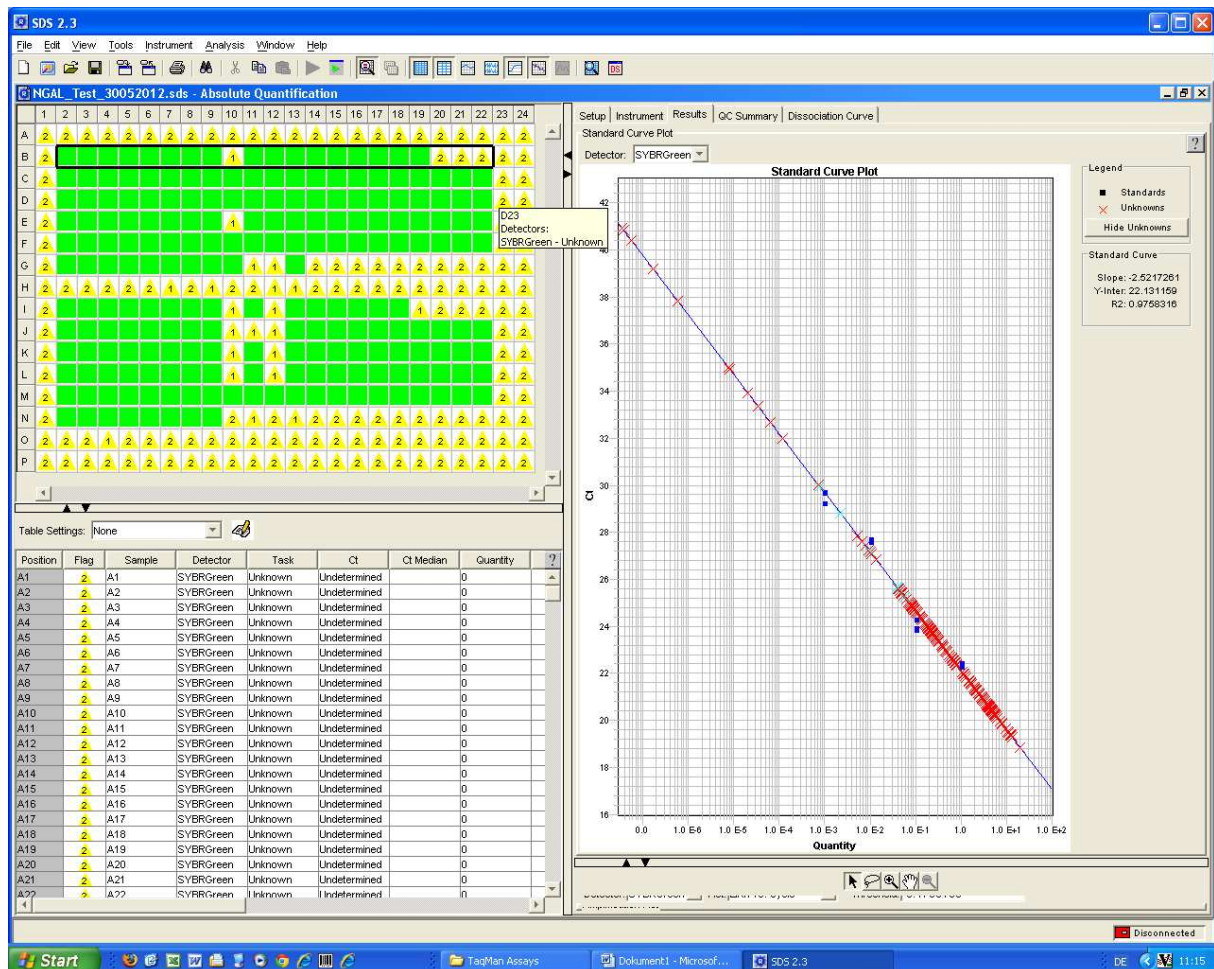


Es wird ebenfalls eine Kontrolle, beispielsweise ein zusätzliches internes Gentranskript oder ein externes Referenzgen, gemessen. Die Expression von NGAL wird mit diesem Referenzgen

(housekeeping gen) normalisiert, indem die Signale des Referenzgens verwendet werden, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA-Probe auszugleichen. In diesem Versuch wird Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase (HPRT) als Referenzgen verwendet, welches zu der neuen Generation von Referenzgenen gehört. Im Folgenden sind auch Fluoreszenz- und Schmelzkurve von HPRT gezeigt.

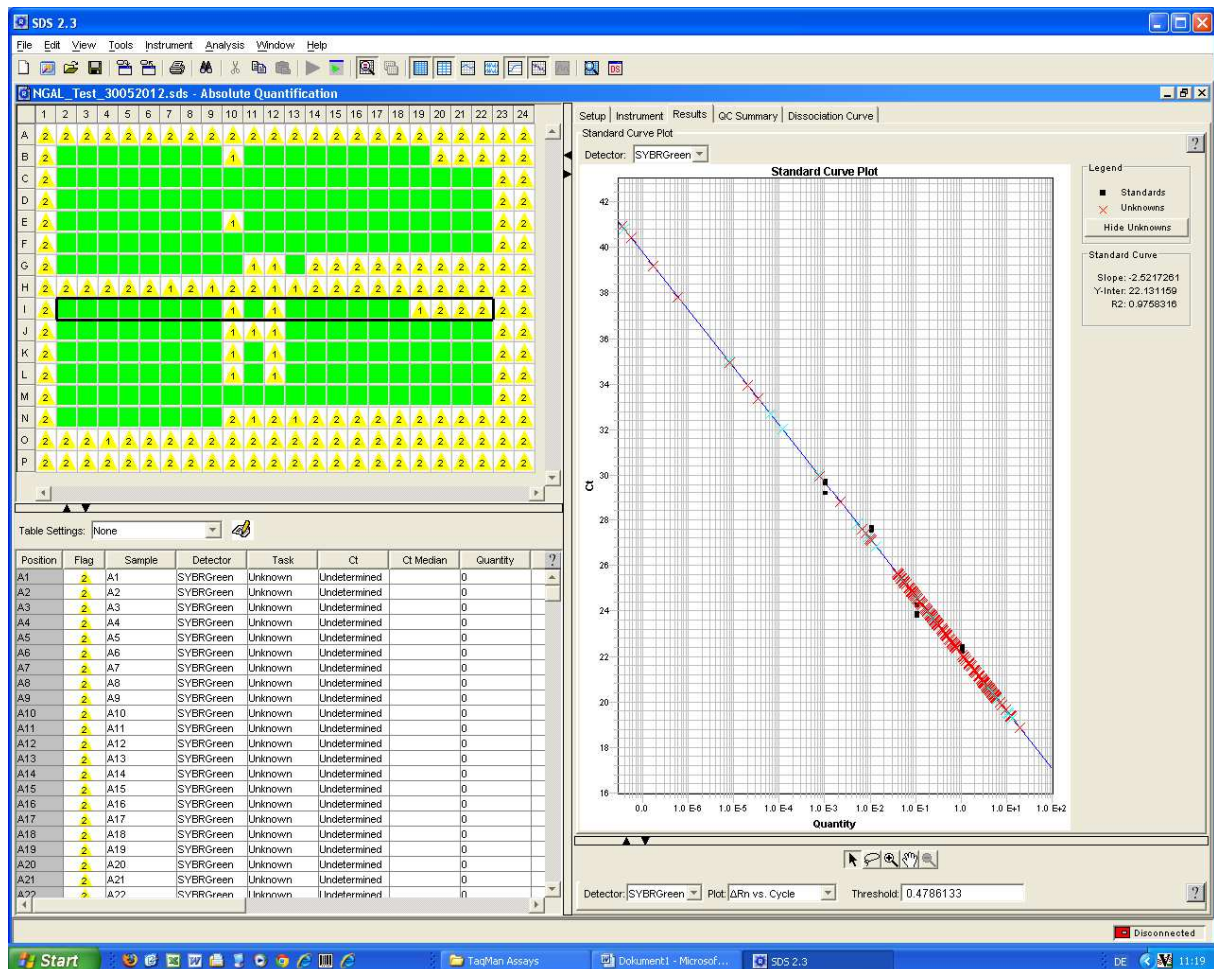


Die PCR-Auswertung erfolgt mit Hilfe der „Relativen-Standard-Methode.“ Hierbei wird zunächst eine Standardkurve von NGAL erstellt:



Die bekannten Konzentrationen der Standards (in diesem Fall Proben aus einem cDNA-Pool) auf der Abszisse werden gegen ihren CT-Wert (Ordinate) aufgetragen und so eine Standardkurve erstellt. Die unbekanntes cDNA-Konzentrationen können über ihren jeweiligen CT-Wert abgelesen werden (siehe obige Abbildung). In dieser Standardkurve sind die CT-Werte logarithmisch gegen die Konzentrationen (= Quantitäten, eine dimensionslose Größe) der verdünnten Standards aufgetragen. Standards: blaue Punkte; Proben: rote Punkte.

Da auch die CT-Werte vom Referenzgen HPRT in die Berechnung miteingehen, wird auch für dieses eine Standardkurve erstellt:



Für die Auswertung mittels relativer Standardmethode wird zunächst der Mittelwert der Quantitäten des Zielgens und des Housekeepers gebildet. Der Mittelwert des Zielgens wird in Verhältnis zum Mittelwert des Housekeepers gesetzt; also $M(\text{NGAL}/\text{HPRT})$.

Der daraus resultierende Wert wird wiederum in Verhältnis zum $M(\text{NGAL}/\text{HPRT})$ einer anderen Gruppe gesetzt (krank/gesund). Der daraus resultierende Wert wird als FOLD bezeichnet. Beispiel: $\text{FOLD } (X/Y)=1$ bedeutet, dass in X und Y gleich viel Expression ist; $\text{FOLD } (X/Y)>1$ bedeutet, dass in X mehr Expression ist als in Y; $\text{FOLD } (X/Y)<1$ bedeutet, dass in Y mehr Expression ist.

2.6 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Nun musste überprüft werden, ob es sich bei den PCR-Produkten tatsächlich um die gesuchten Zielsequenzen der zu untersuchenden Biomarker handelte. Hierzu musste eine Klonierung und Sequenzierung durchgeführt werden, doch zunächst war es nötig eine Gelelektrophorese durchzuführen, um die erwartete Größe der Produkte anhand der Banden auf dem Gel zu beurteilen. Es wurde ein 2%-iges Agarosegel verwendet. In 120 ml TBE-Puffer wurden 2,4 g Agarosepulver gelöst. Als Farbstoff wurden 120 µl SYBR Safe hinzugegeben. Anschließend musste das Gel ca. 15 Minuten aushärten. Die Kammern wurden mit 20 µl eines PCR-Produktes der jeweiligen Marker gefüllt. Damit die PCR-Produkte auch entlang des Gels laufen konnten wurde zusätzlich in jede Kammer 4 µl Loading Dye gegeben. Als Standard (Volumen= 8 µl) wurde der Gene Ruler Low Range DNA Ladder der Firma Thermo Scientific verwendet.

2.7 Gelextraktion

Die bei der Gelelektrophorese entstandenen Banden mussten nun für die Klonierung aus dem Gel extrahiert werden. Hierzu wurde das QIAquick Gel Extraction Kit Protocol der Firma Qiagen verwendet. Mit Hilfe eines Skalpell wurde das DNA-Fragment zunächst aus dem Gel herausgeschnitten. In einem 1,5 ml Cup wurde das herausgeschnittene Fragment (nachdem QG-Puffer der Firma Qiagen hinzugegeben wurde) bei 50°C für ca. 20 Minuten inkubiert. Danach hatte sich das Fragment komplett aufgelöst und die Farbe der Lösung war gelb. Anschließend wurden 100 µl Isopropanol zu der Lösung hinzugegeben. Im nächsten Schritt wurde die Lösung auf eine QIAquick-Säule gegeben, welche sich in einem 2 ml Cup befand. Es folgte eine ein-minütige Zentrifugation. Zum Waschen wurden im Folgenden 0,75 ml PE-Puffer (Firma Qiagen) auf die Säule gegeben und wieder zentrifugiert. Schließlich wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Cup gestellt. Um die DNA zu eluieren, wurden 50 µl EB-Puffer (Firma Qiagen)

auf die Mitte der Membran der Säule gegeben. Es folgte eine letzte Zentrifugation und die eluierte DNA befand sich nun im 1,5 ml Cup.

2.8 Klonierung mittels TOPO 2.1 Vektor und Transformation in DH5 α

Die Klonierung des DNA-Fragments erfolgte mit Hilfe des TOPO 2.1 Vektors (pCR 2.1-TOPO) der Firma Invitrogen. Der Klonierungsansatz wurde in chemisch kompetente Escherichia coli (Stamm DH5 α , Invitrogen) gegeben. Für den Klonierungsansatz wurden folgende Reagenzien gewählt:

- a. 0,5 – 4 μ l PCR-Produkt (eluierte DNA)
- b. 1 μ l Salt Solution (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl₂)
- c. a.d. (auf gesamt 5 μ l auffüllen)
- d. 1 μ l TOPO-Vektor (Endvolumen: 6 μ l)

Dieser Ansatz wurde vorsichtig bei Raumtemperatur gemischt, für ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Die kompetenten E. coli wurden auf Eis getaut. 2 μ l des Klonierungsansatzes wurden in 50 μ l kompetente Zellen pipettiert und durch vorsichtiges Rühren gemischt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurde der neue Ansatz für 30 Sekunden in ein 42°C Wasserbad und dann wieder auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurden 250 μ l S.O.C. Medium (Firma Invitrogen) zugegeben. Die Cups wurden nun für eine Stunde (liegend auf einem Schüttler) bei 37°C geschüttelt. Für die folgende Inkubation wurden auf LB-Amp Platten (c_{Ampicillin}= 50 μ g/ml) der Firma Sigma Aldrich 40 μ l Blue/White-select (Sigma B3928-20°C) ausgestrichen, antrocknen gelassen und bei 37°C vorgewärmt. Nun wurden auf zwei LB-Amp-Platten je 30 μ l und 10 μ l des Transformationsansatzes ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 15 von den auf den Platten entstandenen Kolonien gepickt und jede Kolonie wurde über die darauffolgende Nacht in 5 ml LB-Amp geschüttelt. Am darauffolgenden Tag musste die klonierte DNA aus jeder der 15 entstandenen Kulturen isoliert werden. Hierzu wurde das Plasmid-Isolationskit NucleoSpin Plasmid QuickPure 240615 (Firma Machery und Nagel) verwendet. Zunächst wurden 3 ml aus jeder Kultur zentrifugiert und dekantiert. Das entstandene Pellet wurde gemäß Protokoll (www.mn-net.com) in 250 µl Puffer A1 resuspendiert, und anschließend wurden zu jeder Probe 250 µl Puffer A2 gegeben. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt bis die Flüssigkeit klar war. Im nächsten Schritt wurden 300 µl Puffer A3 hinzugegeben, und es folgte eine weitere Zentrifugation. Als nächstes wurden 750 µl des entstandenen Überstandes auf eine Säule (welche sich in einem 2 ml Cup befand) pipettiert. Diese wurde danach zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen, und es folgte die Zugabe von 450 µl Puffer AQ. Nach einer weiteren Zentrifugierung wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Cup gestellt. Im letzten Schritt der DNA-Isolierung wurden 50 µl Elutions-Puffer AE auf die Mitte der Membranen der Säulen pipettiert. Nach einer letzten Zentrifugation befand sich die Lösung der klonierten Plasmid-DNA nun im 1,5 ml Cup.

Bevor die entstandene Plasmid-DNA zum Sequenzieren geschickt wurde, erfolgte ein Probeverdau der Plasmid-DNA mittels der Restriktionsendonuklease EcoRI. Dieser Schritt diente der Absicherung, dass die Klonierung funktioniert hatte. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz pro Probe (insgesamt 15 Proben) gewählt:

- a. 1 µl Plasmid-DNA
- b. 1 µl EcoRI
- c. 2 µl Puffer

d. 15 µl a.d.

Nach einstündiger Inkubation wurden 10 µl jeder Probe auf ein Agarose-Gel (siehe 2.6) aufgetragen und es erfolgte anschließend eine Gelelektrophorese.

2.9 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden drei der Plasmid-cDNA Proben an die Firma Eurofins Genomics gesendet. Jede Probe hatte ein Volumen von 15 µl und eine cDNA-Konzentration von 50 – 100 ng/µl.

2.10 Korrelation der NGAL-und Il-18-Expression mit der BNP-Expression und der linksventrikulären Pumpfunktion

Um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der renalen NGAL-und Il-18-Expression und der Schwere der Herzinsuffizienz besteht, wurden statistische Korrelationsanalysen zwischen der NGAL-und Il-18-Expression und der kardialen BNP-Expression sowie zwischen der NGAL-und Il-18-Expression und dem Fractional Shortening (als Maß für die Pumpfunktion) durchgeführt. BNP-Werte und Fractional Shortening wurden im Vorfeld bei der Durchführung und Charakterisierung des PLVD-Modells (s.o.) bestimmt. In diese Datenerhebung gingen nur die Werte der gesunden und der herzinsuffizienten nicht medikamentös behandelten Tiere mit ein.

2.11 Immunhistochemie

Neben der Charakterisierung der kardiorenenalen Marker auf Genebene sollte nun auch ein Nachweis auf Proteinebene mittels Immunhistochemie erfolgen. Hierzu wurden allerdings andere Gewebsschnitte verwendet als jene, aus denen die RNA extrahiert wurde. Insgesamt standen 8 Paraffinschnitte zur Verfügung, von denen 5 Proben eine künstliche Herzinsuffizienz

induziert wurde. Innerhalb dieser kranken Gruppe wurden 2 Tiere mit Omapatrilat behandelt und weitere 3 Tiere erhielten ein Placebomedikament. Es erfolgte eine indirekte Immunhistochemie. Als Primärantikörper wurden die gegen humanes Lipocalin beziehungsweise Il-18 gerichteten Antikörper Anti-LCN2 und Anti-Il-18 verwendet. Als Sekundärantikörper wurden biotinylierte horse anti-mouse- und anti-goat-Antikörper verwendet.

Zunächst mussten die Paraffinschnitte entparaffiniert werden. Dazu wurden sie jeweils 2x 10 Minuten in Xylol, 2x 5 Minuten in 100%igem Ethanol, 2x 5 Minuten in 96%igem Ethanol und 2x 5 Minuten in 76%igem Ethanol gelegt. Anschließend wurden die Schnitte mit PBS-Puffer gewaschen. Im nächsten Schritt mussten die Schnitte demaskiert werden. Hierzu wurden 300 ml a.d. und 3 ml Antigen Unmasking H-3300 Solution (Firma Vector Laboratories) aufgeköcht, die Schnitte wurden hineingestellt und 10 Minuten lang bei 630 Watt nochmals aufgeköcht. Danach wurden die Schnitte 15 Minuten lang abgekühlt. Als nächstes musste das endogene Biotin geblockt werden. Der Avidin/Biotin Block Kit SP-2001 (Firma Linaris) wurde dazu verwendet. Es wurde zuerst Avidin auf die Schnitte gegeben und in der feuchten Kammer für 15 Minuten inkubiert. Es folgte eine Waschung mittels PBS, und dann wurde Biotin auf die Schnitte gegeben, welches ebenfalls 15 Minuten inkubiert werden musste. Nach einer weiteren PBS-Waschung wurden auf jeden Schnitt 200 µl SuperBlock (Thermo Scientific/Pierce, Nr. 37515) gegeben, um unspezifische Antigene des Gewebes zu blocken. Dieses wurde für 30 Minuten inkubiert. Nach Abkippung des SuperBlocks wurden auf jeden Schnitt 200 µl des verdünnten Primärantikörpers gegeben. Die Verdünnung bei Anti-LCN2-AK betrug 1:100; bei Anti-Il18-AK 1:300. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Schnitte wieder mit PBS gewaschen und anschließend wurden auf jeden Schnitt 200 µl des verdünnten Sekundärantikörpers gegeben. Hier betrug die Verdünnung 1:250 und

die Inkubationszeit eine Stunde. Es folgte eine PBS-Waschung. Nun wurden gemäß Hersteller-Protokoll (www.vectorlabs.com/data/protocols/AK-5000.pdf) auf jeden Schnitt des Vectastain ABC-AP Kits (Firma Vector Laboratories) 200 µl gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Der Kit bestand aus 1 ml PBS, 15 µl Reagenz A und 15 µl Reagenz B. Es folgte eine PBS-Waschung. Für die Substratentwicklung wurden auf jeden Schnitt 200 µl Permanent AP Red Kit (Firma Zytomed Systems) pipettiert. Die benutzte Lösung wurde aus 500 µl AP Red Puffer und 8 µl Chromogen frisch hergestellt. Die Schnitte wurden für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden sie mit a.d. abgespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaunlösung (Firma Merck Millipore) für ca. 5 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte kurz in Salzsäurealkohol und in a.d. geschwenkt. Danach erfolgte eine 30-minütige Bläuung mit Leitungswasser. Im vorletzten Schritt wurden die Schnitte nochmals kurz in die Alkoholreihe (70/96/100%) und in Xylol gegeben. Im letzten Schritt wurden die Schnitte in DePeX (Firma Serva) eingedeckt.

3 Ergebnisse

3.1 NGAL-Expression

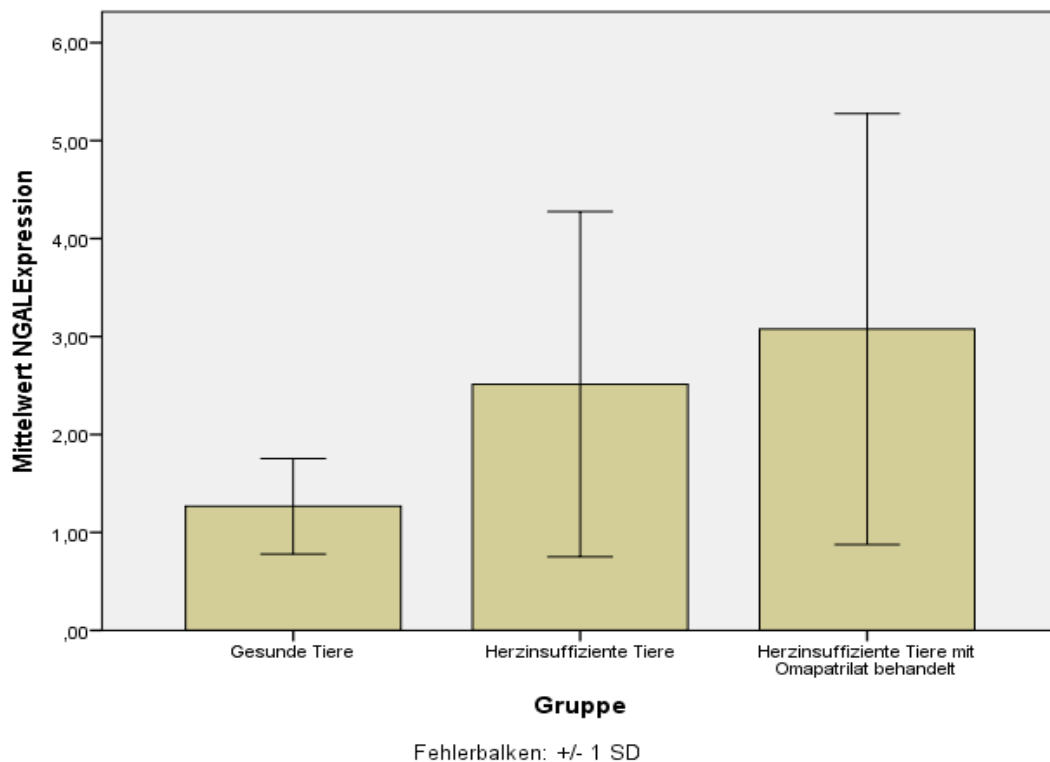
Die PCRs wurden anhand von drei biologischen Replikaten (Proben) und drei technischen Replikaten (Wiederholungsmessungen) pro Gewebeprobe und Tier durchgeführt. Die Sequenzierungsergebnisse zeigen, dass es sich bei der amplifizierten Sequenz tatsächlich um die gesuchte NGAL-Sequenz handelt. In den für NGAL durchgeführten PCR-Reihen zeigte dieser Marker eine eindeutige und stabile Expression.

HPRT konnte ebenfalls in der Sequenzierung detektiert werden.

3.1.1 Grafische Darstellung der quantitativen Ergebnisse

Die folgenden Grafiken stellen dar, wie sich die NGAL-Expression zwischen den jeweiligen Gruppen unterscheidet.

Cortex

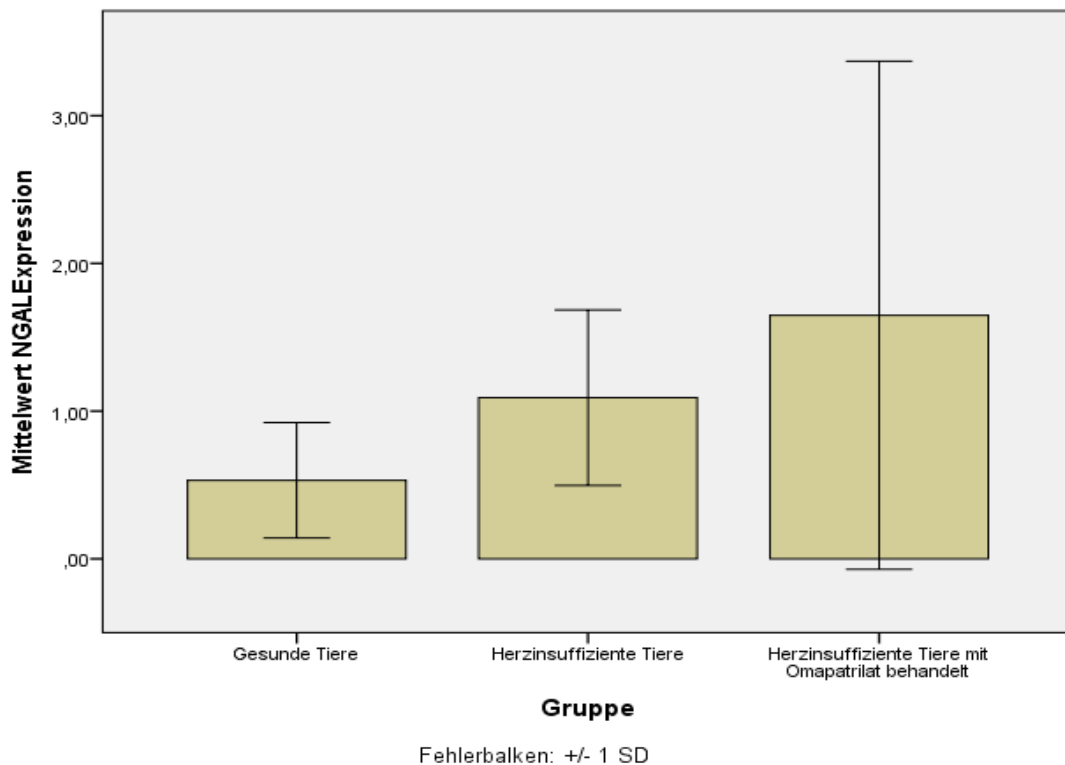


Balkendiagramm, welches die cortikale NGAL-Expression der verschiedenen Gruppen anhand der gemittelten Quantitäten darstellt ($p =$ nicht signifikant).

Diese Grafik berücksichtigt nur diejenigen Nierengewebsproben, welche aus dem Cortex stammen ($n=14$, davon $n_{\text{gesunde Tiere}}=5$, $n_{\text{herzinsuffiziente Tiere}}=5$, $n_{\text{herzinsuffiziente Tiere mit Omapatrilat behandelt}}=4$). Die NGAL-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDS zeigen, dass die höchste NGAL-Expression bei den kranken Tieren, welche mit Omapatrilat behandelt wurden, vorliegt (FOLD (Herzinsuffizienz mit Omapatrilat/Herzinsuffizienz)=1,5; FOLD (Herzinsuffizienz mit Omapatrilat/Gesund)=2,5), gefolgt von den kranken ohne Medikation (FOLD (Herzinsuffizienz/Gesund)=1,9). Die niedrigste Expression liegt bei den gesunden Tieren vor. Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte keine Signifikanz

zwischen den unterschiedlichen NGAL-Expressionen nachgewiesen werden ($p =$ nicht signifikant).

Medulla

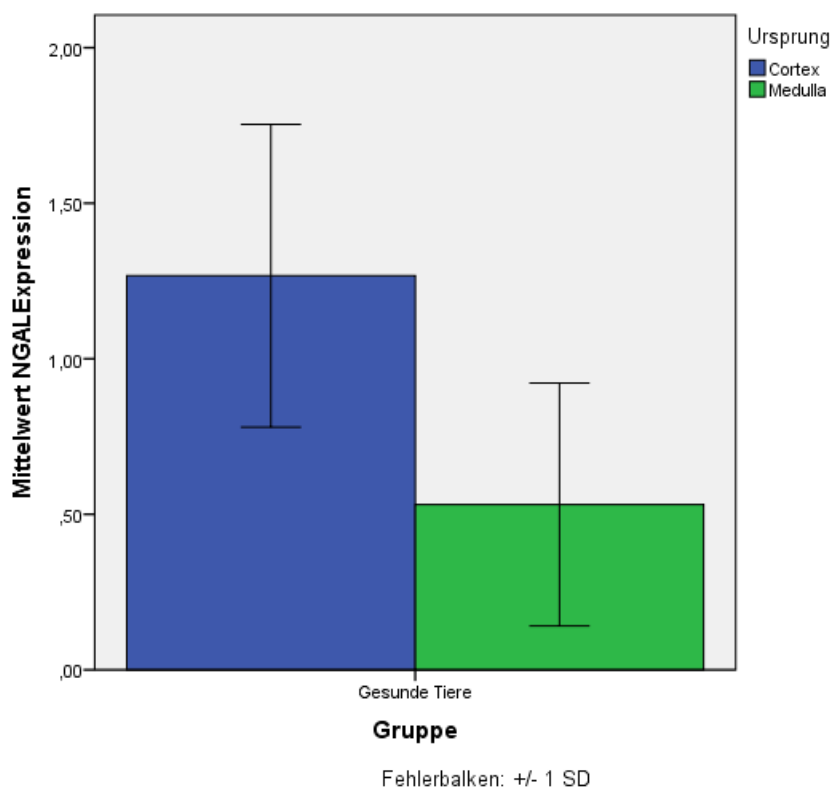


Balkendiagramm, welches die medulläre NGAL-Expression der verschiedenen Gruppen anhand der gemittelten Quantitäten darstellt ($p =$ nicht signifikant).

Diese Grafik berücksichtigt nur diejenigen Nierengewebsproben, welche aus der Medulla stammen ($n=14$, davon $n_{\text{gesunde Tiere}}=5$, $n_{\text{Herzinsuffiziente Tiere}}=5$, $n_{\text{Herzinsuffiziente Tiere mit Omapatrilat behandelt}}=4$). Die NGAL-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDS zeigen, dass die höchste NGAL-Expression ebenfalls bei den kranken Tieren, welche mit Omapatrilat behandelt wurden, vorliegt (FOLD (Herzinsuffizienz mit Omapatrilat/Herzinsuffizienz)=1,2; FOLD (Herzinsuffizienz mit Omapatrilat/Gesund)=3), gefolgt von den kranken ohne Medikation

(FOLD (Herzinsuffizienz/Gesund)=2,4). Die niedrigste Expression liegt bei den gesunden Tieren vor. Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte keine Signifikanz zwischen den unterschiedlichen NGAL-Expressionen nachgewiesen werden ($p =$ nicht signifikant).

Gesunde Tiere



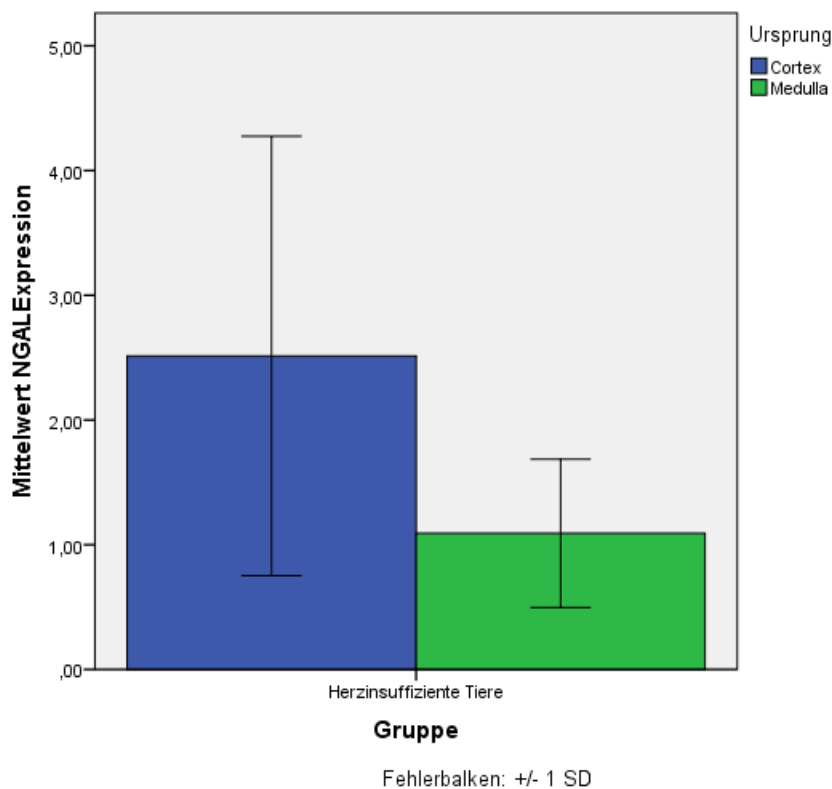
Balkendiagramm, welches die NGAL-Expression der gesunden Tiere anhand der gemittelten Quantitäten darstellt.

Differenziert wird hierbei zwischen Cortex und Medulla ($p < 0,04$).

Diese Grafik berücksichtigt nur diejenigen Nierengewebsproben der gesunden Tiere ($n=10$, davon $n_{\text{Cortex}}=5$, $n_{\text{Medulla}}=5$). Die NGAL-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDS zeigen, dass die höhere NGAL-Expression ebenfalls im Cortex vorliegt (FOLD (Cortex/Medulla)=2,8). Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test

konnte eine Signifikanz zwischen den unterschiedlichen NGAL-Expressionen in Cortex und Medulla nachgewiesen werden ($p < 0,04$).

Herzinsuffiziente Tiere

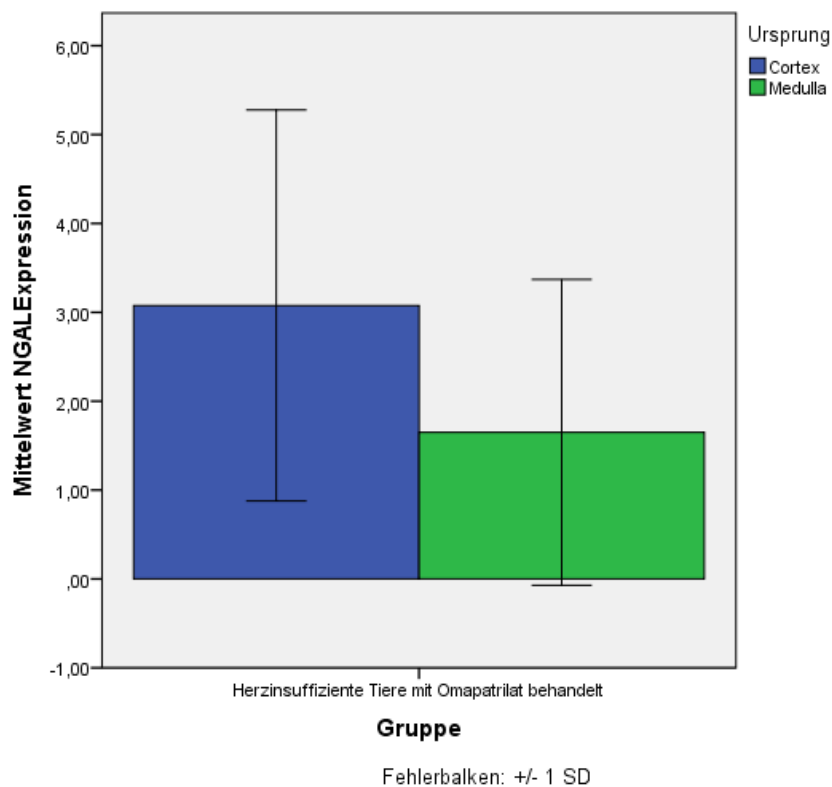


Balkendiagramm, welches die NGAL-Expression der herzinsuffizienten Tiere, welche ohne Omapatrilat behandelt worden sind, anhand der gemittelten Quantitäten darstellt. Differenziert wird hierbei zwischen Cortex und Medulla ($p =$ nicht signifikant).

Diese Grafik berücksichtigt nur diejenigen Nierengewebsproben der herzinsuffizienten Tiere, welche nicht mit Omapatrilat behandelt worden sind ($n=10$, davon $n_{\text{Cortex}}=5$, $n_{\text{Medulla}}=5$). Die NGAL-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDS zeigen, dass die höhere NGAL-Expression ebenfalls im Cortex vorliegt (FOLD (Cortex/Medulla)= 1,8). Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte keine Signifikanz zwischen

den unterschiedlichen NGAL-Expressionen in Cortex und Medulla nachgewiesen werden ($p =$ nicht signifikant).

Herzinsuffiziente Tiere mit Omapatrilat behandelt

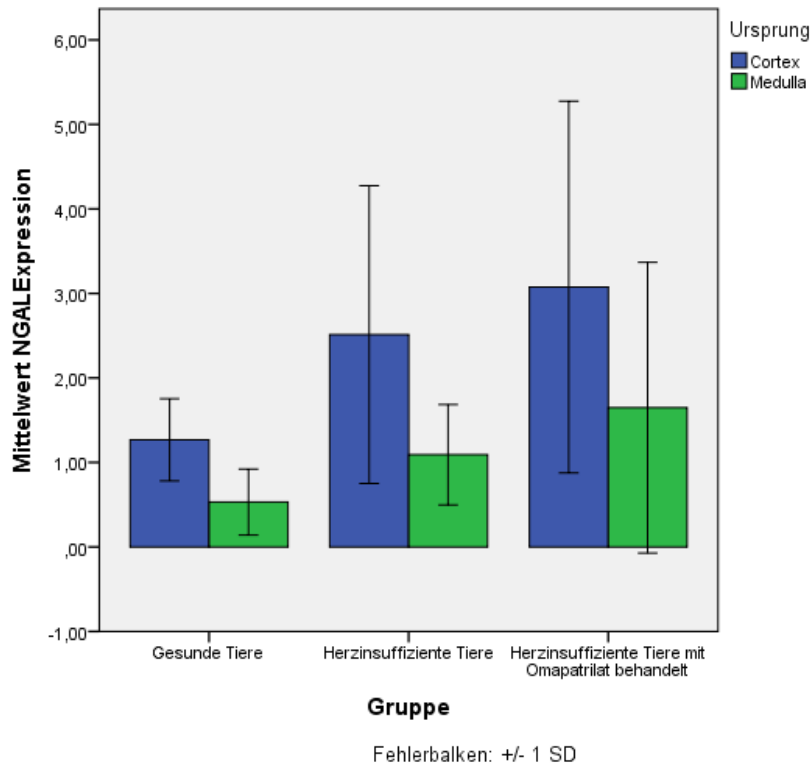


Balkendiagramm, welches die NGAL-Expression der herzinsuffizienten Tiere, welche mit Omapatrilat behandelt worden sind, anhand der gemittelten Quantitäten darstellt. Differenziert wird hierbei zwischen Cortex und Medulla ($p =$ nicht signifikant).

Diese Grafik berücksichtigt nur diejenigen Nierengewebsproben der herzinsuffizienten Tiere, welche mit Omapatrilat behandelt worden sind ($n=8$, davon $n_{\text{Cortex}}=4$, $n_{\text{Medulla}}=4$). Die NGAL-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDS zeigen, dass die höhere NGAL-Expression im Cortex vorliegt (FOLD (Cortex/Medulla)= 2,1). Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte keine Signifikanz zwischen den unterschiedlichen NGAL-

Expressionen in Cortex und Medulla nachgewiesen werden ($p =$ nicht signifikant).

Grafische Zusammenfassung der quantitativen Ergebnisse

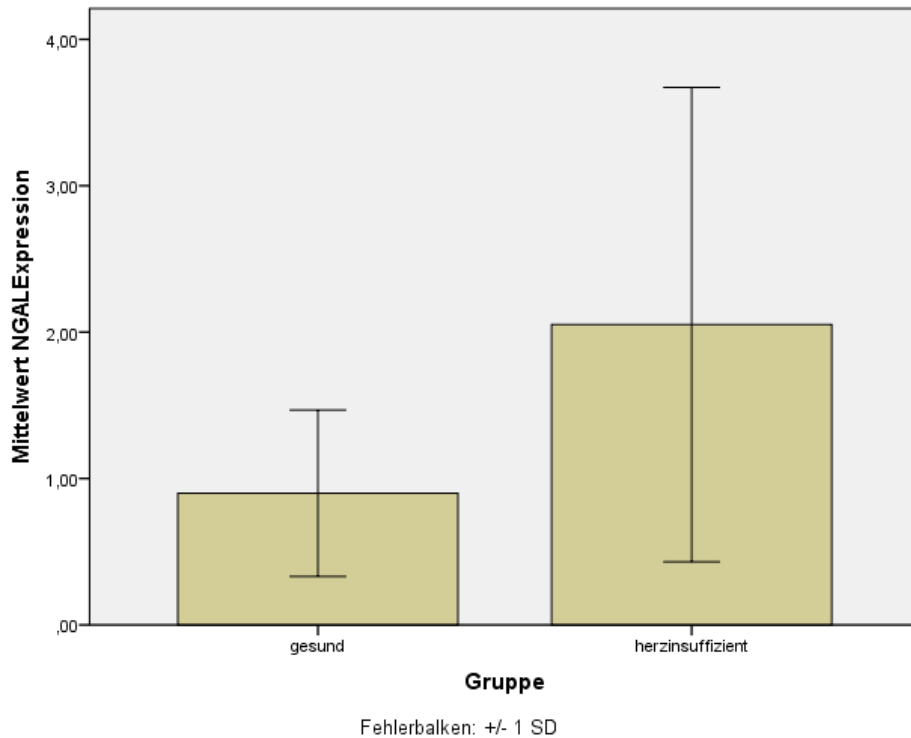


Es zeigt sich eine durchgängig stärkere Expression von NGAL im Cortex gegenüber der Medulla. Zudem lässt sich sowohl im Cortex als auch in der Medulla bei den herzinsuffizienten Tieren eine höhere NGAL-Expression feststellen im Vergleich zu den gesunden Tieren. Bei den herzinsuffizienten mit Omapatrilat behandelten Tieren finden sich in Cortex und Medulla eine nur geringgradig stärkere Expression von NGAL gegenüber den nicht behandelten herzinsuffizienten Tieren. Die genannten Unterschiede sind allerdings, mit Ausnahme der unterschiedlichen cortikalen und medullären NGAL-Expression innerhalb der gesunden Gruppe, nicht signifikant.

Die folgenden Grafiken fassen die herzinsuffizienten nicht medikamentös und die

medikamentös behandelten Tiere zu einer Gruppe zusammen und vergleichen diese bezüglich der NGAL-Expression mit der gesunden Gruppe.

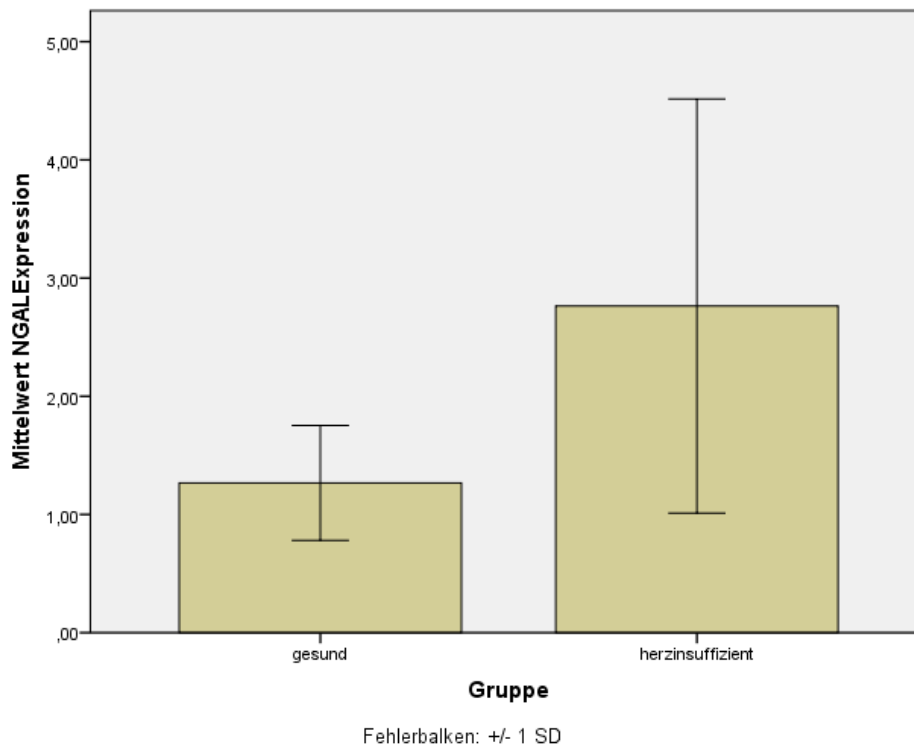
Cortex und Medulla



Balkendiagramm, welches die NGAL-Expression aller herzinsuffizienten Tiere (sowohl medikamentös, als auch nicht medikamentös behandelt) anhand der gemittelten Quantitäten im Vergleich zu den gesunden Tieren darstellt. Es wird dabei nicht zwischen Cortex und Medulla differenziert ($p < 0,05$).

Diese Grafik berücksichtigt alle untersuchten Nierengewebsproben von herzinsuffizienten und gesunden Tieren ($n = 28$, davon $n_{\text{gesund}} = 10$, $n_{\text{herzinsuffizient}} = 18$). Die NGAL-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDS zeigen, dass die höhere NGAL-Expression bei den herzinsuffizienten Tieren vorliegt (FOLD (herzinsuffizient/gesund)= 2,7). Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte eine Signifikanz zwischen den unterschiedlichen NGAL-Expressionen nachgewiesen werden ($p < 0,05$).

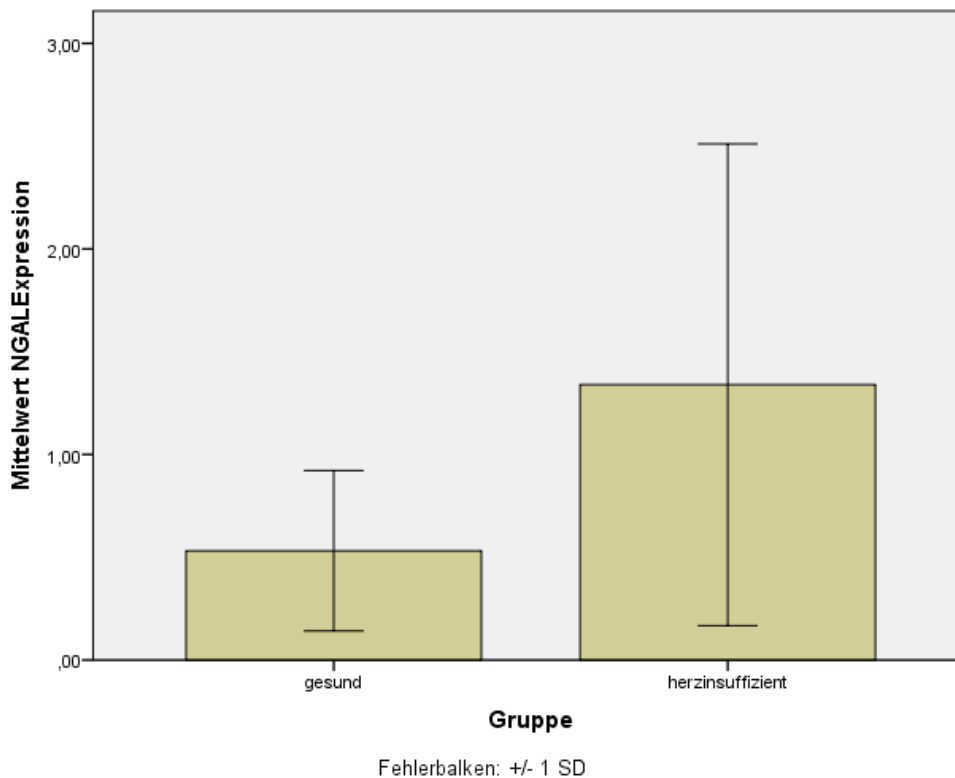
Cortex



Balkendiagramm, welches die NGAL-Expression aller herzinsuffizienten Tiere (sowohl medikamentös, als auch nicht medikamentös behandelt) anhand der gemittelten Quantitäten im Vergleich zu den gesunden Tieren darstellt. Es handelt sich dabei nur um die aus dem Cortex stammenden Gewebsproben ($p = \text{nicht signifikant}$).

Diese Grafik berücksichtigt alle corticalen untersuchten Nierengewebsproben von herzinsuffizienten und gesunden Tieren ($n = 14$, davon $n_{\text{gesund}} = 5$, $n_{\text{herzinsuffizient}} = 9$). Die NGAL-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDS zeigen, dass die höhere NGAL-Expression bei den herzinsuffizienten Tieren vorliegt ($\text{FOLD (herzinsuffizient/gesund)} = 2,4$). Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte keine Signifikanz zwischen den unterschiedlichen NGAL-Expressionen nachgewiesen werden ($p = \text{nicht signifikant}$).

Medulla

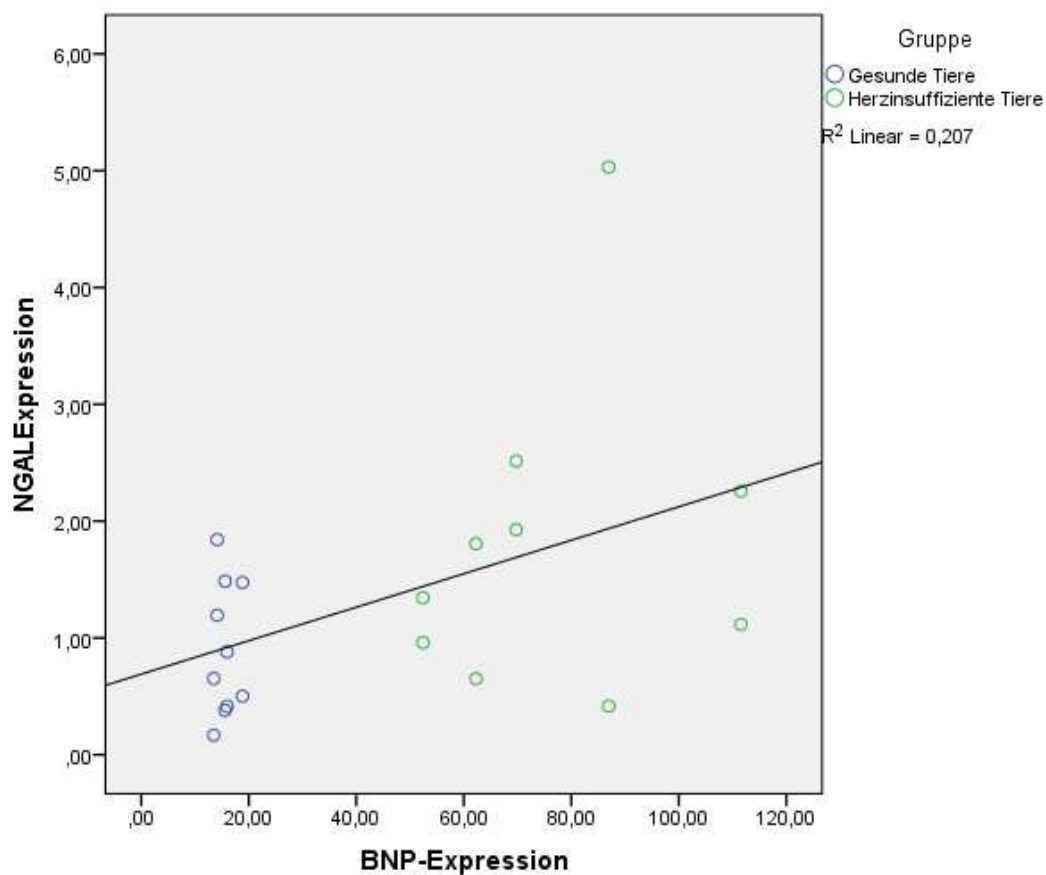


Balkendiagramm, welches die NGAL-Expression aller herzinsuffizienten Tiere (sowohl medikamentös, als auch nicht medikamentös behandelt) anhand der gemittelten Quantitäten im Vergleich zu den gesunden Tieren darstellt. Es handelt sich dabei nur um die aus der Medulla stammenden Gewebeproben ($p = \text{nicht signifikant}$).

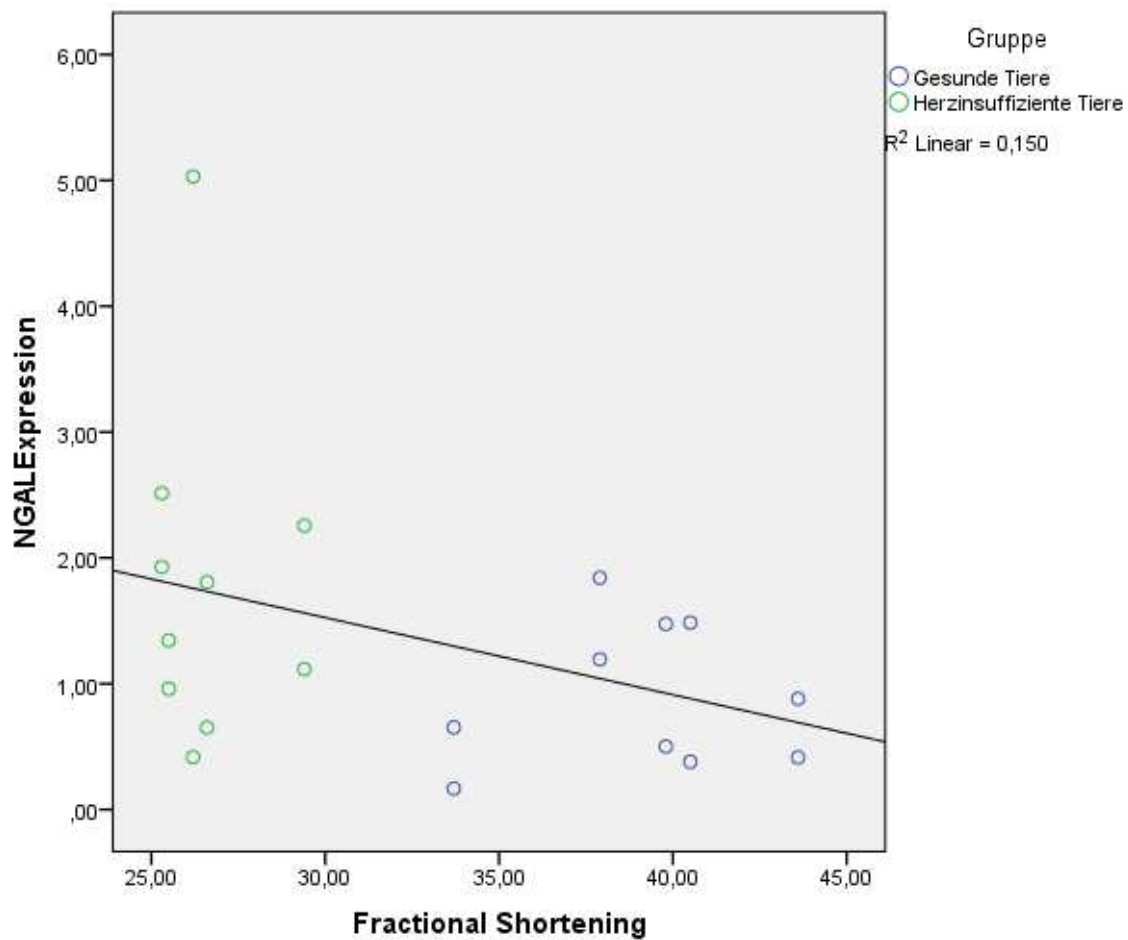
Diese Grafik berücksichtigt alle medullären untersuchten Nierengewebsproben von herzinsuffizienten und gesunden Tieren ($n = 14$, davon $n_{\text{gesund}} = 5$, $n_{\text{herzinsuffizient}} = 9$). Die NGAL-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDS zeigen, dass die höhere NGAL-Expression bei den herzinsuffizienten Tieren vorliegt (FOLD (herzinsuffizient/gesund)= 2,0). Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte keine Signifikanz zwischen den unterschiedlichen NGAL-Expressionen nachgewiesen werden ($p = \text{nicht signifikant}$).

3.1.2 Korrelation der NGAL-Expression mit der BNP-Expression und der linksventrikulären Pumpfunktion

Zwischen der renalen NGAL-Expression und der kardialen BNP-Expression zeigte sich eine signifikante positive Korrelation. Mit Zunahme der NGAL-Konzentration, zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der BNP-Werte. Dieser Zusammenhang ist annähernd linear und im Folgenden grafisch dargestellt.



Zwischen der renalen NGAL-Expression und dem Fractional Shortening (als Maß für die linksventrikuläre Pumpfunktion) zeigte sich eine negative nicht-signifikante Korrelation. Mit Zunahme der NGAL-Expression, konnte eine Abnahme des Fractional Shortening (also eine Abnahme der Pumpfunktion) festgestellt werden. Dieser Zusammenhang ist ebenfalls annähernd linear und im Folgenden grafisch dargestellt.



3.1.3 Immunhistochemische Darstellung der NGAL-Expression

In der Immunhistochemie zeigte NGAL positive Färbungen. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Ausmaß der Färbung zwischen herzinsuffizienten und gesunden Tieren. Dabei war jedoch weder ein quantitativer Unterschied zwischen Cortex und Medulla noch zwischen den mit Omapatrilat behandelten Tieren und den nicht-medikamentös behandelten Tieren ersichtlich.

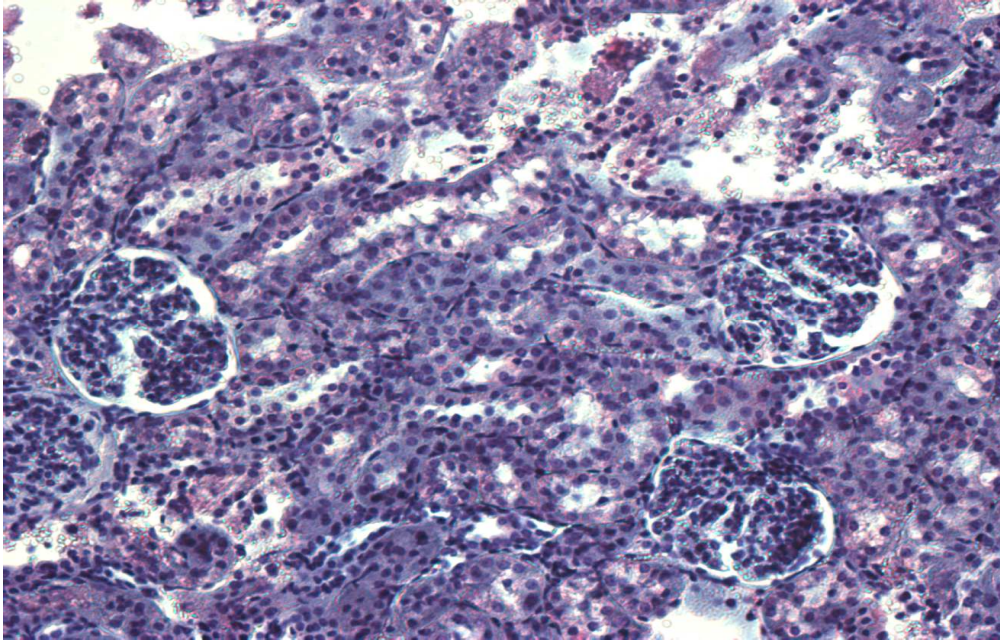


Bild aus dem Nierencortex eines gesunden Tieres. Es zeigen sich nur sehr schwache Färbungen im Bereich der Tubulusepithelien.

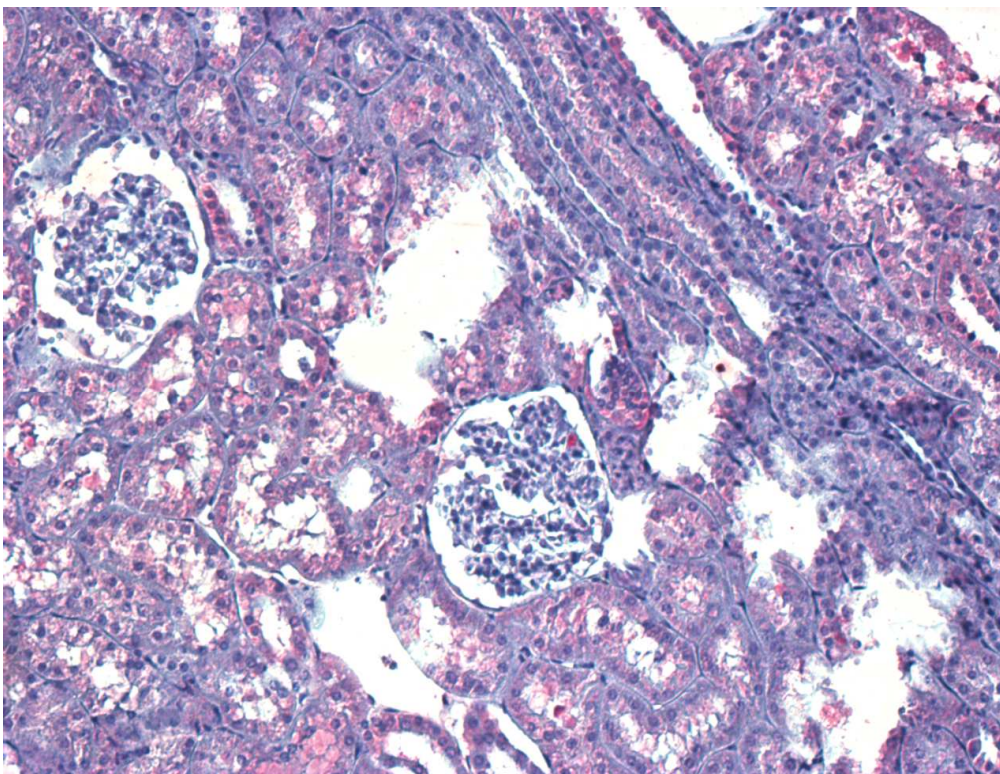


Bild aus dem Nierencortex eines herzinsuffizienten nicht-medikamentös behandelten Tieres. Es zeigen sich hier deutliche Färbungen der Tubulusepithelien.

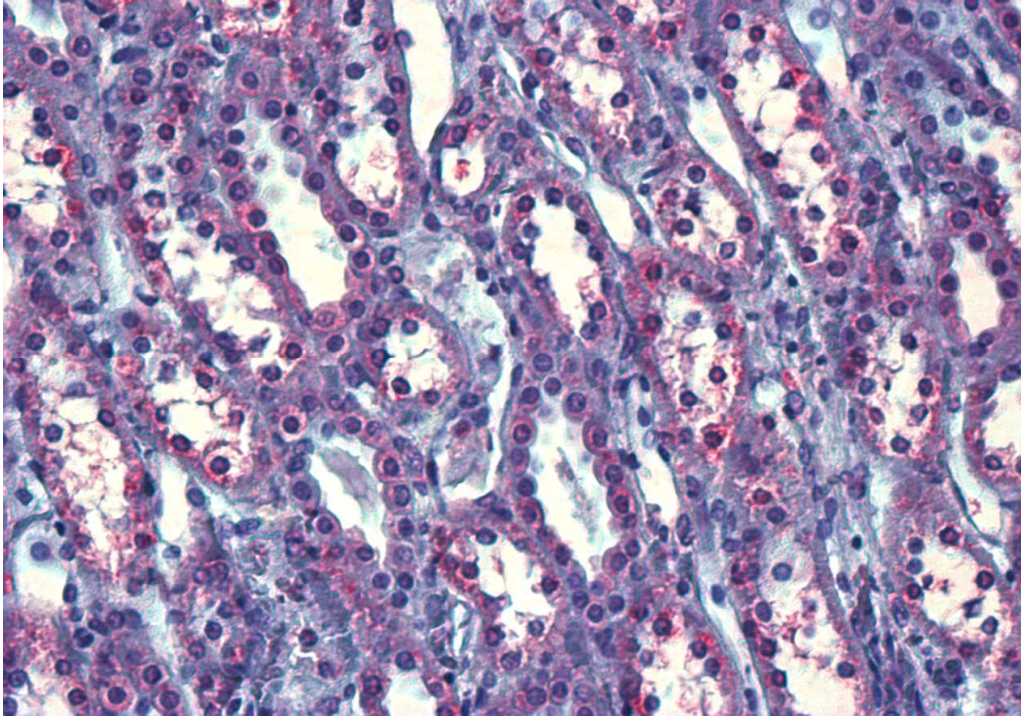


Bild aus der Nierenmedulla eines herzinsuffizienten mit Omapatrilat behandelten Tieres. Es zeigen sich auch hier deutliche Färbungen des Cytoplasmas der Tubulusepithelien.

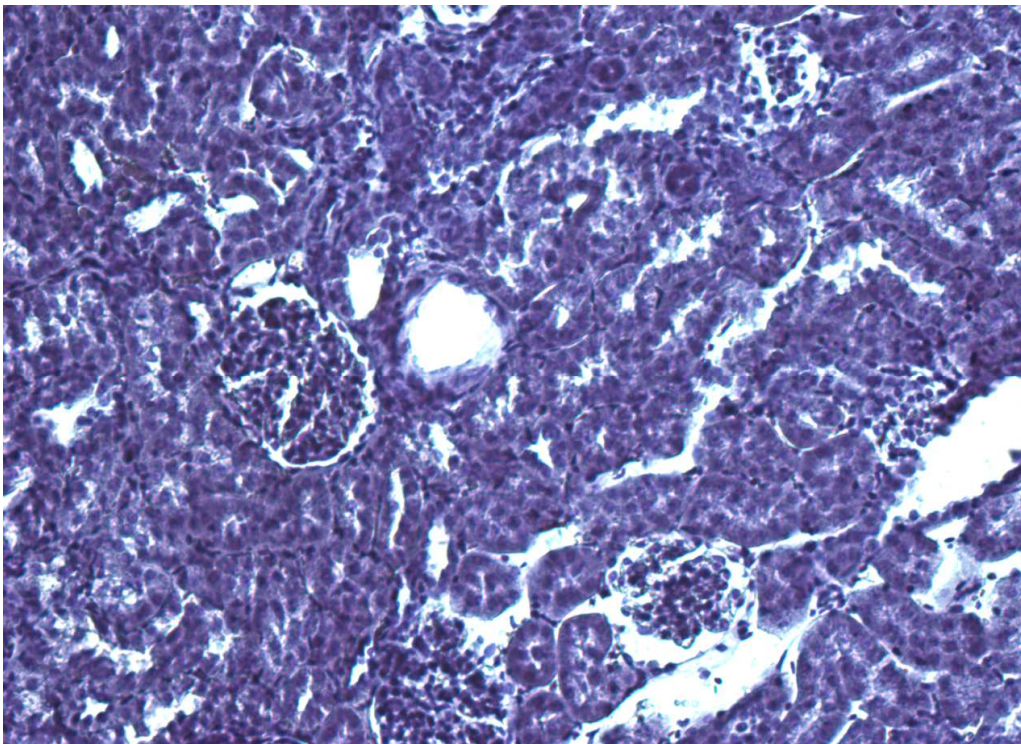


Bild einer Negativkontrolle aus dem Cortex (hier wurde kein sekundärer Antikörper in der Färbung verwendet).

Insgesamt zeigt sich bei den immunhistochemischen Färbungen hinsichtlich der Lokalisation der NGAL-Expression, dass diese bei den herzinsuffizienten Tieren vor allem im Cytoplasma der Tubulusepithelien stattfindet. Dabei lässt sich nicht differenzieren, in welchem Tubulussegment des Nephrons die Expression abläuft. In den Glomeruli findet eindeutig keine Expression statt. Da weder eine Differenzierung zwischen Cortex und Medulla noch zwischen den mit Omapatrilat behandelten Tieren und den nicht-medikamentös behandelten Tieren möglich ist, können aus den Färbungen keine Rückschlüsse auf die quantitative Verteilung und Regulation bei Herzinsuffizienz gezogen werden. Es besteht jedoch die Tendenz, wie bereits in der PCR dargelegt, dass NGAL bei herzinsuffizienten Kaninchen in der Niere im Vergleich zu gesunden Tieren vermehrt exprimiert wird.

3.2 KIM-1-Expression

In den mit drei biologischen Replikaten aller Gewebeproben und drei technischen Replikaten für KIM-1 durchgeführten PCR-Reihen zeigte dieser Marker keine quantifizierbare Expression. Auf eine immunhistochemische Färbung wurde aufgrund der fehlenden PCR-Reaktivität verzichtet.

3.3 NAG-Expression

In den mit drei biologischen Replikaten aller Gewebeproben und drei technischen Replikaten für NAG durchgeführten PCR-Reihen zeigte dieser Marker keine quantifizierbare Expression. Auf eine immunhistochemische Färbung wurde aufgrund der fehlenden PCR-Reaktivität verzichtet.

3.4 Il-18-Expression

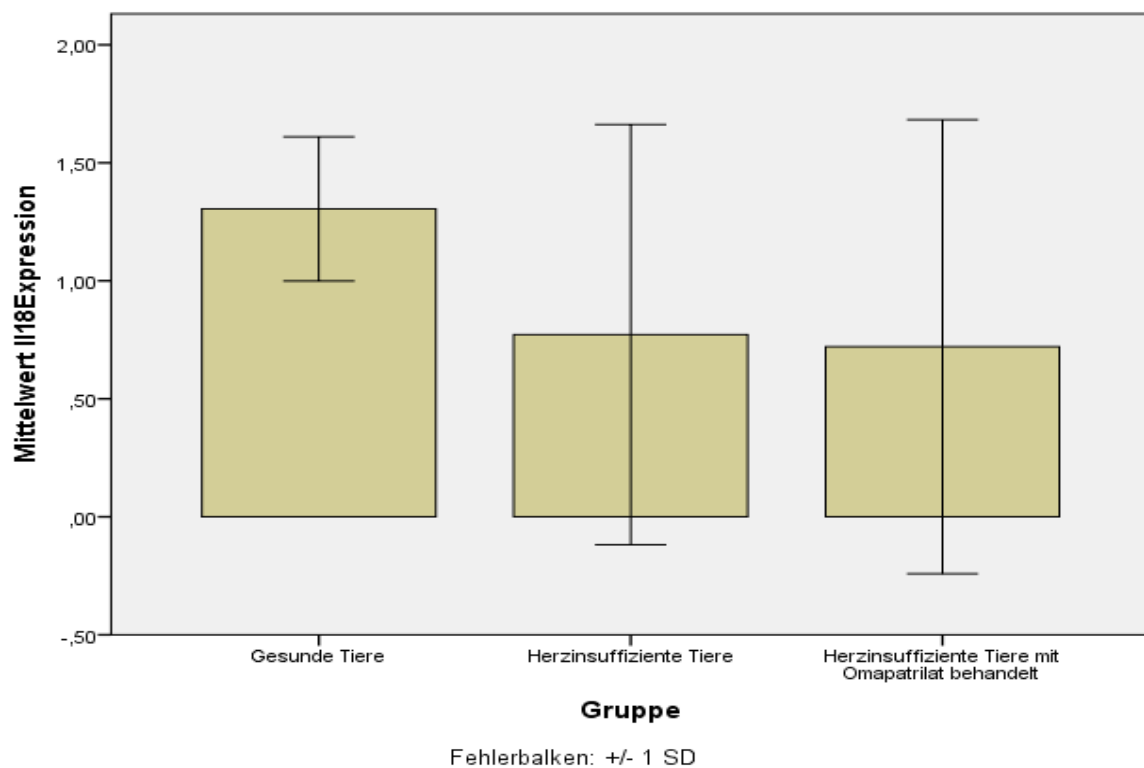
In den mit drei biologischen Replikaten aller Gewebeproben und drei technischen Replikaten für Il-18 durchgeführten PCR-Reihen zeigte dieser Marker eine konsistente Expression. Die Sequenzierungsergebnisse zeigen, dass es sich bei der amplifizierten Sequenz tatsächlich um die gesuchte Il-18-Sequenz handelt.

HPRT konnte ebenfalls in der Sequenzierung detektiert werden.

3.4.1 Grafische Darstellung der quantitativen Ergebnisse

Die folgenden Grafiken stellen dar, wie sich die Il-18-Expression zwischen den jeweiligen Gruppen unterscheidet.

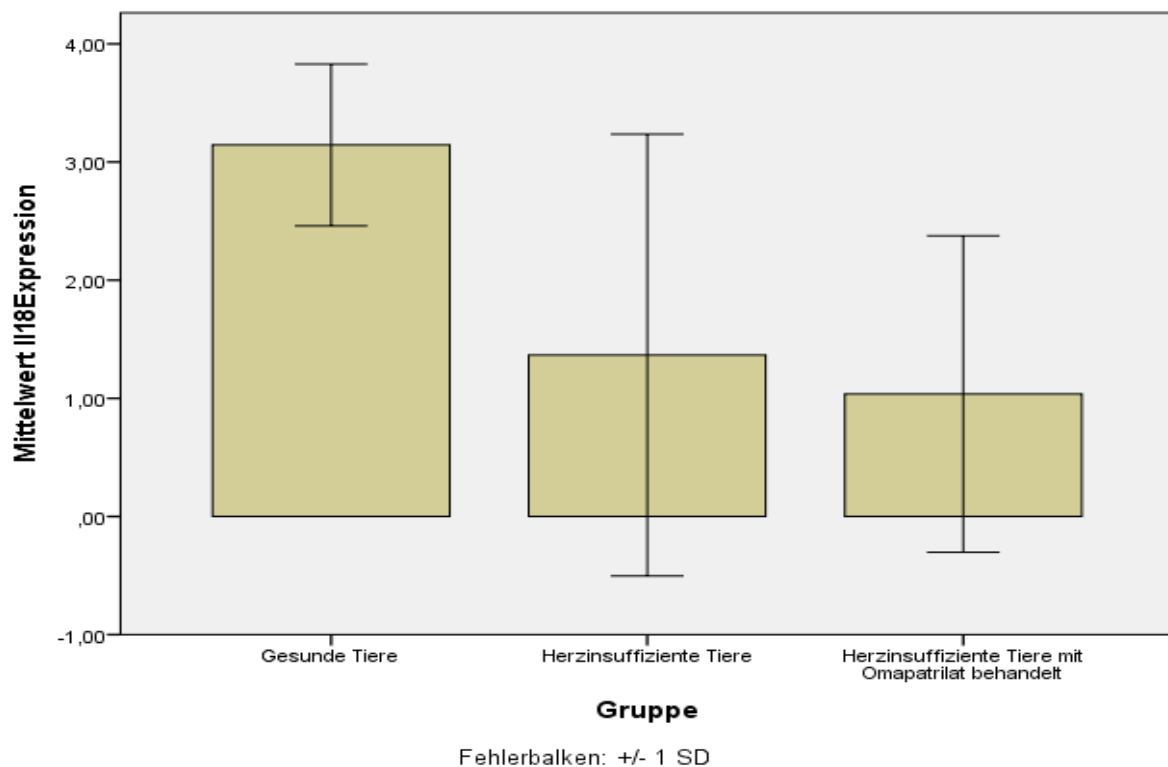
Cortex



Balkendiagramm, welches die cortikale Il-18-Expression der verschiedenen Gruppen anhand der gemittelten Quantitäten darstellt ($p =$ nicht signifikant).

Diese Grafik berücksichtigt nur diejenigen Nierengewebsproben, welche aus dem Cortex stammen (n=14, davon n_{gesunde Tiere}=5, n_{herzinsuffiziente Tiere}=5, n_{herzinsuffiziente Tiere mit Omapatrilat behandelt}=4). Die Il-18-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDS zeigen, dass die höchste Il-18-Expression bei den gesunden Tieren vorliegt (FOLD (Herzinsuffizienz mit Omapatrilat/Gesund)=0,3; FOLD (Herzinsuffizienz/Gesund) =0,3), gefolgt von den kranken mit und ohne Medikation. Zwischen diesen besteht ein vernachlässigbar geringer Unterschied (FOLD (Herzinsuffizienz mit Omapatrilat/Herzinsuffizienz)=1,1). Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte keine Signifikanz zwischen den unterschiedlichen Il-18-Expressionen nachgewiesen werden (p = nicht signifikant).

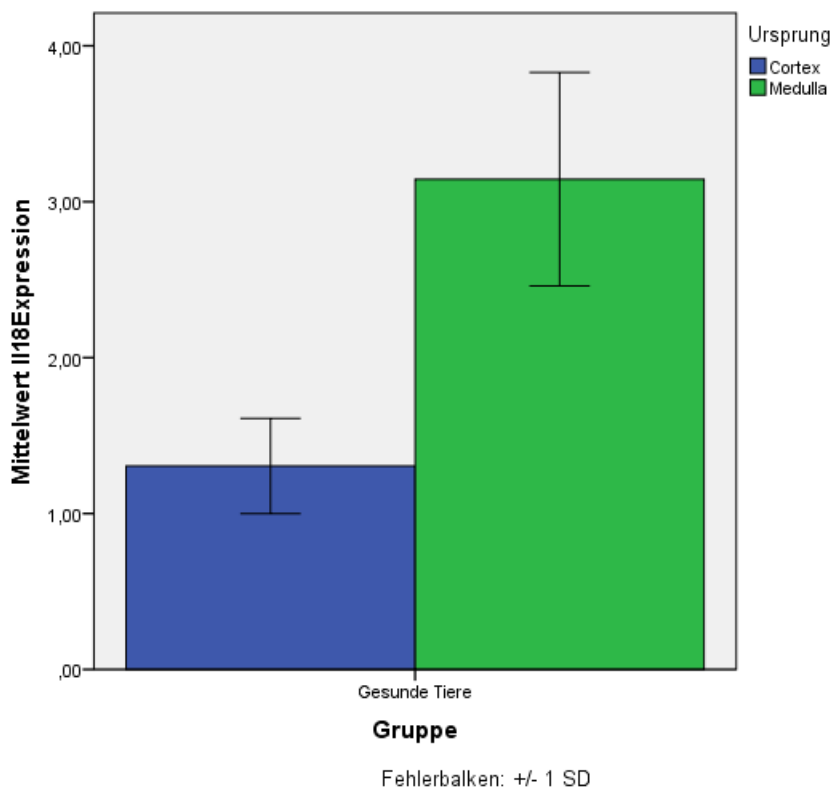
Medulla



Balkendiagramm, welches die medulläre Il-18-Expression der verschiedenen Gruppen anhand der gemittelten Quantitäten darstellt (#: $p < 0,04$ vs. CTRL, §: $p =$ nicht signifikant vs. Herzinsuffizienz).

Diese Grafik berücksichtigt nur diejenigen Nierengewebsproben, welche aus der Medulla stammen ($n=14$, davon $n_{\text{gesunde Tiere}}=5$, $n_{\text{herzinsuffiziente Tiere}}=5$, $n_{\text{herzinsuffiziente Tiere mit Omapatrilat behandelt}}=4$). Die Il-18-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDs zeigen, dass die höchste Il-18-Expression bei den gesunden Tieren vorliegt (FOLD (Herzinsuffizienz mit Omapatrilat/Gesund)=0,3; FOLD (Herzinsuffizienz/Gesund) =0,5), gefolgt von den kranken Tieren ohne Medikation (FOLD (Herzinsuffizienz mit Omapatrilat/Herzinsuffizienz)=0,7). Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte eine Signifikanz zwischen den unterschiedlichen Il-18-Expressionen der gesunden Tiere und der herzinsuffizienten mit Omapatrilat behandelten Tiere nachgewiesen werden ($p < 0,04$). Zwischen den restlichen Gruppen konnte keine Signifikanz ermittelt werden ($p = \text{nicht signifikant}$).

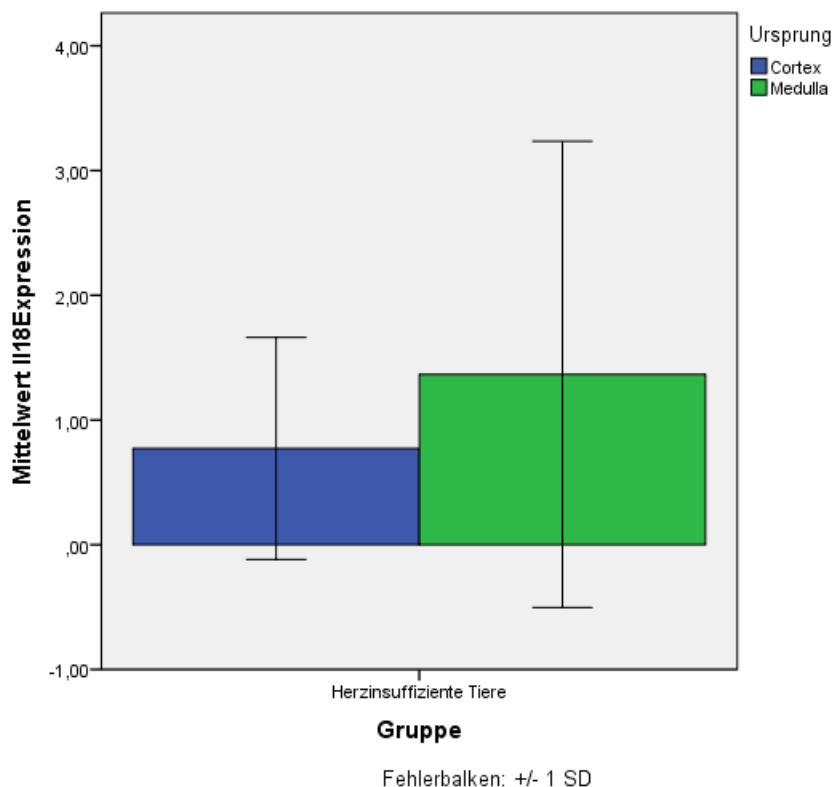
Gesunde Tiere



Balkendiagramm, welches die IL-18-Expression der gesunden Tiere anhand der gemittelten Quantitäten darstellt. Differenziert wird hierbei zwischen Cortex und Medulla ($p < 0,01$).

Diese Grafik berücksichtigt nur diejenigen Nierengewebsproben der gesunden Tiere ($n=10$, davon $n_{\text{Cortex}}=5$, $n_{\text{Medulla}}=5$). Die IL-18-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDS zeigen, dass die höhere IL-18-Expression in der Medulla vorliegt (FOLD (Cortex/Medulla)=0,4). Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte eine Signifikanz zwischen den unterschiedlichen IL-18-Expressionen in Cortex und Medulla nachgewiesen werden ($p < 0,01$).

Herzinsuffiziente Tiere

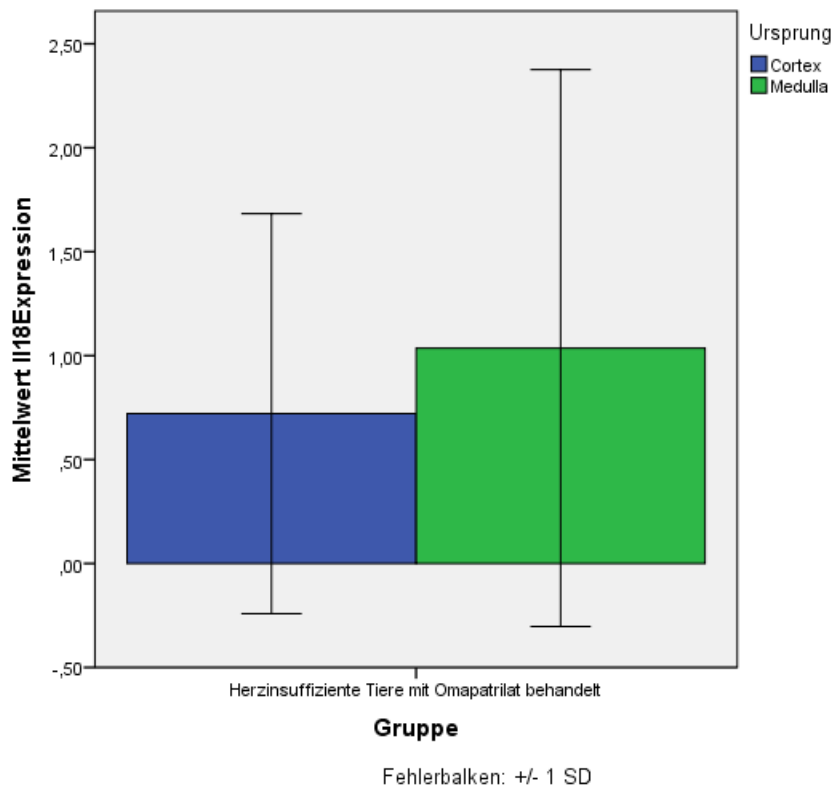


Balkendiagramm, welches die IL-18-Expression der herzinsuffizienten Tiere, welche ohne Omapatrilat behandelt worden sind anhand der gemittelten Quantitäten darstellt. Differenziert wird hierbei zwischen Cortex und

Medulla ($p = \text{nicht signifikant}$).

Diese Grafik berücksichtigt nur diejenigen Nierengewebsproben der herzinsuffizienten Tiere, welche ohne Omapatrilat behandelt worden sind ($n=10$, davon $n_{\text{Cortex}}=5$, $n_{\text{Medulla}}=5$). Die Il-18-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDS zeigen, dass die höhere Il-18-Expression in der Medulla vorliegt (FOLD (Cortex/Medulla)=0,3). Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte keine Signifikanz zwischen den unterschiedlichen Il-18-Expressionen in Cortex und Medulla nachgewiesen werden ($p = \text{nicht signifikant}$).

Herzinsuffiziente Tiere mit Omapatrilat behandelt

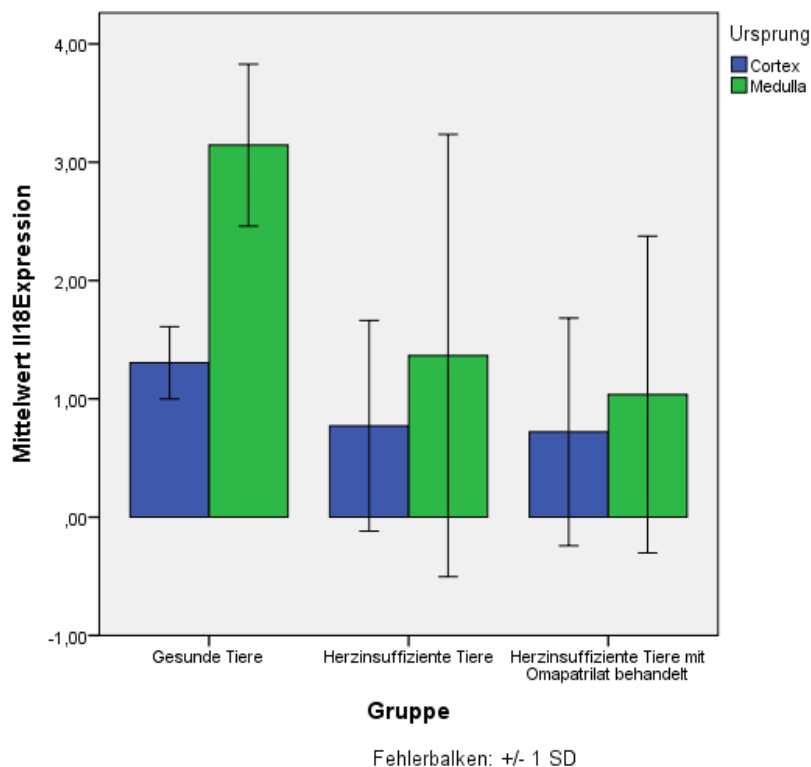


Balkendiagramm, welches die Il-18-Expression der herzinsuffizienten Tiere, welche mit Omapatrilat behandelt worden sind anhand der gemittelten Quantitäten darstellt. Differenziert wird hierbei zwischen Cortex und

Medulla ($p = \text{nicht signifikant}$).

Diese Grafik berücksichtigt nur diejenigen Nierengewebsproben der herzinsuffizienten Tiere, welche mit Omapatrilat behandelt worden sind ($n=8$, davon $n_{\text{Cortex}}=4$, $n_{\text{Medulla}}=4$). Die Il-18-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDS zeigen, dass die höhere Il-18-Expression in der Medulla vorliegt (FOLD (Cortex/Medulla)=0,4). Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte keine Signifikanz zwischen den unterschiedlichen Il-18-Expressionen in Cortex und Medulla nachgewiesen werden ($p = \text{nicht signifikant}$).

Grafische Zusammenfassung der quantitativen Ergebnisse

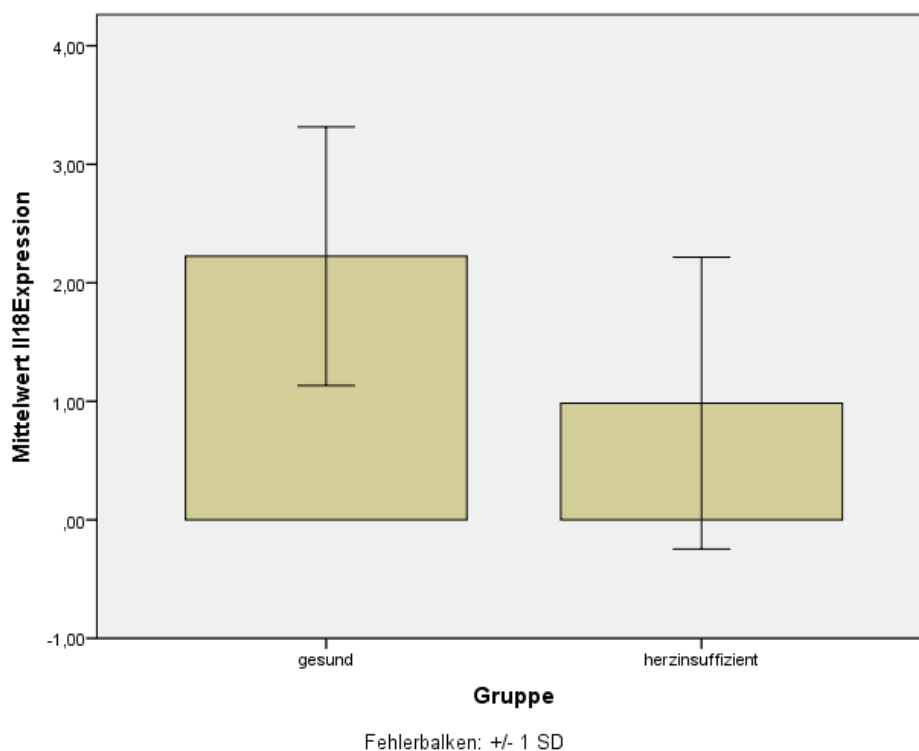


Es besteht eine signifikant höhere Il-18-Expression in der Medulla im Vergleich zum Cortex bei gesunden Tieren, welche wegen der Herabregulation von Il-18 in der Medulla und in deutlich weniger starkem Ausmaß im Cortex bei den herzinsuffizienten Tieren nicht mehr nachweisbar

ist. Allerdings besteht auch bei den herzinsuffizienten Tieren eine geringgradig höhere Il-18-Expression in der Medulla.

Die folgenden Grafiken fassen die herzinsuffizienten nicht medikamentös und die medikamentös behandelten Tiere zu einer Gruppe zusammen, und vergleichen diese bezüglich der Il-18-Expression mit der gesunden Gruppe.

Cortex und Medulla

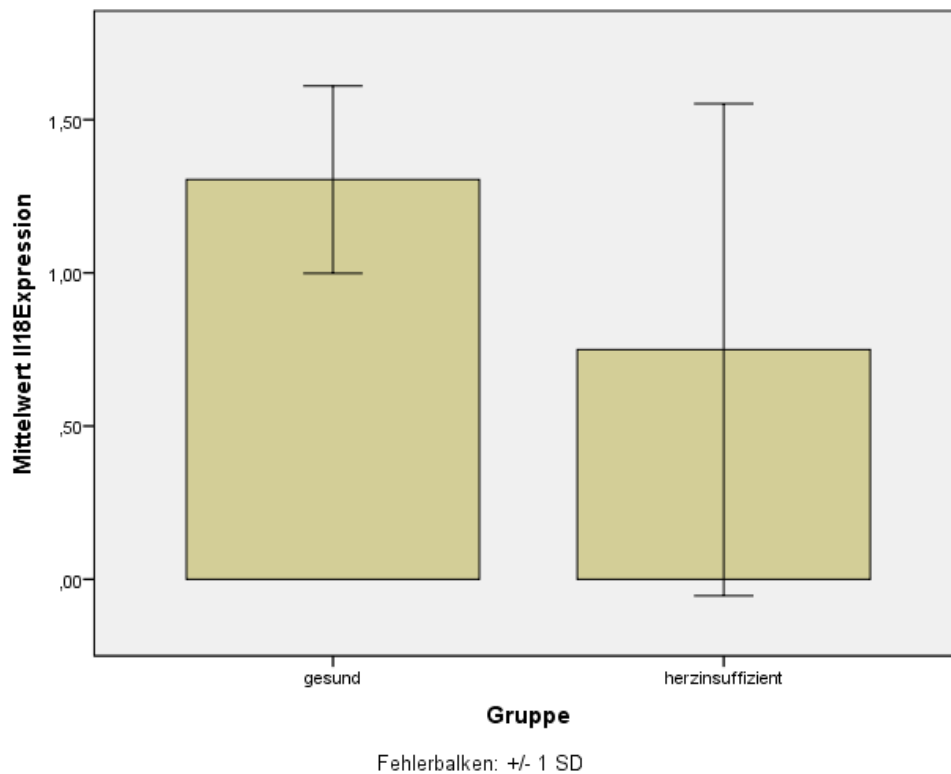


Balkendiagramm, welches die Il-18-Expression aller herzinsuffizienten Tiere (sowohl medikamentös, als auch nicht medikamentös behandelt) anhand der gemittelten Quantitäten im Vergleich zu den gesunden Tieren darstellt. Es wird dabei nicht zwischen Cortex und Medulla differenziert ($p < 0,02$).

Diese Grafik berücksichtigt alle untersuchten Nierengewebsproben von herzinsuffizienten und gesunden Tieren ($n = 28$, davon $n_{\text{gesund}} = 10$, $n_{\text{herzinsuffizient}} = 18$). Die Il-18-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDs zeigen, dass die höhere Il-18-Expression bei den gesunden

Tieren vorliegt (FOLD (herzinsuffizient/gesund)= 0,4). Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte eine Signifikanz zwischen den unterschiedlichen Il-18-Expressionen nachgewiesen werden ($p < 0,02$).

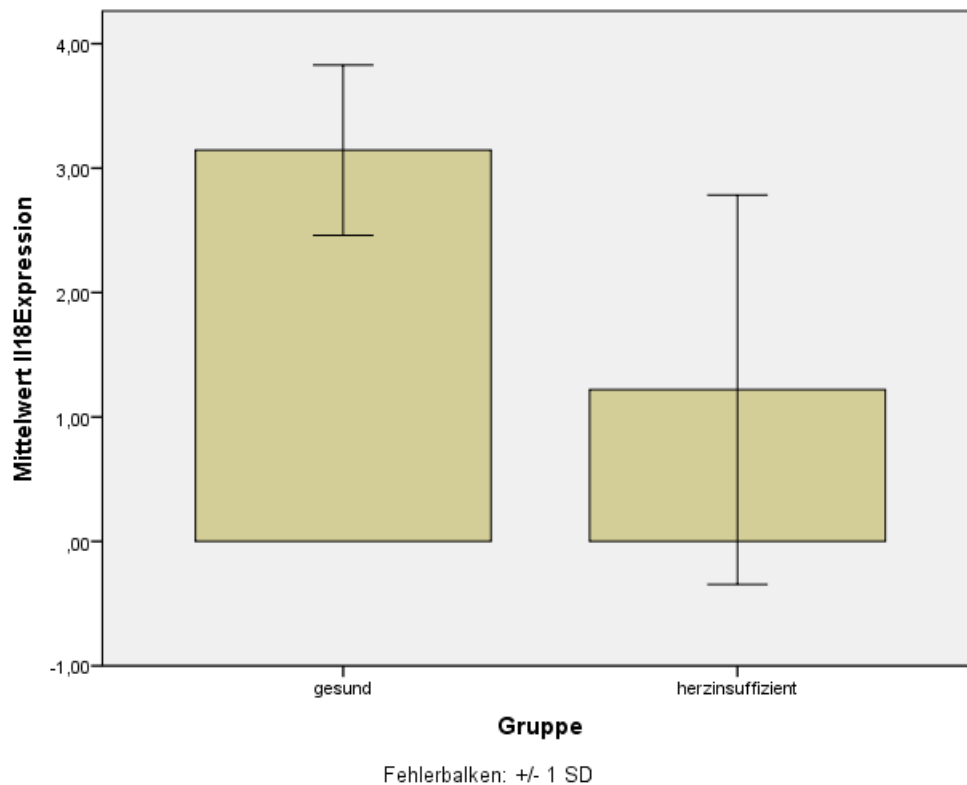
Cortex



Balkendiagramm, welches die Il-18-Expression aller herzinsuffizienten Tiere (sowohl medikamentös, als auch nicht medikamentös behandelt) anhand der gemittelten Quantitäten im Vergleich zu den gesunden Tieren darstellt. Es handelt sich dabei nur um die aus dem Cortex stammenden Gewebsproben ($p =$ nicht signifikant).

Diese Grafik berücksichtigt alle corticalen untersuchten Nierengewebsproben von herzinsuffizienten und gesunden Tieren ($n = 14$, davon $n_{\text{gesund}} = 5$, $n_{\text{herzinsuffizient}} = 9$). Die Il-18-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDS zeigen, dass die höhere Il-18-Expression bei den gesunden Tieren vorliegt (FOLD (herzinsuffizient/gesund)= 0,6). Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte keine Signifikanz zwischen den unterschiedlichen Il-18-Expressionen nachgewiesen werden ($p =$ nicht signifikant).

Medulla

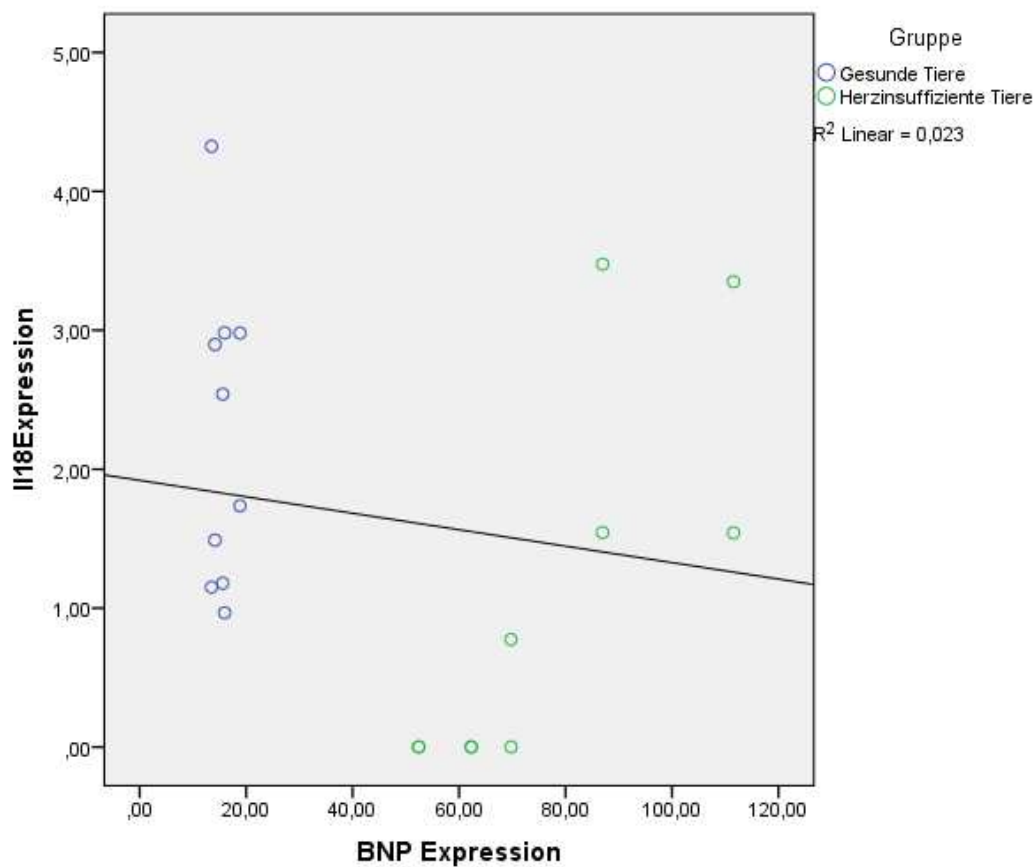


Balkendiagramm, welches die IL-18-Expression aller herzinsuffizienten Tiere (sowohl medikamentös, als auch nicht medikamentös behandelt) anhand der gemittelten Quantitäten im Vergleich zu den gesunden Tieren darstellt. Es handelt sich dabei nur um die aus der Medulla stammenden Gewebeproben ($p = \text{nicht signifikant}$).

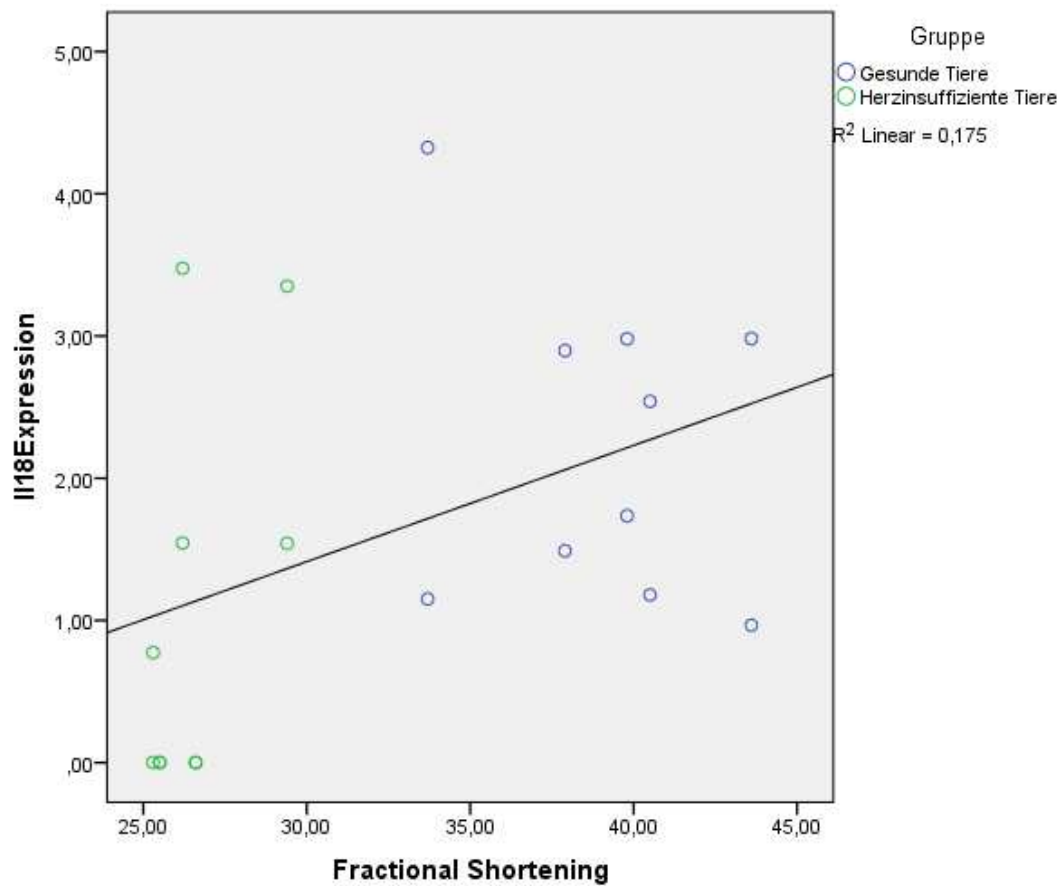
Diese Grafik berücksichtigt alle medullären untersuchten Nierengewebsproben von herzinsuffizienten und gesunden Tieren ($n = 14$, davon $n_{\text{gesund}} = 5$, $n_{\text{herzinsuffizient}} = 9$). Die IL-18-Expression wurde nach durchgeführter relativer Standardmethode mittels der Quantität ermittelt (s.o.). Die errechneten Mittelwerte der FOLDS zeigen, dass die höhere IL-18-Expression bei den gesunden Tieren vorliegt ($\text{FOLD (herzinsuffizient/gesund)} = 0,5$). Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte keine Signifikanz zwischen den unterschiedlichen IL-18-Expressionen nachgewiesen werden ($p = \text{nicht signifikant}$).

3.1.2 Korrelation der Il-18-Expression mit der BNP-Expression und der linksventrikulären Pumpfunktion

Zwischen der renalen Il-18-Expression und der kardialen BNP-Expression zeigte sich keine signifikante Korrelation. Mit Zunahme der Il-18-Konzentration zeigte sich ein geringgradiger Abfall der BNP-Werte. Dieser Zusammenhang ist jedoch nicht aussagekräftig. Im Folgenden ist die dazugehörige Grafik gezeigt.



Zwischen der renalen Il-18-Expression und dem Fractional Shortening (als Maß für die linksventrikuläre Pumpfunktion) zeigte sich eine positive signifikante Korrelation. Mit Zunahme der Il-18-Expression, konnte eine Zunahme des Fractional Shortening (also eine Zunahme der Pumpfunktion) festgestellt werden. Dieser Zusammenhang ist annähernd linear, zeigt jedoch eine sehr starke Streuung und ist im Folgenden grafisch dargestellt.



3.4.3 Immunhistochemische Darstellung der II-18-Expression

In der Immunhistochemie zeigte II-18 positive Färbungen. Dabei war in allen Gruppen kein quantitativer Unterschied zwischen Cortex- und Medullafärbung ersichtlich, ebenso zwischen gesunden und herzinsuffizienten Tieren (sowohl medikamentös, als auch nicht medikamentös behandelt). Einzig die mit Omapatrilat behandelten Tiere zeigten im Bereich der Tubulusepithelien weniger starke Färbungen.

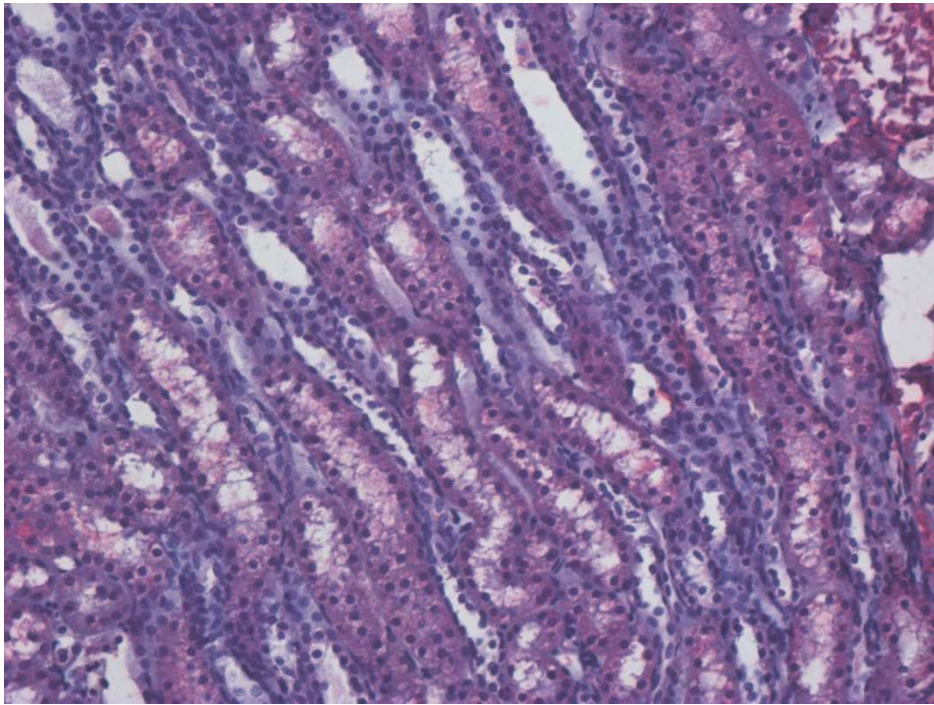


Bild aus der Nierenmedulla eines gesunden Tieres. Hier zeigen sich Färbungen der Tubulusepithelien.

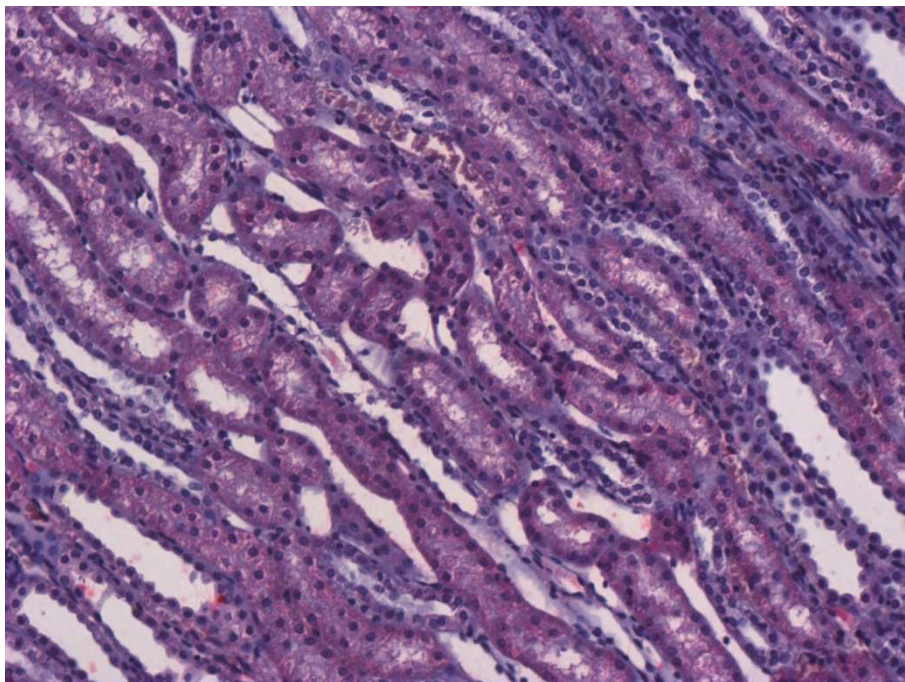


Bild aus der Nierenmedulla eines herzinsuffizienten nicht-medikamentös behandelten Tieres. Es zeigen sich auch hier Färbungen der Tubulusepithelien.

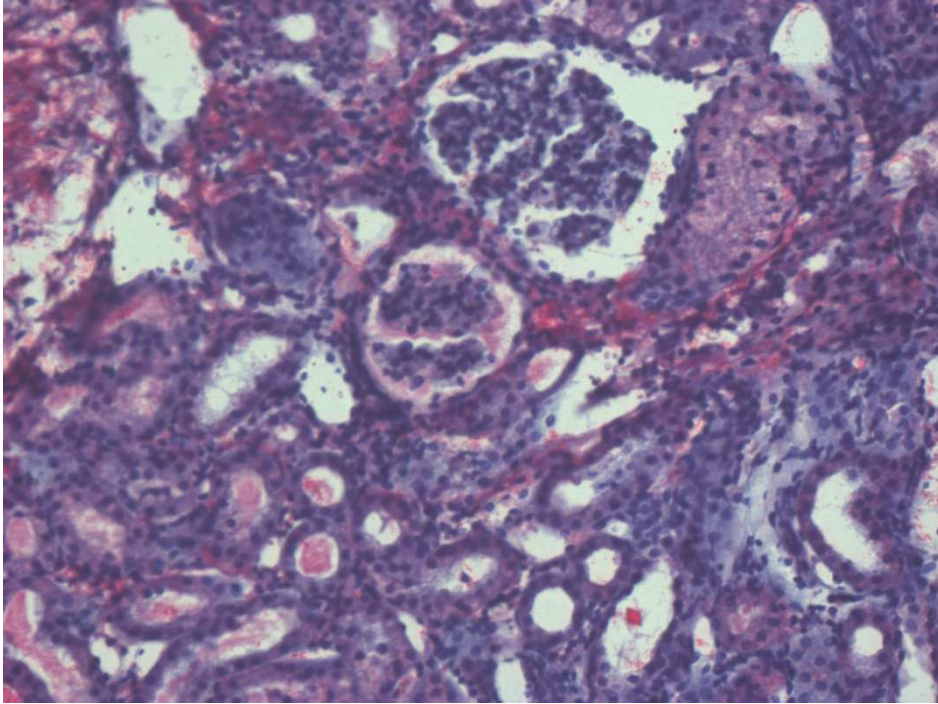


Bild aus dem Nierencortex eines herzinsuffizienten mit Omapatrilat behandelten Tieres. Es zeigen sich hier im Vergleich zu den vorherigen Gruppen weniger starke Färbungen im Bereich der Tubulusepithelien.

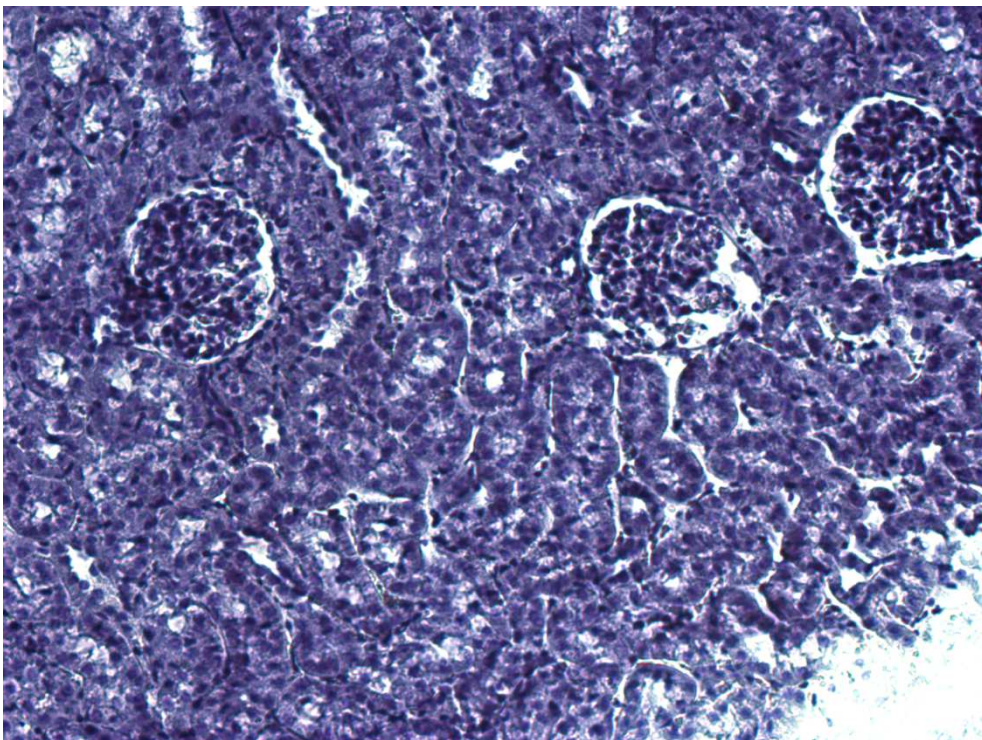


Bild einer Negativkontrolle aus dem Cortex (hier wurde kein sekundärer Antikörper in der Färbung

verwendet).

Insgesamt zeigt sich bei den immunhistochemischen Färbungen hinsichtlich der Lokalisation der Il-18-Expression, dass diese ähnlich wie die oben beschriebene NGAL-Expression vor allem im Cytoplasma der Tubulusepithelien stattfindet. Dabei lässt sich auch hier nicht differenzieren, in welchem Tubulussegment des Nephrons die Expression abläuft. In den Glomeruli findet ebenfalls eindeutig keine Expression statt. Da sich keine Differenzierung zwischen den einzelnen Gruppen zeigt, können auch bei diesem aus den Färbungen keine Rückschlüsse auf die quantitative Verteilung und Regulation bei Herzinsuffizienz gezogen werden. Die leicht verminderte Färbung bei den mit Omapatrilat behandelten Tieren ist vernachlässigbar. Im Gegensatz zu NGAL zeigt Il-18 in der Immunhistochemie keine Tendenz, da hier in den Gruppen keine Unterschiede im Ausmaß der Färbung deutlich werden.

4 Diskussion

Diese Arbeit untersuchte im Rahmen des kardioresalen Syndroms die Expression kardioresaler Biomarker in der Niere von herzinsuffizienten und gesunden Kaninchen. Ferner wurde untersucht, ob es Unterschiede bezüglich der corticalen und medullären Expression gibt und ob eine Hemmung des Angiotensin-Converting-Enzyms und der Neutralen Endopeptidase durch Omapatrilat, einem Vasopeptidase-Inhibitor, bei herzinsuffizienten Kaninchen einen Einfluss auf die Expression dieser Marker hat.

Dazu wurden Nierengewebsproben von Kaninchen verwendet. Bei einem Teil von ihnen wurde bereits im Vorfeld durch eine schrittmacher-induzierte Tachykardie eine progrediente Herzinsuffizienz hervorgerufen. Ein Teil von diesen kranken Tieren wurde mit dem kardioprotektiven Medikament Omapatrilat behandelt.

Es wurde insgesamt die Expressionen von vier kardioresalen Markern untersucht. Zu diesen zählten NGAL (Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin), KIM-1 (Kidney Injury Molecule 1), NAG (N-Acetyl-Glucosaminidase) und Il-18 (Interleukin 18).

4.1 NGAL (Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin)

In den drei durchgeführten Polymerase-Ketten-Reaktionen für NGAL zeigte dieser Marker eine Expression. Bei den kranken Tieren zeigte sich eine deutliche, statistisch jedoch nicht signifikant höhere Expression als bei den gesunden Kaninchen. Die mit Omapatrilat behandelte herzinsuffiziente Gruppe zeigte jedoch eine leicht, nicht signifikant höhere NGAL-Expression als die unbehandelte Gruppe. Innerhalb der jeweiligen Gruppen wurde eine deutlich, statistisch aber nicht signifikant höhere Expression von NGAL im Bereich der

Nierenrinde festgestellt. Zudem muss erwähnt werden, dass in allen Gruppen eine relativ hohe Standardabweichung besteht, wodurch die Beurteilbarkeit eingeschränkt wird. Ursächlich für die hohen Streuwerte könnte die geringe Fallzahl an untersuchten Tieren sein. Dennoch lässt sich bei den PCR-Resultaten feststellen, dass bei herzinsuffizienten Tieren tendenziell im Vergleich zu gesunden Tieren eine erhöhte NGAL-Expression vorliegt. Die immunhistochemischen Färbungen für NGAL bestätigten die Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktionen. Bei den Gewebeproben der kranken Tiere zeigten sich deutlich verstärkte Färbungen im Vergleich zu den gesunden. Allerdings war hier weder eine Differenzierung zwischen Rinde und Medulla noch zwischen der mit Omapatrilat behandelten Gruppe und der unbehandelten Gruppe möglich. Morphologisch war dabei besonders stark das Cytoplasma der Tubulusepithelien gefärbt. Dabei war es jedoch nicht möglich die einzelnen Segmente des Nephrons (proximaler/distaler Tubulus, Henle-Schleife, Sammelrohr) klar zu differenzieren. In den Glomeruli zeigten sich keine Färbungen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Nieren der kranken Tiere bedingt durch die progrediente Herzinsuffizienz eine Schädigung aufweisen. Vorhergehende experimentelle Studien haben dargelegt, dass NGAL vor allem nach akuten ischämischen Ereignissen in der Niere im Urin und im Serum erhöht ist (13). Dieses Kleintiermodell lässt darauf schließen, dass NGAL auch bei der chronisch geschädigten Niere als kardiorener Marker in Betracht gezogen werden kann. Zudem scheint es dabei nicht nur erhöhte NGAL-Spiegel im Urin und Serum zu geben, sondern folglich auch eine erhöhte NGAL-Expression im Nierengewebe zu existieren. Es bleibt fraglich, ob sich dieses Kleintiermodell auf den Menschen übertragen lässt. Im Vorfeld wurden hierzu unterschiedliche Studien dargelegt. Einerseits besteht beim Menschen keine signifikante Korrelation zwischen NGAL-Urinkonzentration und Schwere der chronischen Herzinsuffizienz bzw. reduzierter linksventrikulärer Funktion (14), andererseits zeigt ein weiteres

Patientenkollektiv mit chronischer Herzinsuffizienz aufgrund einer koronaren Herzkrankheit durchaus eine signifikante Korrelation zwischen Urin-NGAL und Serum-Kreatinin sowie zwischen Serum-NGAL und NYHA-Stadium (11, 15, 16). Eine aktuelle klinische Studie von Jungbauer et al. unterstützt dabei die These, dass NGAL als möglicher diagnostischer Wert für das akute kardiorenale Syndrom eingesetzt werden kann (17). Die immunhistochemischen Bilder der vorliegenden Arbeit können dabei eine ungefähre, jedoch nicht genaue Lokalisation der NGAL-Expression im Nierengewebe der Kaninchen darlegen. NGAL ist somit als Marker des kardiorenalen Syndroms zu beachten, und es sind weitere Untersuchungen notwendig, welche die prognostische Aussage von NGAL weiter analysieren.

4.2 KIM-1 (Kidney-Injury-Molecule-1)

KIM-1 zeigte in den Polymerase-Kettenreaktionen keine Expression. Es wurden insgesamt drei verschiedene Primer für KIM-1 verwendet, für welche jeweils drei Versuchsreihen durchgeführt worden sind. In allen Reaktionen ist keine Fluoreszenzkurve sichtbar geworden, was darauf schließen lässt, dass im Nierengewebe der kranken und gesunden Kaninchen keine KIM-1-Expression existiert. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten vorhergehender Studien nicht überein, die gezeigt haben, dass KIM-1 in höheren Konzentrationen im Urin bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz im Vergleich zu Gesunden vorkommt. KIM-1 wurde in diesem Zusammenhang ein prognostischer Wert in Bezug auf die Gesamtmortalität bei Herzinsuffizienz zugeschrieben (14). Außerdem wurde KIM-1 in weiteren Studien als möglicher guter kardiorener Marker dargestellt, da es im gesunden Nierengewebe nicht exprimiert wird, es aber nach einer Schädigung im proximalen Tubulus hochreguliert wird. Es scheint auch in der Zelle bei Nichtbehandlung zu persistieren (38). Es stellt sich somit die Frage, ob die KIM-1-Expression im Kaninchenewebe tatsächlich fehlt oder ob noch geeignete

KIM-1-Primer gefunden werden müssen, die eine Amplifizierung des Zielgens in der PCR möglich machen.

4.3 NAG (N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase)

NAG zeigte in den Polymerase-Kettenreaktionen ebenfalls keine Expression. Auch hier wurden insgesamt drei verschiedene Primer für NAG verwendet, für welche jeweils drei Versuchsreihen durchgeführt worden sind. In allen Reaktionen ist keine Fluoreszenzkurve sichtbar geworden, was darauf schließen lässt, dass im Nierengewebe der kranken und gesunden Kaninchen keine NAG-Expression existiert. Auch dieses Resultat bestätigt nicht vorhergegangene Studien, welche bei NAG eine signifikante Korrelation mit der Schwere der chronischen Herzinsuffizienz feststellten und auch diesen Marker als prognostisch signifikant in Bezug auf die Gesamtmortalität der Herzinsuffizienz darstellten (14). NAG wurde in weiteren vorhergegangenen Studien als kontroverser Marker diskutiert. Auf der einen Seite zeigten Studien, dass erhöhte NAG-Konzentrationen im Urin bei akuten Nierenerkrankungen unterschiedlicher Ätiologie, induziert durch toxische Stoffe, nach Herzoperationen oder nach Nierentransplantationen vorgefunden werden (24). Auf der anderen Seite können erhöhte Urinkonzentrationen von NAG auch Ursache von glomerulären Erkrankungen sein, wie beispielsweise der diabetischen Nephropathie (39), oder auch eine erhöhte lysosomale Aktivität ohne Zellschädigung anzeigen (23). Es stellt sich nun auch bei diesem Marker die Frage, ob dessen Expression im Kaninchengewebe fehlt oder noch geeignete NAG-Primer gefunden werden müssen, die eine Amplifikation dieses Markers in der PCR möglich machen. Es wurde gezeigt, dass die proximalen Tubulusepithelien regelmäßig während der physiologischen Exozytose geringe Mengen an NAG in den Urin sezernieren, dabei bleibt jedoch fraglich, ob sich dieser Verhalten auf ein Kleintiermodell von Kaninchen übertragen lässt.

Die Ergebnisse für NAG dieser Arbeit zeigen, dass der Nutzen von NAG als kardiorener Biomarker fraglich bleibt.

4.4 Il-18 (Interleukin-18)

In den drei durchgeführten Polymerase-Ketten-Reaktionen für Il-18 zeigte dieser Marker wiederum eine Expression. Allerdings zeigten sich hierbei bei den kranken Tieren im Vergleich zu den gesunden keine eindeutigen Differenzierungen. Es zeigte sich im Bereich des Cortex kein Unterschied bezüglich der Il-18-Expression zwischen den einzelnen Gruppen. Auch in der Medulla wurden zwischen herzinsuffizienter nicht behandelter Gruppe und herzinsuffizienter behandelter Gruppe keine unterschiedlich starken Expressionen gefunden. Jedoch zeigte sich im Mark der gesunden Gruppe eine signifikant höhere Expression von Il-18 im Vergleich zu den Medullae der kranken Tiere. Innerhalb der jeweiligen Gruppen gab es sowohl bei den herzinsuffizienten behandelten Tieren als auch bei den herzinsuffizienten nicht behandelten Tieren eine leichte und nicht signifikant höhere Expression im Bereich der Medulla. Innerhalb der gesunden Gruppe zeigte sich jedoch eine statistisch signifikant höhere Il-18-Expression in der Medulla. Zudem muss auch hier erwähnt werden, dass in allen Gruppen eine relativ hohe Standardabweichung besteht, wodurch die Beurteilbarkeit eingeschränkt wird. Ursächlich für die hohen Streuwerte könnte die geringe Fallzahl an untersuchten Tieren sein. Die immunhistochemischen Färbungen für Il-18 bestätigten die Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktionen nur teilweise. Innerhalb der gesunden Gruppe konnte man etwas stärkere Färbungen in der Medulla im Vergleich zum Cortex erkennen. Bei den Gewebeproben der kranken Tiere (sowohl behandelt als auch nicht behandelt) zeigten sich allerdings keine unterschiedlich starke Färbungen zwischen Cortex und Medulla. Zwischen den einzelnen Gruppen gab es sowohl cortical als auch medullär keinen deutlichen Unterschied im Ausmaß

der Färbung. Morphologisch war dabei ähnlich wie bei NGAL besonders stark das Cytoplasma der Tubulusepithelien gefärbt. Dabei war es jedoch nicht möglich, die einzelnen Segmente des Nephrons (proximaler/distaler Tubulus, Henle-Schleife, Sammelrohr) klar zu differenzieren. In den Glomeruli zeigten sich ebenfalls keine Färbungen.

Diese Ergebnisse legen dar, dass man Il-18 momentan immer noch nicht als einen verlässlichen kardiorenal Biomarker bezeichnen kann. Dieses wird durch einige Studien unterstützt. Zum einen wurde bereits dargelegt, dass Il-18 als proinflammatorisches Zytokin konstitutiv in einer gesunden Niere im Bereich des distalen Konvoluts, des Verbindungstubulus und des Sammelrohrs exprimiert wird (20). Dieses stellt einen Erklärungsansatz für die in der PCR und in der Immunhistochemie festgestellte gleichstarke Expression bei gesunden und bei kranken Tieren dar. Allerdings zeigt eine Fall-Kontroll-Studie, dass bei Nierenerkrankungen erhöhte Il-18 Spiegel im Urin im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen existieren (21). Hier stellt sich nun die Frage, ob man diese Feststellung auf die Expression im Nierengewebe beziehen kann und ob man dies auf ein Kleintiermodell übertragen kann. Da Il-18 jedoch ein proinflammatorisches Zytokin ist, hängen dessen Messungen von mehreren Variablen ab. Diese Variablen stellen entzündliche Veränderungen in einem Organismus dar. Bei dieser Untersuchung am Kleintiermodell muss man also die Möglichkeit mit einbeziehen, dass bei den kranken und gesunden Kaninchen entzündliche Veränderungen die Il-18-Expression mit beeinflusst haben können. Daher sollte der Nutzen von Il-18 als kardiorenal Biomarker weiterhin kritisch betrachtet werden, da die entzündungsfördernden Eigenschaften dieses Zytokins und dessen Hochregulation bei entzündlichen Prozessen die Beurteilung einer erhöhten Il-18-Expression im Nierengewebe schwierig machen (8).

4.5 Vasopeptidase-Inhibition durch Omapatrilat

Zusätzlich zur Charakterisierung der renalen Expression der beschriebenen kardioresalen Marker wurde untersucht, ob Omapatrilat, ein Vasopeptidase-Inhibitor, diese Expression beeinflusst. Die in mehreren vorangegangenen Studien beschriebene kardioprotektive Wirkung von Omapatrilat konnte hier nicht bestätigt werden. In der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass Omapatrilat hier keinen wesentlichen prognostischen Vorteil gegenüber der Wirkung eines ACE-Hemmers hat. Eine frühzeitige Therapie mit Omapatrilat kann jedoch kardiales Remodelling verhindern und stellt eine vielversprechende neue Therapie der chronischen Herzinsuffizienz dar (34).

Bei den Ergebnissen für NGAL zeigte sich bei der mit Omapatrilat behandelten herzinsuffizienten Gruppe eine leicht, aber nicht signifikant höhere NGAL-Expression als bei der unbehandelten Gruppe. Bei den Ergebnissen für Il-18 zeigten sich bei der mit Omapatrilat behandelten herzinsuffizienten Gruppe und bei der nicht behandelten herzinsuffizienten Gruppe keine Unterschiede im Ausmaß der Expression. Aufgrund der vorher beschriebenen kardioprotektiven Wirkung des Medikaments hätte man sowohl bei NGAL als auch bei Il-18 eine erhöhte Expression der entsprechenden Marker bei der Gruppe der herzinsuffizienten nicht behandelten Tiere erwartet. Aufgrund der kombinierten Hemmung der Neutralen Endopeptidase und des Angiotensin-Converting-Enzyms sind Vasopeptidase-Inhibitoren gut einsetzbar in der Behandlung des Hypertonus und der Herzinsuffizienz (25). Die Therapie des Hypertonus durch Vasopeptidase-Inhibitoren wurde in mehreren klinischen Studien als effizient dargelegt. Bei der Herzinsuffizienz ist eine nicht-frühzeitige Therapie durch VPIs jedoch deutlich weniger effizient (27). Dies mag eine Erklärung dafür sein, dass bei den untersuchten Kaninchen die kardioprotektive Eigenschaft von Omapatrilat nicht zur Wirkung

gekommen ist. Eine weitere Studie unterstreicht ebenfalls noch einmal die Tatsache, dass insbesondere Omapatrilat effektiv in der Therapie des Bluthochdrucks ist, aber in deutlich geringerem Ausmaß in der Behandlung der Herzinsuffizienz (28). In diesem Fall ist es auch nötig die Tatsache mit einzubeziehen, dass es sich in dieser Studie um ein Kleintiermodell handelt und dass die Wirkung von Omapatrilat überwiegend an klinischen Studien getestet worden ist. Es muss jedoch festgehalten werden, dass sich Omapatrilat zumindest nicht negativ auf eine vorhandene Herzinsuffizienz auswirkt. Zwar gab es bei NGAL leicht erhöhte Expressionen dieses Markers bei denjenigen, welche mit Omapatrilat behandelt worden sind, dennoch sind diese vernachlässigbar gering, da sich auch in der Immunhistochemie hier kein Unterschied gezeigt hat. Aufgrund des Nebenwirkungsprofil von Vasopeptidase-Inhibitoren bleibt die Anwendung weiterhin kritisch zu betrachten.

4.6 Korrelation der renalen NGAL- und IL-18-Expression mit der kardialen BNP-Expression und der linksventrikulären Pumpfunktion

Zwischen der renalen NGAL-Expression und der kardialen BNP-Expression ließ sich eine positive signifikante Korrelation feststellen. Mit steigender NGAL-Konzentration, welche auf zunehmende Herzinsuffizienz hinweist, steigen ebenfalls die BNP-Werte an, welche als kardiale Marker der Herzinsuffizienz etabliert sind. Dieser Zusammenhang stärkt NGAL in seiner Funktion als kardiorener Biomarker. Zwischen der renalen NGAL-Expression und dem Fractional Shortening besteht eine nicht signifikante negative Korrelation. Diese Tendenz geht ebenfalls in die zu erwartende Richtung. Eine Erhöhung der NGAL-Expression geht mit einer Erniedrigung des Fractional Shortening einher, also mit einer Erniedrigung der Pumpfunktion

und somit mit einer Zunahme der Herzinsuffizienz. Dieser Zusammenhang weist ebenfalls auf die bedeutende Rolle von NGAL im Bereich der kardio-renalen Achse hin.

Zwischen der renalen IL-18-Expression und der kardialen BNP-Expression, sowie dem Fractional Shortening ließ sich aufgrund der starken Streuung der Werte kein aussagekräftiger Zusammenhang feststellen. Dieses verdeutlicht den fraglichen Nutzen von IL-18 als kardio-renalen Biomarker.

5 Zusammenfassung

Die Untersuchung der Expression kardioresnaler Biomarker in der Niere bei experimenteller Herzinsuffizienz stellte den Mittelpunkt dieser Arbeit dar. Ferner wurde dabei auch durch die Therapie des Vasopeptidase-Inhibitors Omapatrilat der Einfluss auf das Ausmaß der Expression dieser Marker charakterisiert. Dabei standen Nierengewebsproben unterschiedlicher Gruppen der Kaninchenrasse *Oryctolagus cuniculus* zur Verfügung. Diese beinhalteten eine gesunde Gruppe und eine herzinsuffiziente Gruppe, bei welcher im Vorfeld eine schrittmacher-induzierte Tachykardie geschaffen wurde. Letztere wurde (durch Omapatrilat) in eine medikamentös behandelte und eine nicht-behandelte Untergruppe unterteilt.

Für den kardioresnalen Marker NGAL (Neutrophil-Gelatinase-Associated-Lipocalin) konnten bereits veröffentlichte Studien zum Teil bestätigt werden, welche diesen als möglichen kardioresnalen Biomarker charakterisieren, bei dem jedoch noch weitere Untersuchungen zur besseren Beurteilung nötig sind.

Für die kardioresnalen Marker NAG (N-Acetyl-Glucosaminidase) und KIM-1 (Kidney-Injury-Molecule-1) konnten bereits veröffentlichte Studien nicht bestätigt werden. Diese beiden Marker zeigten im Kleintiermodell keine Expression, obwohl sie im Vorfeld als mögliche Marker der Nierenschädigung diskutiert wurden. Somit liefert diese Arbeit bezüglich KIM-1 und NAG keine weiteren neuen Erkenntnisse.

Für den kardioresnalen Marker Il-18 (Interleukin-18) konnten vorangegangene Studien nur teilweise bestätigt werden, welche dieses Zytokin aufgrund seiner vielfältigen Eigenschaften als kontroversen Marker diskutieren, dem es an Sensitivität und Spezifität mangelt, um als verlässlicher Marker des kardioresnalen Syndroms angesehen zu werden.

Die kardioprotektive Wirkung von Omapatrilat konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Damit werden vorherige Untersuchungen dieses Medikamentes zum Teil bestätigt, die Omapatrilat eine sehr gute Effizienz in der Behandlung des Hypertonus zuschreiben, aber eine deutlich weniger gute Effizienz bei nicht frühzeitigem Einsatz in der Behandlung der Herzinsuffizienz. Omapatrilat bleibt in seinem Einsatz aufgrund des Nebenwirkungsprofils (Auftreten von Angioödemem) deutlich limitiert.

6 Limitationen

Bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit müssen Limitationen beachtet werden. Die statistischen Daten beziehen sich auf wenige Fallzahlen, sodass hier eine relativ hohe Ungenauigkeit besteht. Ferner bestehen sowohl bei der statistischen Auswertung von NGAL, als auch von Il-18 hohen Standardabweichungen, welche eine exakte Auswertung der PCR-Daten nicht möglich machen. Die Unterschiede der Expressionen beider Marker sind in fast allen durchgeführten statistischen Tests nicht signifikant, sodass man hier nur von einer Tendenz sprechen kann. Außerdem war es nicht möglich, wie im Vorfeld bereits angesprochen, bei der Immunhistochemie eine genaue Lokalisation der NGAL- und Il-18-Expression im Nierengewebe auszumachen. Es zeigten sich zwar Färbungen der Tubulusepithelien, aber es bleibt fraglich, um welche Tubulussegmente es sich dabei handelt.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Ronco, C.; Haapio, M.; House, A. A.; Anavekar, N.; Bellomo, R. (2008): Cardiorenal syndrome. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 52 (19), S. 1527-1539. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.07.051.
- (2) Ronco, C.; Chionh, C.-Y.; Haapio, M.; Anavekar, N. S.; House, A.; Bellomo, R. (2009): The cardiorenal syndrome. In: *Blood Purif.* 27 (1), S. 114-126
- (3) Cowie, M. R.; Mosterd, A.; Wood, D. A.; Deckers, J. W.; Poole-Wilson, P. A.; Sutton, G. C.; Grobbee, D. E. (1997): The epidemiology of heart failure. In: *Eur. Heart J.* 18 (2), S. 208–225.
- (4) Cowie, M. R.; Wood, D. A.; Coats, A. J.; Thompson, S. G.; Poole-Wilson, P. A.; Suresh, V.; Sutton, G. C. (1999): Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study. In: *Eur. Heart J.* 20 (6), S. 421–428.
- (5) Herold, G. (2012): Akutes Nierenversagen und chronische Niereninsuffizienz. In: *Innere Medizin 2012*, Selbstverlag
- (6) Budde, T.; Wichter, T.; Breithardt, G. (2009): Herzinsuffizienz; In: *Greten, H. (Hrsg): Innere Medizin: Verstehen-Lernen-Anwenden (13. Auflage)*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag
- (7) Klein, L.; O'Connor, C. M.; Gattis, W. A.; Zampino, M.; de Luca, L.; Vitarelli, A. ; Fedele, F.; Gheorghide, M. (2003): Pharmacologic therapy for patients with chronic heart failure and reduced systolic function: review of trials and practical considerations. In: *Am. J. Cardiol.* 91 (9A), S. 18F-40F.
- (8) Urbschat, A.; Obermüller, N.; Haferkamp, A. (2011): Biomarkers of kidney injury. In: *Biomarkers* 16 Suppl 1, S. S22-30. DOI: 10.3109/1354750X.2011.587129.
- (9) Nguyen, M. T.; Devarajan, P. (2008): Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. In: *Pediatr. Nephrol.* 23 (12), S. 2151–2157.
- (10) Kjeldsen, L.; Johnsen, A. H.; Sengeløv, H.; Borregaard, N. (1993): Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. In: *J. Biol. Chem.* 268 (14), S. 10425–10432.
- (11) Damman, K.; van Veldhuisen, D. J., Navis, G.; Voors, A. A.; Hillege, H. L. (2008): Urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin, a marker of tubular damage, is increased in patients with chronic heart failure. In: *European Journal of Heart Failure* 10 (10), S. 997-1000. DOI: 10.1016/j.iejheart.2008.07.001
- (12) Flo, T. H.; Smith, .K. D.; Sato, S.; Rodriguez, D. J.; Holmes, M. A.; Strong, R. K.; Akira, S.; Aderem, A. (2004): Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. In: *Nature* 432 (7019), S. 917–921.

- (13) Mishra, J.; Ma, Q.; Prada, A.; Mitsnefes, M.; Zahedi, K.; Yang, J.; Barasch, J.; Devarajan, P. (2003): Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 14 (10), S. 2534–2543.
- (14) Jungbauer, C.; Birner, C.; Jung, B.; Buchner, S.; Lubnow, M.; von Bary, C.; Endemann, D.; Banas, B.; Mack, M.; Böger, C.; Riegger, G.; Luchner, A. (2011): Kidney injury molecule-1 and N-acetyl- β -D-Glucosaminidase in chronic heart failure: possible biomarkers of cardiorenal syndrome. In: *European Journal of Heart Failure* 13, S. 1104–1110. DOI: 10.1093/eurjhf/hfr102
- (15) Poniatowski, B.; Malyszko, J.; Bachorzewska-Gajewska, H.; Malyszko, J. S.; Dobrzycki, S. (2009): Serum neutrophil gelatinase associated lipocalin as a marker of renal function in patients with chronic heart failure and coronary artery disease. In: *Kidney Blood Press. Res* 32 (2), S. 77–80. DOI: 10.1159/000208989
- (16) Bolignano, D.; Basile, G.; Parisi, P.; Coppolino, G.; Nicocia, G.; Buemi, M. (2009): Increased plasma neutrophil gelatinase associated lipocalin levels predict mortality in elderly patients with chronic heart failure. In: *Rejuvenation Res* 12 (1), S. 7–14. DOI: 10.1089/rej.2008.0803
- (17) Jungbauer, Carsten G.; Schwiede, M.; Brand, M.; Stadler, S.; Buesing, M.; Riegger, G.; Maier, L.; Luchner, A. (2014): Activation pattern of novel renal biomarkers in acute heart failure: Superiority of NGAL. *In Vorbereitung*
- (18) Ichimura, T.; Bonventre, J. V.; Bailly, V.; Wei, H.; Hession, C. A.; Cate, R. L.; Sanicola, M. (1998): Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. In: *J. Biol. Chem.* 273 (7), S. 4135–4142.
- (19) Fontanilla, J.; Han, W. K. (2011): Kidney injury molecule-1 as an early detection tool for acute kidney injury and other kidney diseases. In: *Expert Opin Med Diagn* 5 (2), S. 161–173. DOI: 10.1517/17530059.2011.552496.
- (20) Gauer, S.; Sichler, O.; Obermüller, N.; Holzmann, Y.; Kiss, E.; Sobkowiak, E.; Pfeilschifter, J.; Geiger, H.; Mühl, H.; Hauser, I. A. (2007): IL-18 is expressed in the intercalated cell of human kidney. In: *Kidney Int.* 72 (9), S. 1081–1087.
- (21) Parikh, C. R.; Jani, A.; Melnikov, V. Y.; Faubel, S.; Edelstein, C. L. (2004): Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. In: *Am. J. Kidney Dis.* 43 (3), S. 405–414.
- (22) Parikh, C. R.; Abraham, E.; Ancukiewicz, M.; Edelstein, C. L. (2005): Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 (10), S. 3046–3052.

- (23) Liangos, O.; Perianayagam, M. C.; Vaidya, V. S.; Han, W. K.; Wald, R.; Tighiouart, H.; MacKinnon, R. W.; Li, L.; Balakrishnan, V. S.; Pereira, B. J.; Bonventre, J. V.; Jaber, B. L. (2007): Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 18 (3), S. 904–912.
- (24) Bernard, A. M.; Vyskocil, A. A.; Mahieu, P.; Lauwerys, R. R. (1987): Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury. In: *Clin. Chem.* 33 (6), S. 775–779.
- (25) Lapointe, N.; Rouleau, J. L. (2002): Cardioprotective effects of vasopeptidase inhibitors. In: *Can J Cardiol* 18 (4), S. 415–420.
- (26) Molinaro, G.; Rouleau, J.-L.; Adam, A. (2002): Vasopeptidase inhibitors: a new class of dual zinc metallopeptidase inhibitors for cardiorenal therapeutics. In: *Curr Opin Pharmacol* 2 (2), S. 131–141.
- (27) Dawson, A.; Struthers, A. D. (2002): Vasopeptidase inhibitors in heart failure. In: *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 3 (3), S. 156–159.
- (28) Nawarskas, J.; Rajan, V.; Frishman, W. H. (2001): Vasopeptidase inhibitors, neutral endopeptidase inhibitors, and dual inhibitors of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase. In: *Heart Dis* 3 (6), S. 378–385.
- (29) Elmarakby, A. A.; Morsing, P.; Pollock, J. S.; Pollock, D. M. (2003): Omapatrilat increases renal endothelin in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. In: *Vascul. Pharmacol.* 40 (5), S. 253–259.
- (30) Solomon, S. D.; Zile, M.; Pieske, B.; Voors, A.; Shah, A.; Kraigher-Krainer, E.; Shi, V.; Bransford, T.; Takeuchi, M.; Gong, J.; Lefkowitz, M.; Packer, M.; McMurray, J. J. (2012): The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial. In: *Lancet* 380 (Issue 9851), S. 1387-1395.
- (31) McMurray, J. J. V.; Packer, M.; Desai, A. S.; Gong, J.; Lefkowitz, M. P.; Rizkala, A. R.; Rouleau, J. L.; Shi, V. C.; Solomon, S. D.; Swedberg, K.; Zile, M. R. (2014): Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure. In: *New Eng J Med* 371 (11), S. 993-1004.
- (32) Cases, A. (2000): Omapatrilat: clinical pharmacology. In: *Drugs Today* 36 (12), S. 817–828
- (33) Nawarskas, J. J.; Anderson, J. R. (2000): Omapatrilat: a unique new agent for the treatment of cardiovascular disease. In: *Heart Dis* 2 (3), S. 266–274.

- (34) Birner, C.; Ulucan, C.; Bratfisch, M.; Götz, T.; Dietl, A.; Schweda, F.; Riegger, G. A.; Luchner, A. (2012): Antihypertrophic effects of combined inhibition of the renin-angiotensin-system (RAS) and neutral endopeptidase (NEP) in progressive, tachycardia-induced experimental heart failure. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. DOI: 10.1007/s00210-012-0791-6.
- (35) Luchner, A.; Muders, F.; Dietl, O.; Friedrich, E.; Blumberg, F.; Protter, A.A.; Riegger, G.A.J.; Elsner, D. (2001): Differential Expression of ANP and BNP in rabbit model of left ventricular dysfunction. In: *Cardiovascular Research* 51, S. 601 -607.
- (36) <http://genenames.org/>
- (37) <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?org=Rabbit&db=oryCun2&hgsid=155770499>
- (38) Bonventre, J. V. (2009): Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. In: *Nephrol. Dial. Transplant.* 24 (11), S. 3265–3268.
- (39) Marchewka, Z.; Kuźniar, J.; Długosz, A. (2001): Enzymuria and beta2-mikroglobulinuria in the assessment of the influence of proteinuria on the progression of glomerulopathies. In: *Int Urol Nephrol* 33 (4), S. 673–676.

8 Danksagung

Ich möchte mich für die Hilfe von mehreren Personen bedanken, die dazu beigetragen haben, diese Dissertation erfolgreich durchzuführen.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer in Personalunion, Herrn Prof. Dr. A. Luchner, für die Überlassung des Themas, die fachliche Hilfe, Nutzung der Laboreinrichtungen und die Geduld danken.

Ferner möchte ich mich bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern der 2. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Regensburg, u.a. Herrn Dr. K. Stark, für die konstruktive Unterstützung, u.a. bei der Auswahl der Primer und bei der Quantifizierung der PCR-Ergebnisse bedanken. Des Weiteren danke ich den ärztlichen Mitarbeitern der 2. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Regensburg Herrn Dr. C. Jungbauer und Herrn PD Dr. C. Birner für die Hilfe bei der statistischen Auswertung. Außerdem danke ich den Mitarbeitern des Labors der 2. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Regensburg, insbesondere Frau I. Winkel für die Laboreinweisung und die Einführung in Material und Methoden sowie für die kontinuierliche Ermutigung, freundliche und persönliche Unterstützung. Zusätzlich danke ich Herrn Dr. F. Eder, ehemaliger Mitarbeiter des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg, für seine fachliche Beratung bei der Auswertung der immunhistochemischen Bilder.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern für die Geduld und zusätzliche Hilfe danken.