

Aus dem
Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie
der
Universität Regensburg
Leiter: Univ.-Prof. Dr. Ralph Witzgall

Angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Ralph Witzgall

Vorgelegt über
das Institut für Tieranatomie II der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Leiter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Fred Sinowatz

**Therapiestudie über die Wirkung des Matrix-Metalloproteinase-Inhibitors RO
28-2653 auf das Zystenwachstum bei der polyzystischen Nierenkrankheit von
CD1^{pcy/pcy}-Mäusen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Martina Andrea Karl

aus
Steinach/Münster

München 2010

Gedruckt mit Genehmigung der tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Fred Sinowatz
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Hartmann

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1 Polyzystische Nierenerkrankung.....	7
1.1.1 Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung.....	7
1.1.2 Autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung.....	11
1.1.3 Polyzystische Nierenerkrankung bei Perserkatzen.....	12
1.2 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Matrix-Metalloproteinasen Inhibitoren.....	13
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Mausmodell	17
2.2 Versuchsaufbau und Haltungsbedingungen.....	18
2.3 Uringewinnung.....	19
2.4 Blutentnahme in Allgemeinanästhesie.....	20
2.5 Medikation.....	21
2.5.1 Der Matrix-Metalloproteinasen Inhibitor Ro 28-2653 und Vehikel.....	21
2.5.2 Applikation.....	21
2.6 Perfusionsfixierung.....	22
2.7 Histologische Schnitte.....	23
2.7.1 Herstellung der Schnitte.....	23
2.7.2 Hämatoxylin/Eosin Färbung.....	24
2.7.3 Sirius-Rot Färbung.....	25
2.8 Auswertung der Ergebnisse.....	26
2.8.1 Laboranalyse.....	26
2.8.2 Statistische Auswertung	26
2.8.3 Morphometrie.....	27
2.8.4 Weitere Bearbeitung der Daten und graphische Darstellung.....	33

3. Ergebnisse.....	34
3.1 Chemische Laboranalyse.....	34
3.1.1 Kreatinin	34
3.1.2 Harnstoff	37
3.1.3 Protein im Urin.....	39
3.1.4 Albumin im Urin.....	40
3.2 Kreatinin-Clearance.....	42
3.3 Morphometrie der mit Haematoxylin/Eosin gefärbten histologischen Schnitte.....	43
3.4 Morphometrie der mit Sirius-Rot gefärbten histologischen Schnitte.....	45
3.5 Physikalische Daten	47
4. Diskussion.....	51
4.1 Diskussion der Methoden.....	53
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	55
5. Literaturverzeichnis.....	61
6. Lebenslauf.....	67
7. Anhang.....	69
8. Eidesstattliche Erklärung.....	78
9. Danksagung.....	79

1. Einleitung

Im Sommer 1924 wurde von Prof. Dr. med. Georg Haas die erste extrakorporale Dialyse am Menschen erfolgreich durchgeführt. Derzeit sind in Deutschland laut Angaben des Kuratoriums für Dialyse und Nierentransplantation rund 60.000 Patienten dialysepflichtig. Etwa 7% aller Dialysepatienten leiden an der polyzystischen Nierenkrankheit (Frei, 2006). Weltweit sind rund 12,5 Millionen Kinder und Erwachsene von der polyzystischen Nierenkrankheit betroffen.

Die Erkrankung beruht auf einer zystischen Degeneration der Tubuli (Harnkanälchen) in den Nieren. Diese führt im Verlauf zu einer zunehmenden Vergrößerung der Nieren. Es kann dabei zu einer Funktionseinschränkung bis hin zum völligen Verlust der Nierenfunktion kommen. Typische Komplikationen sind Blutdruckerhöhung durch Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und Harnwegsinfekte. Die Erkrankung ist die häufigste erbliche Ursache eines chronischen Nierenversagens.

Die Ausbreitung von Zysten bei der polyzystischen Nierenerkrankung zeigen Parallelen zum Wachstum gutartiger Tumoren. Es wurde deswegen vermutet, dass die die Zysten auskleidenden Epithelzellen extrazelluläre Matrix abbauende Enzyme (Matrix-Metalloproteinasen, MMPs) bilden. Die Inhibierung dieser Enzyme könnte somit einen möglichen Ansatz zur Therapie dieser Krankheit darstellen.

Die therapeutische Wirksamkeit von Metalloproteinasen-Inhibitoren bei verschiedenen Krebsarten wurde bereits nachgewiesen (Lein et al., 2002). In dieser Studie wurde die Auswirkung des synthetischen Matrix-Metalloproteinasen-Inhibitors Roche 28-2653 auf die polyzystische Nierenerkrankung anhand des Mausmodells CD1^{pcy/pcy} untersucht.

1.1 Polyzystische Nierenerkrankung (PKD)

Bei der polyzystischen Nierenerkrankung des Menschen handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Krankheiten, die einerseits autosomal dominant (ADPKD) oder andererseits autosomal rezessiv (ARPKD) vererbt wird. Sie zeigt eine Prävalenz von 1 : 200 bis 1 : 1.000 (Calvet, 1998; Gabow, 1993).

1.1.1 Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD)

Mit einer Prävalenz von 1 : 1.000 ist die ADPKD eine der häufigsten monogenen Erbkrankheiten überhaupt. Genetische Grundlage ist eine Mutation auf Chromosom 4 oder 16.

Bei 85% der an ADPKD leidenden Patienten liegt eine Mutation des *PKD1* Gens, das für Polycystin-1 kodiert, auf Chromosom 16 vor (Huges et al., 1995). Polycystin-1 spielt beim Aufbau der Nierentubuli, der Reifung von Epithelzellen und bei der Aufrechterhaltung der Differenzierung eine wichtige Rolle. Auch ist eine Beteiligung an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen nachgewiesen (Kappe, 2008). Die ADPKD tritt typischerweise beim Erwachsenen auf und äußert sich durch große, mit Epithel begrenzte Zysten, die durch fokale Ausstülpung in allen Teilen des Nephrons wachsen. Die Zysten setzen sich dann von den Nephronen ab und gewinnen durch Proliferation und Vermehrung der Zystenflüssigkeit an Größe (Simons und Walz, 2006). Zum endgültigen Nierenversagen kommt es meist in einem Alter von über 50 Jahren (Hateboer et al., 1999). Die Patienten leiden häufig an Flankenschmerz, einer Makrohämaturie und Harnwegsinfektionen. Weiterhin beobachtet man oft eine arterielle Hypotonie (80%), kardiovaskuläre Defekte (Mitralklappenprolaps 25%) und Zysten in anderen Organen (Leberzysten 70%, Pankreaszysten 5%) (Yoder et al., 2006; Calvet, 1998). Es handelt sich bei der ADPKD also um eine systemische Erkrankung, die jedoch ihre Hauptmanifestation in der Niere findet. Die ADPKD macht ca. vier bis acht Prozent der Nierenerkrankungen aus, bei denen eine Transplantation nötig wird (Gardner, 1983). Die Oberfläche der vergrößerten ADPKD-Nieren ist unregelmäßig (Abbildung 1) und mit zahlreichen Zysten unterschiedlicher Größe übersät.



Abbildung 1: Beidseitiges Organpräparat der Nieren bei ADPKD. Zu erkennen sind stark vergrößerte Nieren, welche komplett von Zysten durchzogen werden. Abbildung von Dr. Edwin P. Ewing, Jr. Public Health Image Library, Center for Disease Control and Prevention, USA, www.cdc.gov.

Bei ungefähr 15% der Patienten besteht eine Mutation auf Chromosom 4 im *PKD2* Gen. Diese Form zeigt einen milderen Verlauf (Van Dijk et al., 1995). Das *PKD2* Gen kodiert für das 968 Aminosäuren große Polycystin-2. Wahrscheinlich ist Polycystin-2 ein neuartiger Kationenkanal (González-Perrett et al., 2001; Hanaoka et al., 2000; Koulen et al., 2002; Vassilev et al., 2001), der durchlässig für Calcium-Ionen ist (Sutter, Germino, 2003). Polycystin-1 kann mit Polycystin-2 interagieren (Newby et al., 2002; Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997). Dabei wird Polycystin-2 offensichtlich von Polycystin-1 reguliert (Helmig, 2005). Die Domäne der Interaktion ist in Abbildung 2 zu sehen. Möglicherweise gibt es noch eine dritte Form der polyzystischen Nierenerkrankung, die nicht mit Chromosom 16 oder Chromosom 4 in Verbindung steht (Daous et al., 1995).

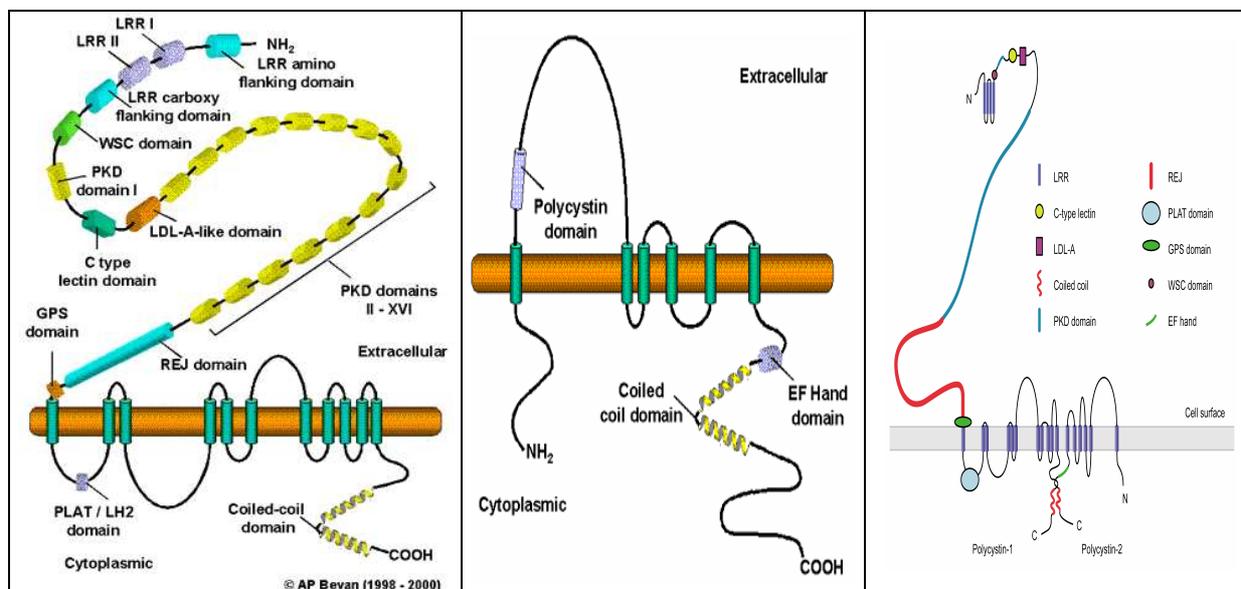


Abbildung 2: Schematische Darstellung des humanen Polycystin-1 (links) <http://www.cimr.cam.ac.uk/medgen/pkd/pkd1/pkd1.htm>, **des humanen Polycystin-2 (Mitte)** <http://www.cimr.cam.ac.uk/medgen/pkd/pkd2/pkd2.htm>, **und der Interaktion zwischen Polycystin-1 und Polycystin-2 (rechts)** (Yoder et al., 2006).

Betrachtet man die ADPKD auf zellulärer Ebene, so handelt es sich um einen rezessiven Mechanismus. Ausschlaggebend für den Beginn der Zystenbildung ist eine Keimbahnmutation in einem der *PKD1*- beziehungsweise *PKD2*-Allele und eine weitere somatische Mutation (second hit) (Germino, 1997; Pei et al., 1999). Durch die somatische Mutation wird die Proliferation der betroffenen Zelle stimuliert (Abbildung 3). Solche Zellen werden zum Ausgangspunkt für neue Zysten. Die

Second-hit-Theorie bietet auch eine Erklärung dafür, dass nur etwa 1% aller Nephrone bei der ADPKD Zysten bilden, obwohl alle Zellen die vererbte Mutation tragen. Dies wurde bei Versuchen mit Knockout-Mäusen bestätigt (Kühn und Walz, 2007).

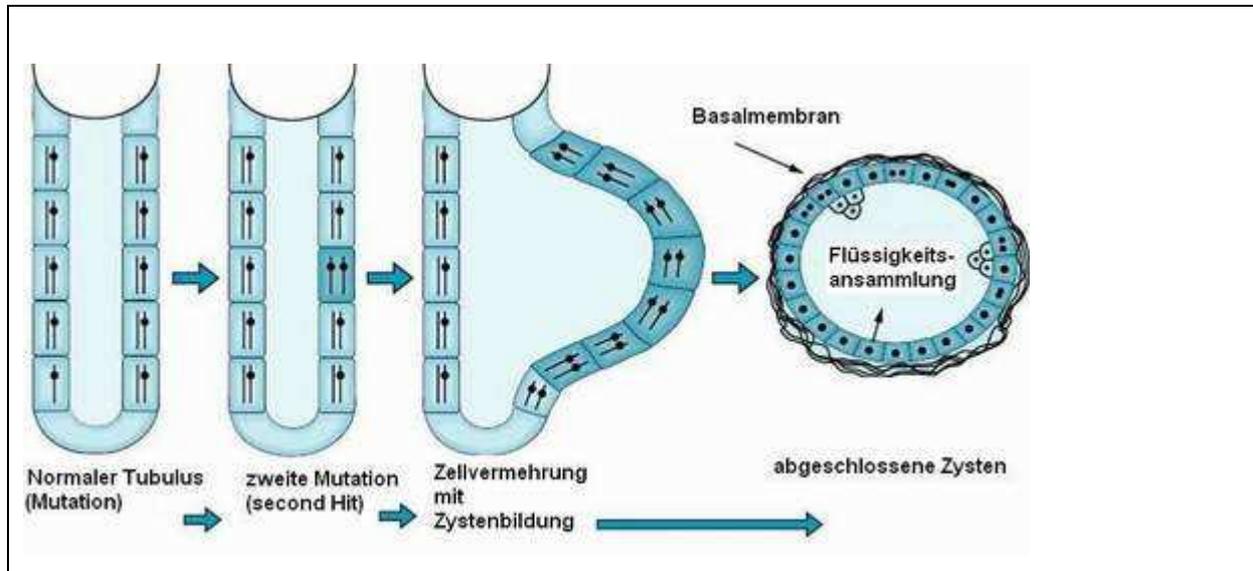


Abbildung 3: Graphische Darstellung der Zystenentstehung am Beispiel einer *PKD1* Genmutation (Schrier, 1999). Der normale Tubulus mit einer Keimzellmutation in jeder Zelle (*PKD1* Gen). Im Laufe des Lebens entsteht eine somatische Mutation (second hit) im zweiten *PKD1* Allel. Dadurch wird eine Zellvermehrung ausgelöst, die zur Zystenbildung führt. Es kommt dabei zu Verdickungen der Basalmembran um die Harnkanälchen. Dadurch entstehen teilweise abgeschlossene Zysten, die von ihrem ursprünglichen Harnkanälchensystem abgetrennt werden (Schrier, 1999).

1.1.2 Autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD)

Die autosomal rezessiv vererbte Form der polyzystischen Nierenerkrankung ist seltener anzutreffen. Bei der autosomal rezessiven Form sind in erster Linie Neugeborene oder Kinder im frühen Kindesalter betroffen. Die Nieren sind vergrößert und durch Fibrose gekennzeichnet. Die Kinder werden nicht selten tot geboren oder sterben kurz nach der Geburt an einer Urämie.

Bei dieser Form der Erkrankung liegt eine Mutation im *PKHD1*-Gen vor (Onuchic et al.; 2002, Ward et al., 2002). *PKHD1* gehört zu den größten bisher bekannten menschlichen Genen. Das *PKHD1*-Gen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 6 p21.2-p12 und kodiert für das Transmembranprotein Fibrocystin (Ward et al., 2002). In der apikalen Domäne polarisierter epithelialer Zellen spielt Fibrocystin offensichtlich in der Bildung der Tubuli und/oder der Aufrechterhaltung der Architektur des Lumens des Sammelrohrs in der Niere eine wichtige Rolle (Zhang et al., 2004).

1.1.3 Polyzystische Nierenerkrankung bei Perserkatzen

Die polyzystische Nierenerkrankung ist eine weit verbreitete, dominant vererbte Krankheit, die Perserkatzen und deren Abkömmlinge betrifft. Rund 38% der Perserkatzen weltweit leiden an dieser Erkrankung. Die polyzystische Nierenerkrankung kann somit als bedeutendste vererbte Erkrankung bei der Katze angesehen werden. Sie führt neben der Bildung von Zysten in Leber und Bauchspeicheldrüse zur Bildung von flüssigkeitsgefüllten Zysten in der Niere, die letztendlich das Nierenversagen verursachen, das zum Tode einer betroffenen Katze führt. Die polyzystische Nierenerkrankung tritt im jugendlichen Alter der Katze auf. Die Diagnose mittels Ultraschall kann frühestens mit dem Auftreten erster Krankheitserscheinungen im Alter von ca. 8 Monaten gestellt werden. Vor einiger Zeit konnte die Arbeitsgruppe um Leslie Lyons an der Universität von Davis in Kalifornien eine Mutation im *PKD1* Gen identifizieren, die bei allen 48 von Zystennieren betroffenen Katzen (41 Perser-Katzen, Ragdolls, Domestic Shorthairs, und einigen weiteren Rassen, die als Auskreuzung der Perserkatze bekannt sind, sowie Exotic Shorthair, Selkirk Rex und Scottish Folds) gefunden wurde. Diese Mutation war in den 33 untersuchten nicht erkrankten Katzen nicht vorhanden. Aufgrund dieser Daten konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass diese Mutation im Exon 29 des *PKD1* Gens die polyzystische Nierenerkrankung bei der Katze verursacht. Im Gegensatz zum Menschen, bei dem viele verschiedene Mutationen gefunden wurden, konnte bei allen Katzen, sogar bei den verschiedenen betroffenen Rassen, bislang nur eine einzige Mutation identifiziert werden (Barthez et al., 2003).

1.2 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und MMP Inhibitoren

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) gehören zu einer Familie von teilweise membrangebundenen, zinkabhängigen, endogenen Proteinasen mit der Fähigkeit, verschiedenste Komponenten der extrazellulären Matrix, wie z.B. Kollagen, Fibronectin und Elastin abzubauen (Liotta und Stetler-Stevenson, 1991). Abbildung 4 gibt einen Überblick über Matrix-Metalloproteinasen und deren Eigenschaften.

MMP	Enzym	M _w [kDa]	Substrat	Produziert durch
1	Interstitielle Kollagenase	55	Faserkollagen, Gelatine, Proteoglykan Abspaltung Kollagen-Tripel-Helix Natürlicher Inhibitor: TIMPs (Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteinasen)	Keratinocyten, Zellen der Dermis, Entzündungszellen
2	Gelatinase A	72	Denaturiertes Kollagen, Kollagen IV, V, VII, X Elastin, KM-Komponenten, Fibrillin, Fibronectin	Zellen der Dermis
3	Stromelysin 1	57	Proteoglykan, Kollagen X, XI, Prokollagen, Gelatin-denaturiertes Kollagen, Fibronectin, Fibrillin, Laminin, Kollagenase, Gelatinase B	Keratinocyten Zellen der Dermis
7	Matrilysin (PUMP)	28	Kollagen X, XI, Procollagen, Gelatin, Fibronectin, Laminin, Elastin, Kollagenase, Gelatinase B	
8	Neutrophilen Kollagenase	75	Faserkollagen, Gelatine, Proteoglykan Abspaltung Kollagen-Tripel-Helix	Entzündungszellen
9	Gelatinase B	92	Denaturiertes Kollagen, Kollagen IV, V, VII, X Elastin, KM-Komponenten, Fibrillin, Fibronectin	Keratinocyten Entzündungszellen
10	Stromelysin 2	57	Proteoglykan, Kollagen X, XI, Prokollagen, Gelatin-denaturiertes Kollagen, Fibronectin, Fibrillin, Laminin, Kollagenase, Gelatinase B	Keratinocyten
11	Stromelysin 3	51	unbekannt	
12	Makrophagen-Metalloelastase		Denaturiertes Kollagen, Elastin, KM-Komponenten, Fibrillin, Fibronectin	Entzündungszellen
13	Kollagenase 3		Denaturiertes Kollagen, Elastin, KM-Komponenten, Fibrillin, Fibronectin	Zellen der Dermis
14	MT1-MMP			Zellen der Dermis

Abbildung 4: Metalloproteinasen nach Barrick et al., 1999. KM = Knochenmark, ECM = Extrazellulärmatrix, PUMP = Punctuated Metalloproteinasen, MT1 = Membran Typ 1.

Wegen ihres Auftretens in den verschiedensten Geweben werden diese Proteinase als Schlüsselenzyme in physiologischen Prozessen wie z.B. bei der Wundheilung, Gewebsumbau und Regeneration, Knochenresorption und Trophoblasteninvasion gesehen (Crawford und Matrisian, 1994). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass MMPs eine ausschlaggebende Rolle bei pathologischen Zuständen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis oder Krebs, spielen (Anderson et al., 1995). So beruht z.B. die Metastasierung auf einer Auflösung des Gewebsverbandes und somit einem Verlust der Zelladhäsion und Abbau der Basalmembran. MMPs sind ausschlaggebend für den Eintritt von Tumorzellen in Lymph- und Blutgefäße und die Besiedlung anderer Organe (Rabbani, 1998). MMPs werden aber auch von anderen Zelltypen wie Fibroblasten, Synovialzellen, Makrophagen, Neutrophilen und einigen epithelialen Zellen produziert und sezerniert. Die proteolytische Aktivität und die Sekrete der MMPs sind normalerweise streng durch verschiedenste Mechanismen reguliert. Wachstumsfaktoren wie PDGF und EGF sowie Zytokine, hier besonders IL-1 und TNF, stimulieren die MMP-bildenden Zellen, während TGF- β und Steroide die MMP Ausschüttung inhibieren (Gravallese et al., 1991; Shingu et al., 1993). Die ausgeschütteten MMPs werden dann durch IL-1-getriggerte Plasminausschüttung und über MMP-3-induzierte Autokatalyse aktiviert.

Einmal aktivierte MMPs werden vom Organismus auf Grund ihrer starken enzymatischen Wirksamkeit schnell wieder inaktiviert. Diese Inaktivierung geschieht durch TIMPs und das Serumprotein α 2-Makroglobulin. TIMPs werden von den meisten mesenchymalen Zellen produziert und unterscheiden sich bezüglich ihrer Assoziation zu bestimmten MMPs und ihrer Gewebeverteilung (Nagase et al., 1999). Im Gegensatz dazu ist α 2-Makroglobulin ein unspezifischer Inhibitor der MMP (Wagener et al., 1999). Die Gewebsinhibitoren hemmen sowohl inaktive als auch aktivierte Metalloproteinasen und verhindern damit den Abbau der extrazellulären Matrix (Böcker et al., 2001). Erhöhte Expression von MMPs und TIMPs steht in Korrelation mit erhöhter Invasivität verschiedener Krebsarten des Menschen, wie z.B. Brust-, Dickdarm-, Magen- und Nierenkrebs (Davies et al., 1993).

MMPs werden als inaktive Präproenzyme synthetisiert, als Proenzyme sezerniert und durch proteolytische Abspaltung der aus 80-90 AS bestehenden Propeptiddomäne aktiviert. Die katalytische Domäne als das aktive Zentrum weist mit einem aus 5 AS bestehendem Motiv eine Bindungsstelle für Zinkionen auf, die für die Enzymaktivität wichtig ist. Die Hämapexin-ähnliche Domäne (über 210 AS lang) spielt für die Substratbindung eine wichtige Rolle (Abbildung 5).

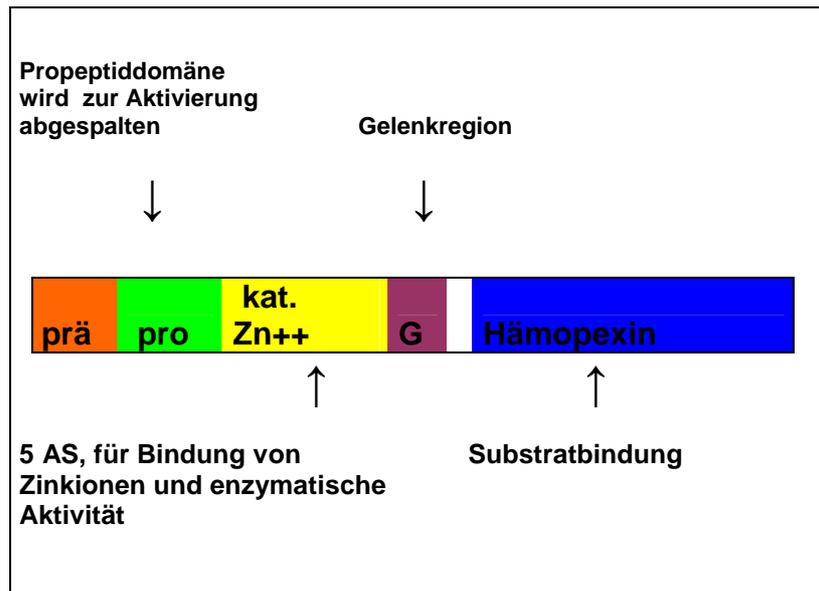


Abbildung 5: Darstellung der Domänenstruktur von MMP-1 und -3 (nach Powell et al., 1996). Dargestellt sind die Präpeptiddomäne (prä), die Propeptiddomäne (pro), die katalytische Domäne (kat. Zn⁺⁺), die Gelenkregion (G), und die Hämapexin-Domäne (Hämapexin).

MMP-1, -8, -13 und -18 (Kollagenasen) spalten die Tripelhelix fibrillärer Kollagene (Nagase et al. 1999; Massova et al., 1998). Die Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 spalten vornehmlich Typ-IV-Kollagen, das als Hauptbestandteil der Basalmembran gilt. Es wurde in Zellkulturen nachgewiesen, dass die Höhe der Expression von MMP-9 und MMP-2 in Tumorzelllinien mit deren metastatischem Potential einhergeht. Zellen mit hoher Aggressivität weisen eine signifikant höhere Expression von MMP-2 und MMP-9 auf als Zellen mit einer niedrigeren Aggressivität. (Bernard et al., 1990; Turpeenniemi-Hujanen et al., 1985; Ura et al., 1989).

MMP-2 besitzt ein Molekulargewicht von 72 kDa in der inaktiven und 66 kDa in der aktiven Form. Die Proteinase wird von Fibroblasten, Endothel und Tumorzellen produziert. Neben Typ-IV-Kollagen gehören auch Kollagen vom Typ V, VII, X und XI, Gelatin, Laminin, Fibronectin, Galektin-3 (Ochieng et al., 1994) und Elastin zu den Substraten von MMP-2.

MMP-9 besitzt mit 92 kDa in ihrer inaktiven und 86 kDa in ihrer aktiven Form ein höheres Molekulargewicht. MMP-9 wird ebenfalls von Tumorzellen und Endothel, aber auch von Entzündungs- und Epithelzellen sezerniert. Sie spaltet neben den Kollagenen vom Typ II, IV und V auch Gelatin, Galektin-3 und Elastin.

Einige Studien haben die Bedeutung der MMPs und der TIMPs bei der polyzystischen Nierenerkrankung nachgewiesen (Gardner et al., 1991; Norman et al., 1995; Rankin et al., 1999; Rankin et al., 1996; Schaefer et al., 1996; Slade et al., 1998). Konkretere Erkenntnisse stammen aus Experimenten mit Organkulturen, in denen die Rolle von MMPs und TIMPs in tubulären Strukturen und Zystenstrukturen untersucht wurde. So produzieren murine Nieren nicht nur in vitro MMPs, sondern es wird auch die Organogenese der Nieren durch die Hemmung von MMP-9 (Lelongt et al., 1997), MMP-14, und möglicherweise MMP-2 beeinflusst (Kanwar et al., 1999).

Ein Ansatz für eine medizinische Behandlung dieser Erbkrankheiten könnte also die gezielte Beeinflussung der MMPs sein. Die Industrie stellt verschiedene MMP-Inhibitoren unterschiedlicher Spezifität zur Verfügung. In dieser Studie wurden die Auswirkungen des synthetischen MMP-Inhibitors Ro 28-2653, der eine hohe Selektivität für MMP-2, MMP-9 und Membran Typ1 Matrix-Metalloproteinasen (MMP-14) besitzt (Lein et al., 2002), untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Mausmodell

Diese Therapiestudie wurde mit 42 Mäusen des Stammes CD1^{pcy/pcy} durchgeführt. Es handelt sich hierbei um Tiere, welche eine langsam voranschreitende polyzystische Nierenerkrankung vererben. Die Studie wurde sowohl mit männlichen als auch weiblichen Tieren durchgeführt. Die polyzystische Nierenerkrankung der CD1^{pcy/pcy}-Mäuse ist autosomal rezessiv vererbt.

Der *pcy* Locus wurde auf dem Chromosom 9 der Maus lokalisiert und wird von den Markern D9Mit16 und D9Mit24 flankiert (Nagao et al., 1995). Es konnte nachgewiesen werden, daß dieser Abschnitt des Maus-Chromosoms 9 synten zur *NPHP3*-Region des Menschen ist (Omran et al., 2001). In der Tat wurde nach Klonierung des *pcy* Locus auch das *NPHP3*-Gen des Menschen identifiziert (Olbrich et al., 2003).

Das Krankheitsbild der Mäuse ähnelt bezüglich seiner Entwicklung und Pathologie der autosomal rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung beim Menschen. Schon in Feten und Neugeborenen sind morphologische Veränderungen wie segmentale Dilatation distaler Tubuli und Sammelrohre zu sehen. Im Alter von ca. acht Wochen entwickeln die Tiere analog zur menschlichen Erkrankung in allen Nephronsegmenten und Sammelrohren Zysten, die im weiteren Krankheitsverlauf die Nieren mehr und mehr dominieren. Die Nieren der CD1^{pcy/pcy}-Mäuse werden im Vergleich zu denen gesunder Tiere merklich größer (Takahashi et al., 1991).

2.2 Versuchsaufbau und Haltungsbedingungen

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere jeweils in eine Placebo- und eine Verumgruppe eingeteilt. Innerhalb der Gruppe erfolgte eine geschlechtlich getrennte Auswertung. Zur späteren eindeutigen Identifikation wurden die Tiere vor Versuchsbeginn mit Metallohrmarken versehen.

Die Tiere wurden in P.B.1230-Standardkäfigen der Firma Ehret (Emmendingen) unter kontrollierten Bedingungen im Tierstall des Vorklinikums der Universität Regensburg gehalten. In jedem Käfig befanden sich vier bis acht Mäuse, die jederzeit freien Zugang zu Leitungswasser und Futter (Nagerfutter der Firma Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) hatten.

Im Alter von 36 bis 42 Tagen erfolgte eine Uringewinnung mit Hilfe von Stoffwechsellkäfigen und im Anschluss daran eine retrobulbäre Blutentnahme in Allgemeinanästhesie. Das Gewicht der Tiere variierte zu diesem Zeitpunkt zwischen 13,3 g und 21 g. Nach einer eintägigen Pause wurde den Mäusen der Verumgruppe täglich (per Sonde, Applikationsmenge in Abhängigkeit des Körpergewichts) der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) Inhibitor Ro 28-2653 oral eingegeben. Die Verabreichung erstreckte sich über einen Zeitraum von neun Wochen. Die Vorgehensweise in der Placebogruppe entsprach der in der Verumgruppe, zur Verabreichung kam hier nur die wirkstofffreie Trägerlösung.

Zum Ende der Therapiestudie erfolgte eine erneute Blut- sowie Uringewinnung, die verfahrenstechnisch derjenigen vor der Medikation entsprach. Den Tieren wurden nach einer sich unmittelbar an die Blutentnahme anschließenden Perfusionsfixierung Nieren und Herz entnommen. Nieren und Herzen wurde einzeln gewogen. Die Nieren wurden bis zur Weiterverarbeitung in 4% Paraformaldehyd/1x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) gelagert.

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung wurden die Nieren in Paraffin eingebettet und 7 µm dicke Schnitte angefertigt, die mit Haematoxylin/Eosin (HE) und Sirius-Rot gefärbt wurden. Die morphometrische Auswertung der Nierenschnitte erfolgte mit Hilfe der Bildauswertungssoftware ImageJ. Mit dieser Software wurde bei den

Haematoxylin/Eosin Schnitten die Anzahl der Zysten, die Zystenfläche, der Anteil der Zystenfläche an der Gesamtfläche, die Durchschnittsgröße der Zysten sowie die Größe der einzelnen Zysten ermittelt. Bei den Sirius-Rot-Schnitten wurde der speziell angefärbte Kollagenanteil im Nierengewebe ermittelt. Sowohl bei der HE- als auch bei der Sirius-Rot Färbung wurden Vergleiche zwischen den Placebo- und Verumgruppen angestellt.

Die Studie wurde durch die Regierung der Oberpfalz genehmigt.

2.3 Uringewinnung

Die Uringewinnung erfolgte mit Hilfe von Stoffwechsellkäfigen für kleine Nager (Tecniplast der Firma Ehret, Emmendingen). Der Urin kann über einen konusförmigen Trichter in einen Sammelbehälter abfließen und steht dann für laborchemische Analysen zur Verfügung.

Jedes Tier wurde für 24 Stunden in einen eigenen Stoffwechsellkäfig gesetzt. Die Tiere hatten hierbei freien Zugang zu Leitungswasser und Futter. Es konnten Urinmengen von 0,1 g bis 3,55 g gewonnen werden. Der Urin wurde bei 7.000 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand jeweils in PE-Gefäße (2,0 ml, Eppendorf, Hamburg) überführt und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

2.4 Blutentnahme in Allgemeinanästhesie

Folgende Materialien wurden für die Blutentnahme benötigt:

- Xylazinhydrochlorid 2% (Bernburg AG, Bernburg)
- Ketaminhydrochlorid 10% (WDT, Garbsen)
- Insulinkanülen (Becton–Dickinson GmbH, Heidelberg)
- Insulinspritzen/0,5 ml (Becton–Dickinson GmbH, Heidelberg)
- Micro-haematocrit Kapillare, Natriumheparin beschichtet (Brand GmbH, Wertheim)
- Microvetten 500 µl, Lithiumheparin beschichtet (Sarstedt, Nürnberg)

Bei der Blutentnahme wurde wie folgt vorgegangen:

Zu Beginn erfolgte die Herstellung der Injektionslösung (Mischung aus Ketaminhydrochlorid und Xylazinhydrochlorid in einem Verhältnis von 2:1). Das Injektionsvolumen betrug 1 - 1,25 µl/g Körpergewicht. Zur Injektion wurde die Maus mit einer Hand fixiert (zwischen Daumen und Zeigefinger die Nackenfalte, zwischen Ringfinger und kleinem Finger die Schwanzbasis). Die Injektion erfolgte mit der anderen Hand in der Medianen, ca. 1 cm distal des Brustbeins intraperitoneal. Die Tiere wurden bis zum Eintreten des gewünschten sedativen, relaxierenden und analgetischen Effektes in ihren Käfig zurücksetzt. Im Anschluss daran wurden die anästhesierten Tiere erneut mit einer Hand fixiert (Daumen und Zeigefinger fixierten Schädeldach und Unterkiefer), mit der andere Hand wurde die Micro-haematocrit Kapillare im nasalen Augenwinkel am Augapfel vorbei hinter diesen geschoben. Der retrobulbär liegende Venenkomplex wurde angestochen. Das aus dem anderen Ende der Micro-haematocrit Kapillare tropfende Blut wurde in einer Microvette auffangen (es wurden 70-220 µl/Maus entnommen). Das entnommene Blut wurde anschließend 5 Minuten lang bei 11.000 rpm zentrifugiert und bei -20°C eingefroren.

2.5 Medikation

2.5.1 Der Matrix-Metalloproteinasen Inhibitor Ro 28-2653 und Vehikel

Der Verumgruppe wurde der synthetische Matrix-Metalloproteinasen Inhibitor Ro 28-2653 (5-biphenyl-4-yl-5-[4-(-nitro-phenyl)-piperazin-1-yl]-pyrimidine-2,4,6-trione) der Firma Roche Diagnostics GmbH, Pharma Research (Penzberg) verabreicht. Ro 28-2653 besitzt eine hohe Spezifität für MMP-2, MMP-9 und MMP-14. Die Applikation erfolgte oral in einer 1:1 Mischung mit Eudralgit L 100 (Röhm GmbH & Co. KG) nach Resuspension im Ultraschallbad. Die Dosierung lag bei 100 mg/kg Körpergewicht, dies entsprach einem gesamten Applikationsvolumen von 0,08 ml bis 0,18 ml. Als Vehikel wurde Carboxymethylcellulose Lösung verwendet. Der Placebogruppe wurde alleine das Vehikel verabreicht. Das Applikationsvolumen entsprach jeweils dem der Verumgruppe.

2.5.2 Applikation

Zur Applikation wurden Knopfkanülen (Fisher-Scientific Company, New Jersey) und Einmalspritzen (1 ml, Dispomed Witt OHG, Gelnhausen) verwendet. Die Fixation der Mäuse erfolgte durch Greifen der Nackenfalte mit Daumen und Zeigefinger und Fixation der Schwanzbasis zwischen Ring- und kleinem Finger. Die Knopfkanüle wurde über den Pharynxgrund in den Oesophagus vorgeschoben. Die Applikation des Medikamentengemisches oder des Vehikels erfolgte tief im Oesophagus.

2.6 Perfusionsfixierung

Folgende Materialien wurden zu Perfusionsfixierung und Organentnahme benötigt:

- Klebeband und Stecknadeln
- Chirurgisches Besteck: Fine Science Tools (Präparierschere, Skalpell, anatomische Pinzette, Moskito-Klemme)
- Anschlingfaden
- Polyethylenschlauch (Außendurchmesser: 10 mm, Innendurchmesser: 8 mm)
- Stoppuhr
- 4% Paraformaldehyd in 1x PBS, pH 7,4
- Waage
- Perfusionssystem
- Liquemin® [Roche, Heparin–Natrium 25000 I.E. wird 1:4 mit 0,9% NaCl (Ratiopharm GmbH)] verdünnt.

Die Perfusionsfixierung erfolgte unmittelbar nach der Blutentnahme, so dass die bereits erfolgte Anästhesie (Mischspritze: Ketaminhydrochlorid/Xylazinhydrochlorid 2:1, Injektionsvolumen: 1 - 1,25 µl/g Körpergewicht, Injektion: intraperitoneal) genutzt werden konnte. Die anästhesierten Tiere wurden in Rückenlage mit Hilfe von Klebeband und Stecknadeln an den Pfoten fixiert und der Bauchraum eröffnet. Die Aorta wurde frei präpariert, mit einer Klemme abgeklemmt und angeschlossen. Anschließend erfolgte kaudal der Klemme die Eröffnung der Aorta, so dass ein nach kranial gerichteter Polyethylenschlauch eingelegt und mit Hilfe der gelegten Schlinge in der Aorta fixiert werden konnte. Der Schlauch wurde zuvor mit einer Lösung aus einem Teil Liquemin® und drei Teilen 0,9% Natriumchlorid gespült und anschließend mit dem Perfusionssystem verbunden. Bei Perfusionsbeginn wurde die kranial sitzende Klemme entfernt, zum Druckausgleich erfolgte die Eröffnung der Vena cava caudalis. Die Tiere wurden durch die Aorta mit 4% Paraformaldehyd in 1x PBS bei einem Druck von 180 bis 200 mm Hg drei Minuten lang perfundiert. Nieren und Herz wurden entnommen und gewogen. Die Nieren wurden mit einer Rasierklinge in zwei Hälften getrennt und in 4% Paraformaldehyd in 1x PBS über Nacht gelagert und anschließend in Paraffin eingebettet.

2.7 Histologische Schnitte

2.7.1 Herstellung der Schnitte

Die Nierenhälften wurden in Paraffin (Paraplast Plus, Kendall) eingebettet und an einem Mikrotom RM 2255 der Firma Leica in 7 µm dicken Schnitten weiter verarbeitet. Diese wurden auf Objektträger aufgebracht und über Nacht zum Strecken in eine 60°C warme Wärmekammer gegeben. Nach einer Abkühlungszeit von 60 Minuten folgte nach folgendem Protokoll die Entparaffinierung.

- Xylol:	2x 10 Minuten
- 100% Isopropanol:	Eine Sekunde tauchen
- 100% Isopropanol:	2x 5 Minuten
- 96% Isopropanol:	2x 5 Minuten
- 80% Isopropanol:	2x 5 Minuten
- 70% Isopropanol:	Bis zur Färbung

2.7.2 Hämatoxylin/Eosin Färbung

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| - Hämalaun:
(Hämatoxylin-Monohydrat, Zusammensetzung:
4,4 g/l, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O}$ 28 g/l, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ 1 g/l,
Merck) | 2 Minuten |
| - Spülen mit Leitungswasser: | 2 Minuten |
| - 0,1%-HCl-Alkohol:
(1.000 ml 70% Isopropanol + 3,2 ml 32%ige HCl) | 2 mal spülen |
| - Spülen mit Leitungswasser: | 10 Minuten |
| - 100 ml Eosin Lösung 0,5%
+ 0,2 ml Eisessig: | 1 Minute |
| - 70% Isopropanol: | Spülen |
| - 80% Isopropanol: | Spülen |
| - 90% Isopropanol: | 1 Minute |
| - 100% Isopropanol: | 2x 5 Minuten |
| - Xylol: | 1x 5 und 1x 10 Minuten |
| - Serva Depex (Boehringer, Ingelheim): | Eindeckeln |

2.7.3 Sirius-Rot Färbung

- Aqua dest: Eine Sekunde tauchen

- Picro-Sirius-Rot Lösung: 60 Minuten
(0,1 g Sirius-Rot in 100 ml 1,2% wässriger
Pikrinsäurelösung, Sigma-Aldrich)

- 100% Ethanol: 2 mal kurz tauchen

- Xylol: 1x 5 Minuten

- Xylol: Bis zum Eindeckeln

- Anschließend eindeckeln mit Serva Depex (Boehringer, Ingelheim)

i2.8 Auswertung der Ergebnisse

2.8.1 Laboranalyse

Die Laborparameter Harnstoff und Kreatinin im Blut und die Laborparameter Kreatinin, Harnstoff und Protein im Urin wurden mit Hilfe eines Hitachi Analyzers (Modell 912) ermittelt. Zur Analyse des Albuminanteiles im Blut wurde am Zentrum für medizinische Forschung in Mannheim ein kompetitiver ELISA entwickelt, der auch hier zur Analyse verwendet wurde. Aus der renalen Clearance bestimmter Indikatorsubstanzen, die tubulär weder sezerniert noch rückresorbiert werden, wie zum Beispiel Kreatinin, kann auf die glomeruläre Filtrationsrate der Nieren geschlossen werden. Die Clearance ist eine rechnerische Größe. Sie wurde mit Hilfe der Laboranalysenparameter wie folgt ermittelt:

$$C_{\text{Kreatinin}} = \frac{[\text{Kreatinin}] (\text{Urin}) \times \text{Fluss (Urin)}}{[\text{Kreatinin}] (\text{Plasma})}$$

2.8.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der Programmiersprache „R“ vorgenommen. Hierbei wurde der Kolmogorov-Smirnov Test als statistischer Test gewählt. R ist eine freie Programmiersprache, die auf Basis der S Programmiersprache heraus von Ross Ihaka und Robert Gentleman an der Universität von Auckland (Neuseeland) entwickelt wurde. R wird in der statistischen Software Entwicklung, in statistischen Datenanalysen und in der Erzeugung von statistischen Graphiken weit verbreitet eingesetzt. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die Standardabweichungen wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel überprüft.

2.8.3 Morphometrie

Die einzelnen histologischen Schnitte konnten nur als Teilbereiche (Viertel-, Fünftel- oder Sechstelnieren) fotografiert werden. Die Teilbereiche mussten zur Auswertung ebenfalls nochmals unterteilt werden, um verfälschte Messergebnisse zu vermeiden. Aus den Teilergebnissen wurde dann das Gesamtergebnis pro Niere errechnet.

Zur Morphometrie wurden die Schnitte in digitaler Form benötigt. Die Digitalisierung erfolgte mit Hilfe einer auf einem Mikroskop aufgesetzten Polaroidkamera. Bei dem Mikroskop handelte es sich um ein „Axioskop“ der Firma Zeiss. Die Bilder wurden digital auf einen PC übertragen und mit ImageJ weiter bearbeitet (siehe Abbildung 6 bis Abbildung 12). ImageJ ist ein in Java geschriebenes und damit plattformunabhängiges Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm. Es wird vielfach für medizinische und wissenschaftliche Bildanalyse genutzt, z.B. zum Vermessen von Strukturen auf Mikroskopaufnahmen. Die Funktionalität des Programms kann durch Plugins erweitert werden (<http://de.wikipedia.org>).

Auswertung der Hämatoxylin/Eosin Schnitte

Der folgende Abschnitt beschreibt die Vorgehensweise der Auswertung der Hämatoxylin/Eosin Schnitte. Diese wurden angefertigt, um einen Vergleich zwischen den Placebo- und Verumgruppen zu erhalten. Verglichen wurden:

- die Anzahl der Zysten,
- die Zystenfläche,
- der Anteil der Zystenfläche an der Gesamtfläche,
- die Durchschnittsgröße der Zysten,
- die Größe der einzelnen Zysten.

Die digitalisierten Schnitte wurden mit ImageJ geöffnet (Abbildung 6).

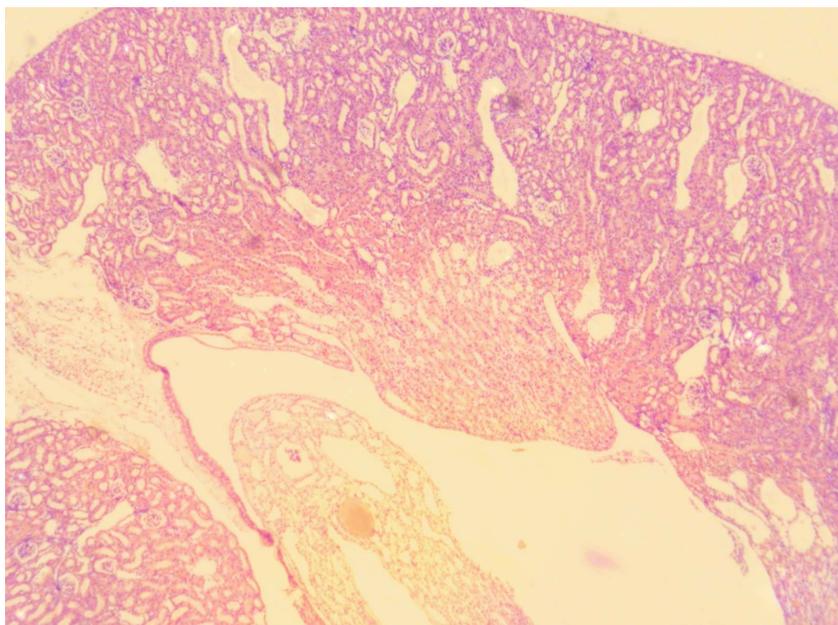


Abbildung 6: Rohbild.

Es folgte das Umwandeln des Bildes in ein Graustufenbild (Abbildung 7).

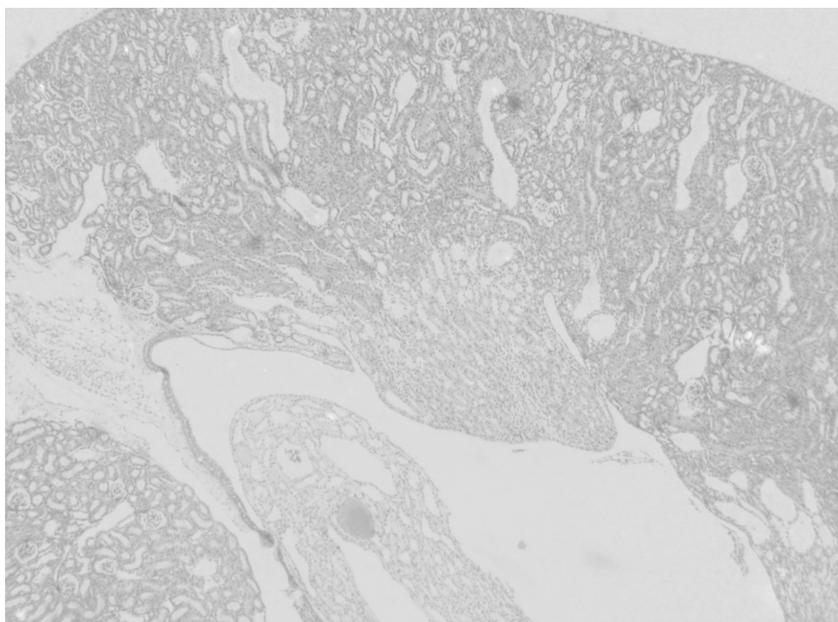


Abbildung 7: Graustufenbild.

Die einzelnen Zysten wurden mit Hilfe der Funktionen Image, Adjust, Threshold markiert. Die Messbereiche innerhalb eines Bildes wurden individuell festgelegt und mit Hilfe der Funktion Polygon Selections markiert (Abbildung 8) und anschließend zu einem Gesamtergebnis zusammengefasst. Somit konnte eine Verfälschung der Messergebnisse vermieden werden, da Blutgefäße, Artefakte und Verunreinigungen ausgespart wurden. Zur weiteren Auswertung des Schnittes wurden die Zysten im nächsten Messbereich markiert und ausgewertet. Das Gesamtergebnis ergab sich aus dem Zusammensetzen der einzelnen Messbereiche.

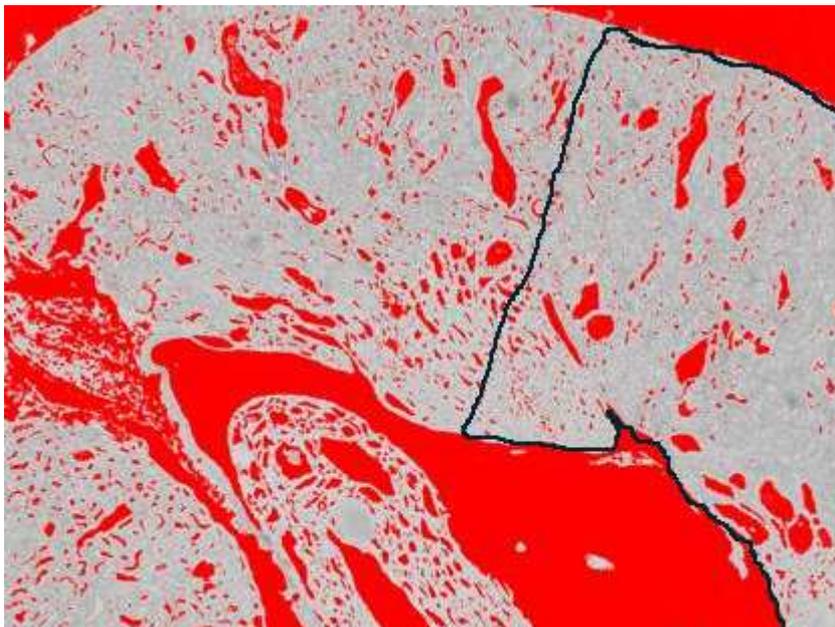


Abbildung 8: Individuelle Festlegung der Messbereiche. Der Messbereich wurde zu Demonstrationszwecken mit „Paintbrush Tool“ markiert.

Um weiterhin Messfehler zu vermeiden, wurden die zu vermessenden Zysten nochmals durch Hinterlegen mit Masken kontrolliert (Abbildung 9). Markierungen, die nicht ausgewertet werden sollten, da sie von Blutgefäßen, Verunreinigungen oder Artefakten stammten, wurden durch eine erneute Festlegung der Messbereiche ausgespart.

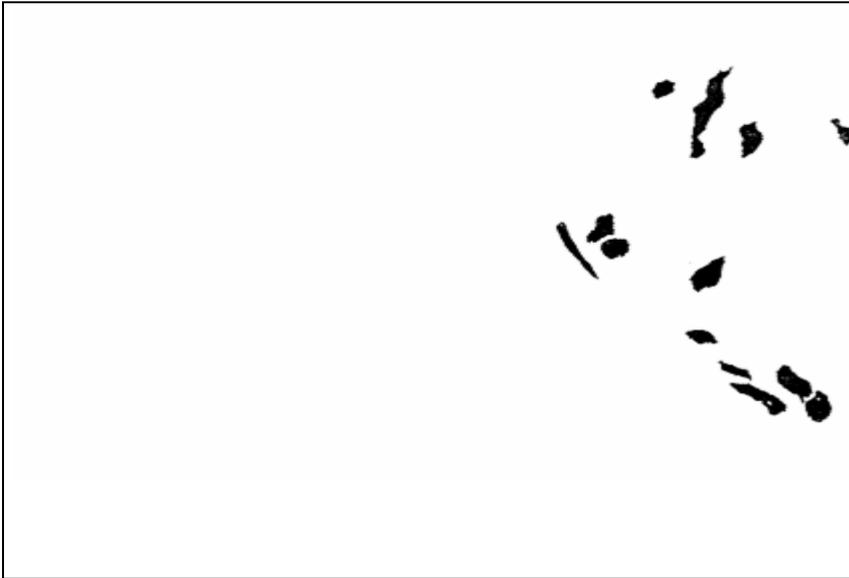


Abbildung 9: Hinterlegung der Zysten mit Masken.

Die Vermessung der Zysten erfolgte mit Hilfe der Analysefunktion von ImageJ. Als Zysten wurde eine Fläche größer 1.000 Pixel definiert, da diese Anzahl an Pixel die Wertung von Glomerula als Zysten weitestgehend ausschließt. Aus diesen, in Pixel angegebenen Messergebnissen, wurden Zystenflächen, Zystenanteile und Durchschnittsgrößen errechnet.

Auswertung der Sirius-Rot Schnitte

Der folgende Abschnitt beschreibt die Vorgehensweise der Auswertung der Sirius-Rot Schnitte. Die Sirius-Rot Schnitte wurden angefertigt, um den Anteil des Kollagens im Nierengewebe der Placebo- mit den Verumgruppen zu vergleichen. Zur Analyse wurde das Bild ebenfalls mit ImageJ geöffnet (Abbildung 10).

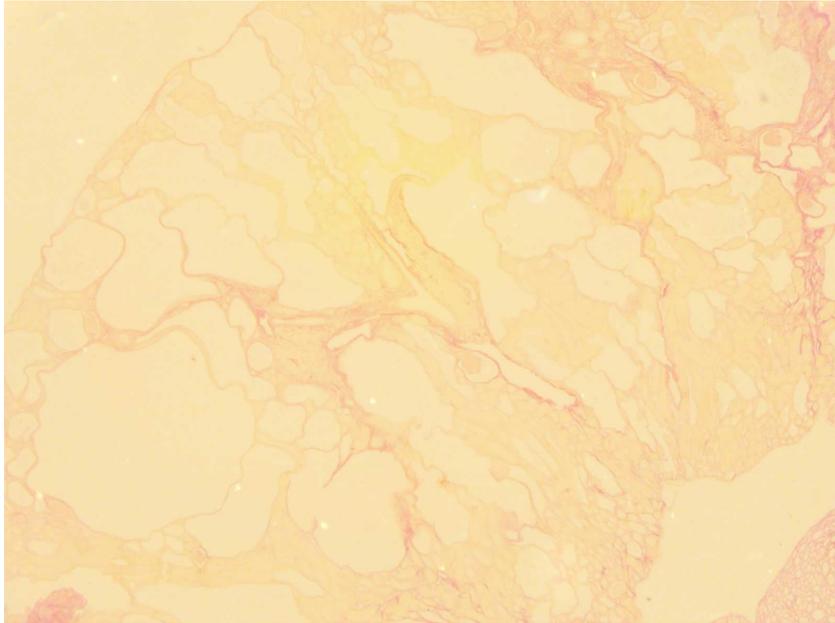


Abbildung 10: Geöffnetes Bild.

Weiterhin wurden die geöffneten Bilder mit der Funktion Rot-Gelb-Grün-Split bearbeitet. Zur Verwendung kamen die Bilder mit Grünanteil (Abbildung 11), da bei diesen die speziell mit Sirius-Rot angefärbten Anteile besser hervortreten.

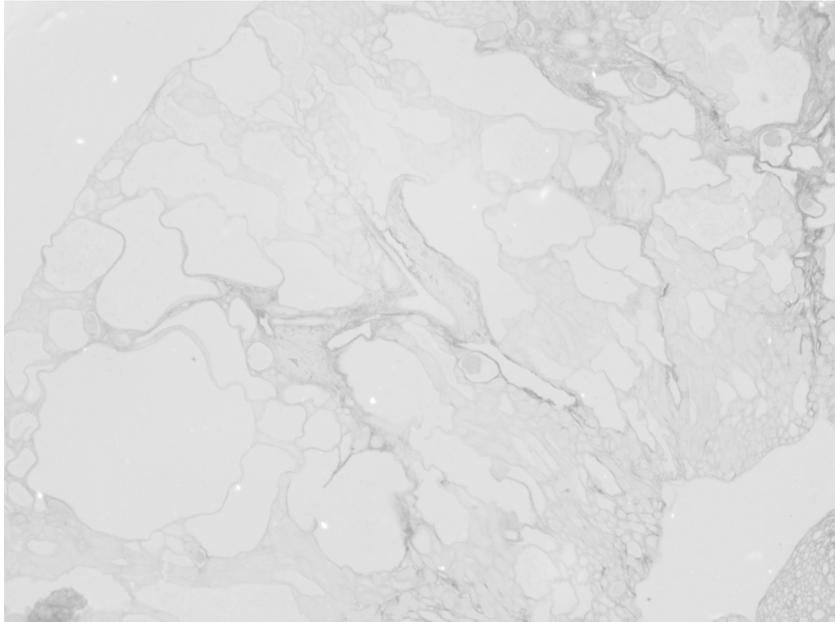


Abbildung 11: Bild mit Grünanteil.

Die Kollagenanteile wurden mit Hilfe der Funktionen Image, Adjust und Threshold markiert. Die Markierung wurde dem jeweiligen Teilbereich der Auswertung individuell angepasst (Abbildung 12).

Die Messbereiche wurden in den bearbeiteten Bildern individuell festgelegt (Abbildung 12). Die Vorgehensweise entsprach hierbei derjenigen bei der Auswertung der Hämatoxylin/Eosin Schnitte. Die Entsprechung der Messbereiche wurde mit dem Originalbild (Abbildung 11) verglichen, um Verfälschungen zu vermeiden bzw. die Markierung optimal einzustellen. Zur weiteren Auswertung des Schnittes wurde die Markierung entsprechend auf den nächsten Messbereich eingestellt. Die gewonnen Teilergebnisse der Einzelbereiche wurden anschließend zu einem Gesamtergebnis zusammengefaßt. Somit konnten Bereiche, die zu einer Verfälschung der Messergebnisse geführt hätten, ausgespart werden.

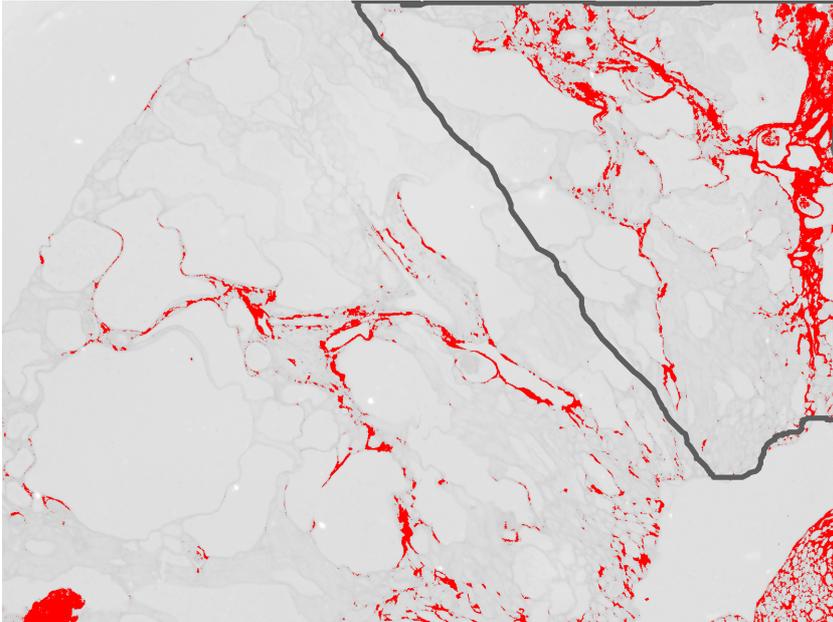


Abbildung 12: Individuell festgelegter Messbereich.

2.8.4 Weiterbearbeitung der Daten und graphische Darstellung

Die nötigen Aufstellungen in Tabellenform, die Berechnungen und die Grafiken wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel erstellt.

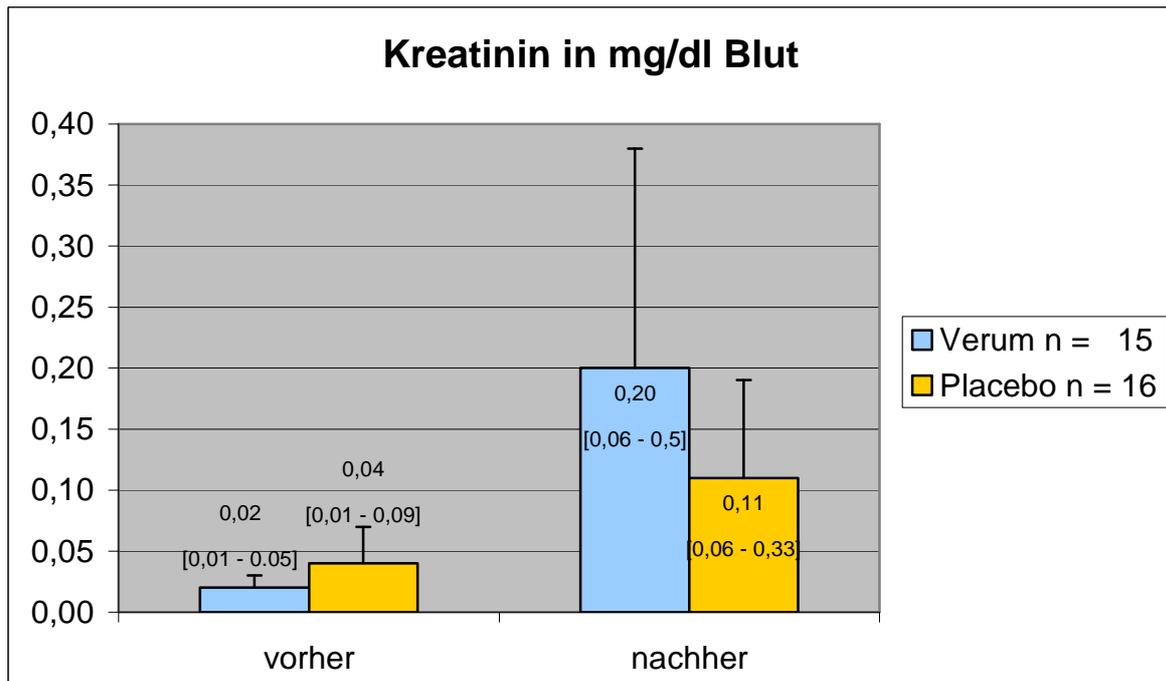
3. Ergebnisse

3.1 Chemische Laboranalysen

Die geschlechtsspezifische Verteilung, die Gruppenstärke sowie die genauen Messergebnisse der Einzeltiere können den Tabellen 1 – 17 im Anhang entnommen werden. Die nachfolgenden Grafiken wurden anhand der jeweiligen Mittelwerte der Testgruppen erstellt.

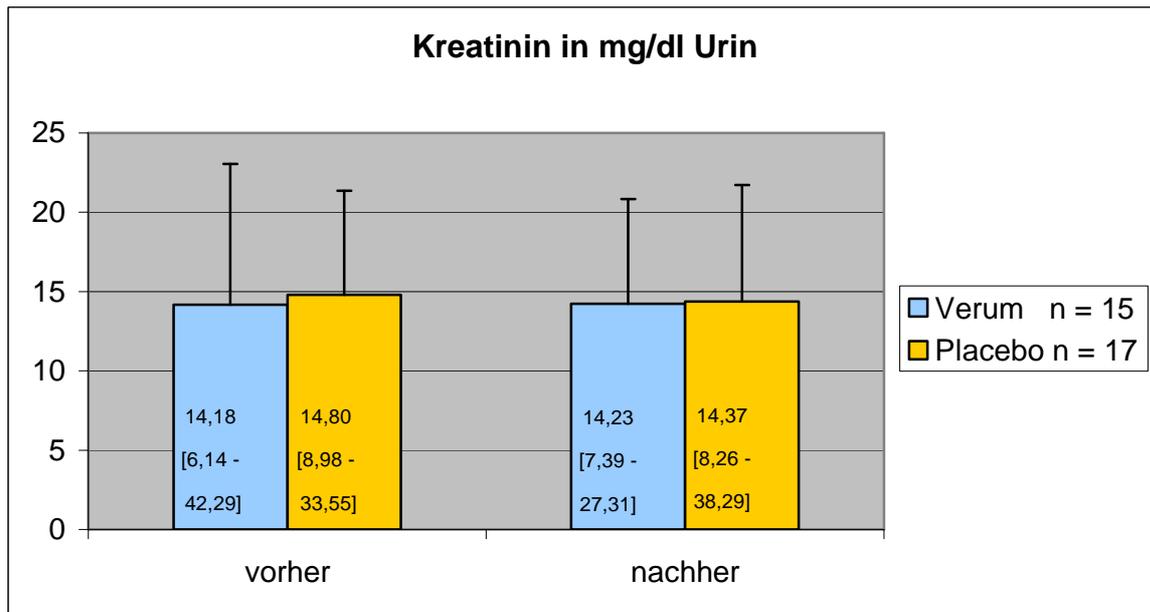
3.1.1 Kreatinin

Kreatinin wird aus Kreatin und Phosphokreatin gebildet. Es ist ein Produkt des endogenen Muskelstoffwechsels. Die Kreatininkonzentration ist im Vergleich zu Harnstoff nicht nahrungsabhängig und wird nicht vom endogenen Proteinstoffwechsel beeinflusst. Kreatinin ermöglicht dadurch, dass es im Wesentlichen nur glomerulär filtriert wird, eine Aussage über das Glomerulumsystem. Ein renal bedingter Kreatininanstieg im Blut kann durch akute und chronische Nephropathien, Glomerulonephritis, beidseitige Nierentumoren, Trauma oder Nierenamyloidose bedingt sein. Bei einem Anstieg liegen meist schwerwiegende Nierenerkrankungen vor, bei denen schon mehr als 50% des Nierenparenchyms beeinträchtigt werden. Die nachfolgende Darstellung (Grafik 1) stellt die Entwicklung des Blutkreatinins nach Beendigung des Experimentes dar. Sowohl in der Placebo- als auch in der Verumgruppe kam es während des Verlaufs der Studie zum Anstieg der Kreatininkonzentration im Blut. Innerhalb der Placebogruppe kam es zu einem Anstieg von 0,04 mg/dl Blut zu Beginn der Studie auf 0,11 mg/dl Blut am Ende der Studie. Dies entspricht einem Anstieg auf 275%. In der Verumgruppe zeigt sich ein Anstieg von 0,02 mg/dl Blut auf 0,20 mg/dl Blut am Ende der Studie. Dies entspricht einer prozentualen Zunahme auf 1.050%.



Grafik 1: Kreatinin in mg/dl Blut. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

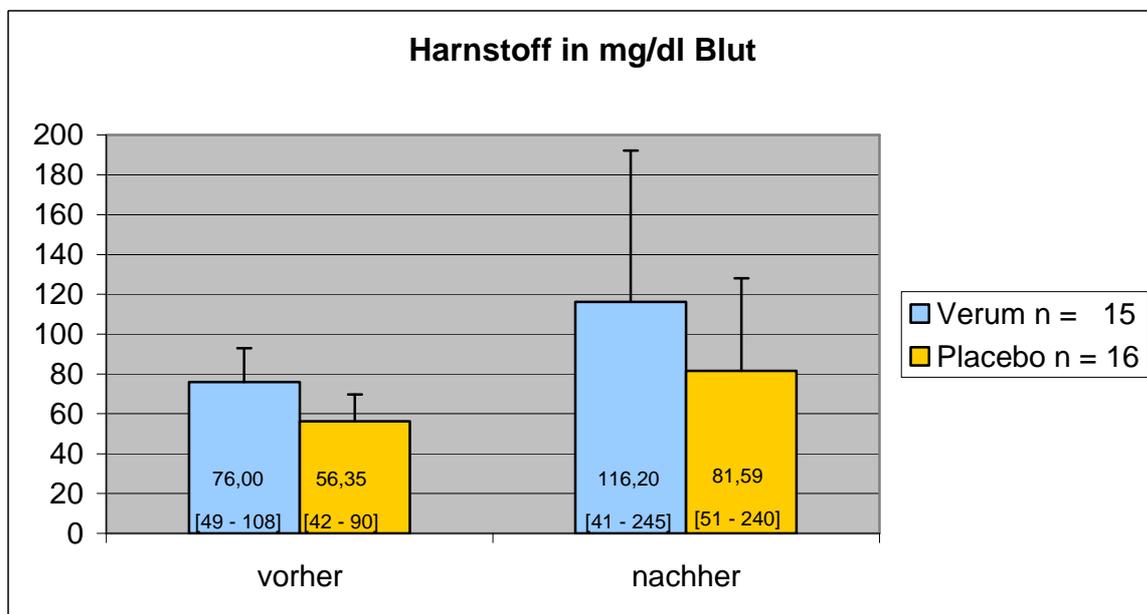
Die Kreatininkonzentration im Urin ist eine unvermeidliche Größe zur Berechnung der Kreatininclearance. In den beiden Testgruppen zeigten sich kaum Veränderungen der Kreatininkonzentrationen im Urin. In der Placebogruppe sank der Wert um 0,43 mg/dl. Der Mittelwert zu Studienbeginn betrug 14,80 mg/dl, der Mittelwert zu Studienende 14,37 mg/dl. Dies entspricht einer Differenz von 2,9%. In der Verumgruppe kam es, ausgehend von einem Mittelwert von 14,18 mg/dl, zu einem Anstieg auf einen Mittelwert von 14,23 mg/dl zu Studienende. Es liegt also ein Anstieg von 0,05 mg/dl vor, was einem prozentualen Anstieg von 0,35% entspricht (Grafik 2).



Grafik 2: Kreatinin im Urin. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

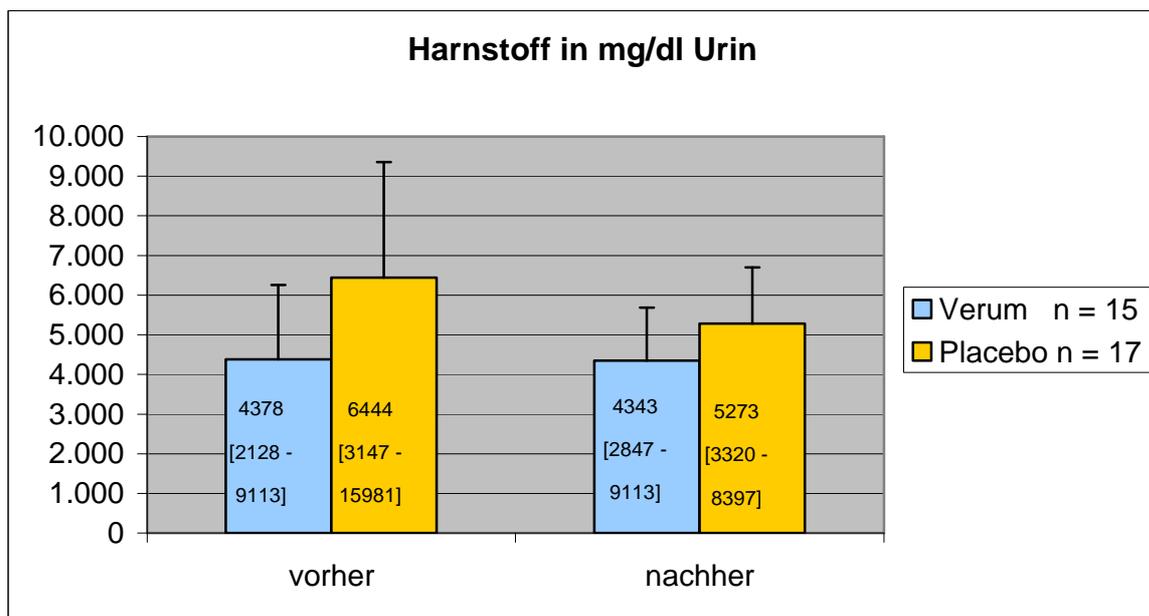
3.1.2 Harnstoff

Harnstoff wird im Harnstoffzyklus in der Leber aus Ammoniak synthetisiert. 90% des im Körper anfallenden Harnstoffes werden über die Nieren ausgeschieden. Ist der Harnstoffgehalt im Blut jedoch in Folge einer Niereninsuffizienz erhöht, wird er auch über die Schleimhäute des Magen-Darm-Trakts ausgeschieden und von Urease bildenden Bakterien wieder zu Ammoniak gespalten. Veränderungen des Blutharnstoffes können schon bei weniger schwerwiegenden und kurzfristigeren Nierenbeeinträchtigungen oder ernährungsbedingt auftreten. Im wesentlichen sind die renalen Ursachen einer Harnstoffhöhung ähnlich denen, die zu einer Erhöhung des Blutkreatininspiegels führen. Harnstoffhöhungen treten zusätzlich auch bei toxischer Substanzwirkung wie z.B. bei nierentoxischen Medikamenten auf. Im Studienverlauf kam es in beiden Gruppen zum Anstieg der Harnstoffkonzentration im Blut. Bei der Placebogruppe liegt ein Anstieg von 56,35 mg/dl zu Studienbeginn auf 81,59 mg/dl am Studienende vor. Dies entspricht einem Anstieg auf 144,8%. In der Verumgruppe liegt ein Anstieg von 76 mg/dl zu Beginn auf 116,2 mg/dl am Ende der Studie vor (Grafik 3). Dies entspricht einer prozentualen Zunahme auf 152,9%.



Grafik 3: Harnstoff in mg/dl Blut. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

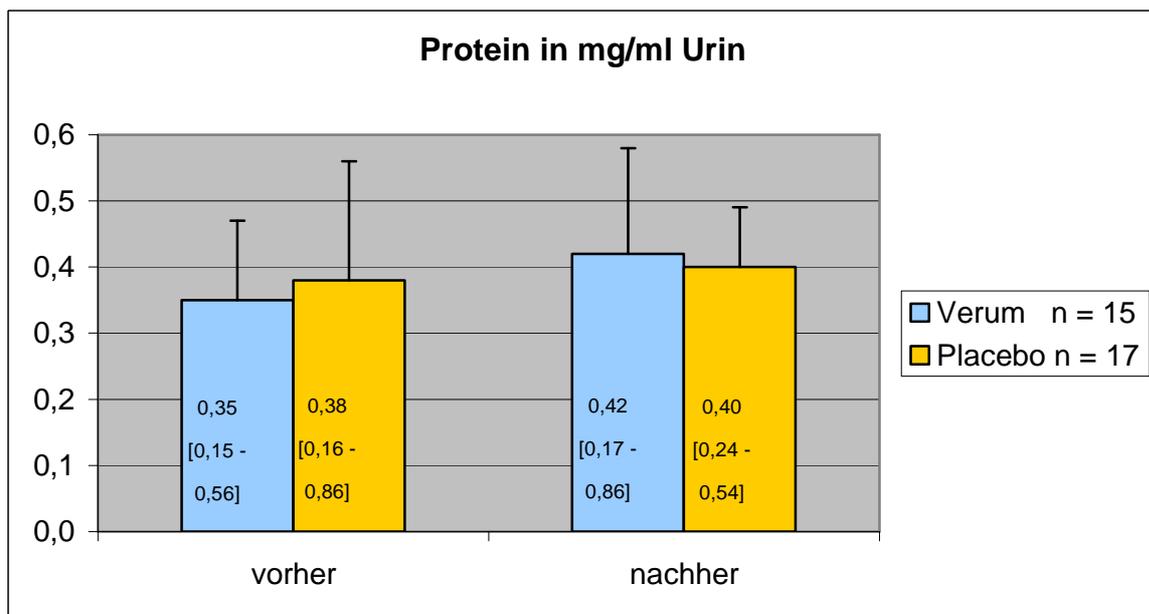
Die Konzentration des Harnstoffs im Urin nahm sowohl in der Placebo- als auch in der Verumgruppe ab. Während des Studienverlaufs kam es in der Placebogruppe zu einer Differenz von 1.171 mg/dl. Zu Studienbeginn betrug der Anteil von Harnstoff im Urin 6.444 mg/dl, nach Studienende 5.273 mg/dl. Dies entspricht einem prozentualen Abfall auf 81,8%. In der Verumgruppe liegt ein Abfall von 4.378 mg/dl im Urin zu Beginn auf 4.344 mg/dl am Ende der Studie vor. Dies entspricht einer prozentualen Abnahme auf 99,2% (Grafik 4).



Grafik 4: Harnstoff in mg/dl Urin. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

3.1.3 Protein im Urin

Im Sekundärharn finden sich physiologischerweise nur sehr geringe Proteinmengen, da fast das gesamte in den Glomerula filtrierte Protein im Tubulussystem rückresorbiert wird. Dauernde Proteinerhöhungen sind als pathologisch anzusehen. Renal bedingte Erhöhungen des Urinproteins können die Folge von Tubulo- und Glomerulopathien, einer generalisierten Nephropathie, Nephritis, Pyelonephritis oder Nierentumoren sein. Der Proteinanteil im Urin stieg sowohl in der Placebo- als auch in der Verumgruppe. In der Placebogruppe ist ein Anstieg von 0,38 mg/ml auf 0,4 mg/ml, in der Verumgruppe ein Anstieg von 0,35 mg/ml auf 0,42 mg/ml zu verzeichnen (Grafik 5). In der Placebogruppe liegt somit ein Anstieg auf 105,3%, in der Verumgruppe ein Anstieg auf 120% vor.

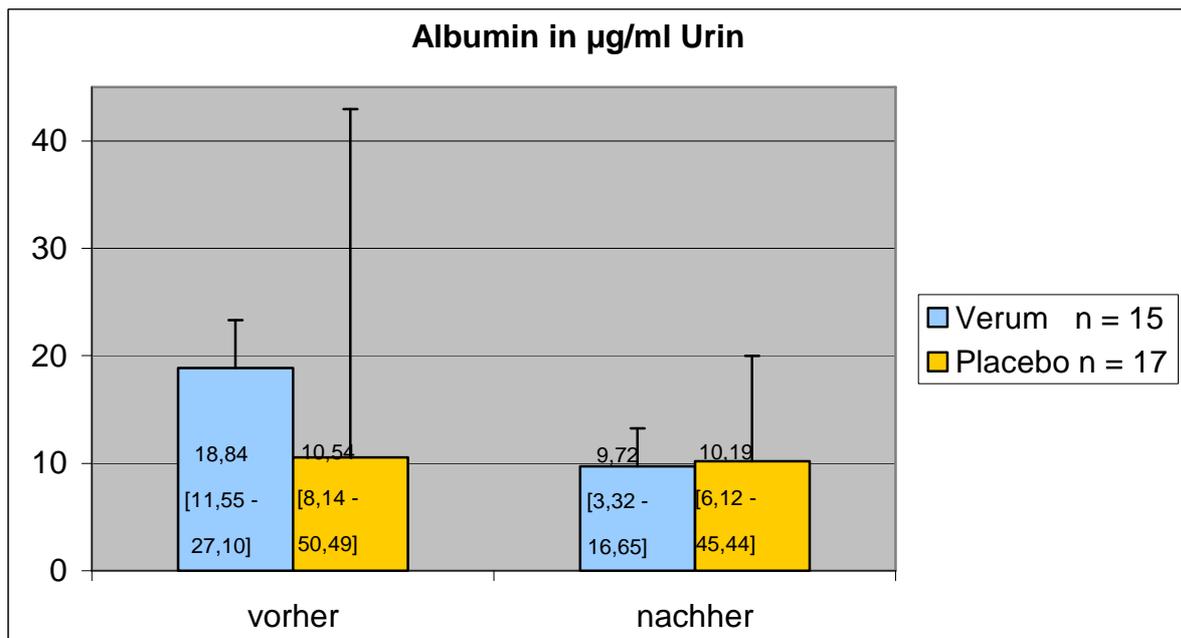


Grafik 5: Protein in mg/ml Urin. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

3.1.4 Albumin im Urin

Albumin gehört zur Gruppe der globulären Proteine. Es macht den größten Teil der im Blut vorkommenden Eiweiße aus und es sorgt im Organismus für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks. Darüber hinaus stellt es ein wichtiges Transporteiweiß für verschiedenste Stoffe dar. So werden unter anderem viele Medikamente, aber auch freie Fettsäuren, Bilirubin und Hormone an Albumin gebunden und mit dem Blut durch den Körper transportiert. Albumin wird in der Leber synthetisiert. Veränderungen der Albuminkonzentration können durch Leberdysfunktionen, Darmerkrankungen oder Niereninsuffizienz ausgelöst werden. Albumin nimmt in der Nierenphysiologie eine Sonderstellung ein, da die Grenze zwischen glomerulärer und tubulärer Proteinurie durch das 65.000 Dalton schwere Albumin gesetzt wird. Dies bedeutet, dass es sowohl der glomerulären Filtration als auch der tubulären Rückresorption unterliegt (Guelfi und Florio, 1974; Boesken und Mamier, 1985).

In beiden Testgruppen kam es zur Abnahme der Albuminkonzentration im Urin. In der Placebogruppe kam es zu einem Abfall von 18,54 µg/ml Urin auf 10,19 µg/ml Urin. Dies entspricht einer prozentualen Verringerung auf 55%. In der Verumgruppe handelt es sich um eine Abnahme von 18,84 µg/ml auf 9,72 µg/ml Urin. Dies entspricht einer prozentualen Verringerung auf 51,6% (Grafik 6).

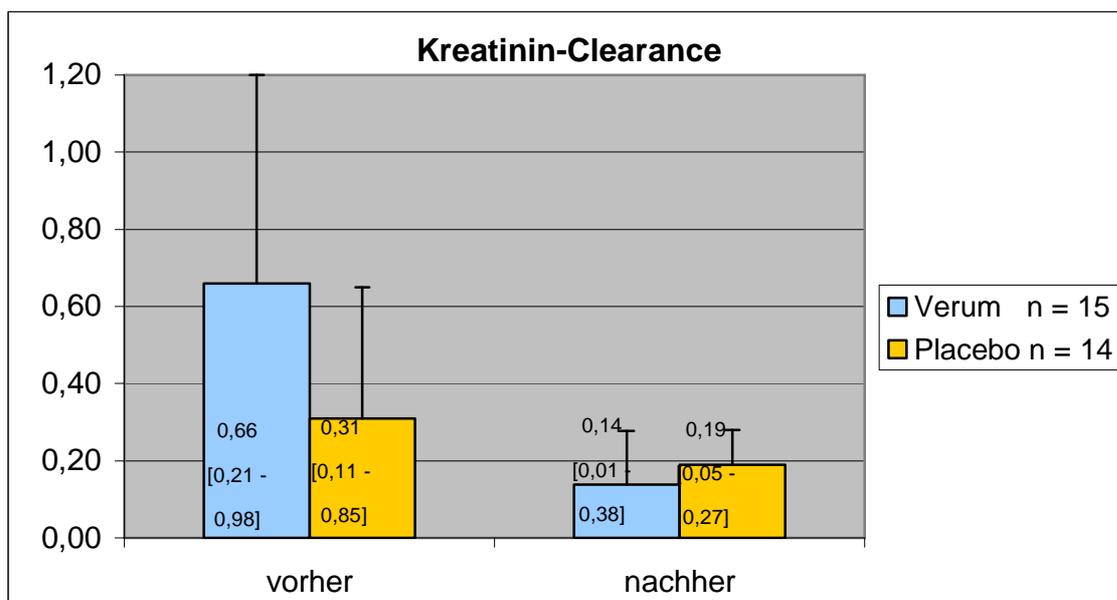


Grafik 6: Albumin in µg/ml Urin. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

3.2 Kreatinin-Clearance

Die Kreatinin-Clearance bezeichnet das Plasmavolumen, das pro Zeiteinheit von Kreatinin vollständig gereinigt wird (Chew und Dibartola, 1986; Hierholzer und Fromm, 1987; Schwendenwein, 1989). Kreatinin ist hierzu besonders geeignet, da es komplett glomerulär filtriert und tubulär weder sezerniert noch rückresorbiert wird. Die Clearance ermöglicht so eine zuverlässige Aussage über die glomeruläre Filtrationsrate und somit über die Funktionsfähigkeit der Glomerula. Die Kreatinin-Clearance gilt als gängiges Clearanceverfahren (Chew und Dibartola, 1986; Russo et al., 1986; Larue und Feldman, 1988; Labato und Ross, 1991; Rogers et al., 1991). Zur Berechnung der Clearance wurden Harnvolumen, Harn- und Plasmakonzentration von Kreatinin gemessen. Als vorteilhaft erweist sich hierbei, dass die Kreatinin-Clearance bereits in frühen Stadien die Diagnose einer Glomerulopathie zulässt, lange bevor Serum-Harnstoff oder Serum-Kreatinin ansteigen.

Im Verlauf der Studie kam es zur Veränderung der Clearance. In der Placebogruppe nahm die ursprünglich bei einem Wert von 0,31 ml/min liegende Clearance auf einen Wert von 0,19 ml/min ab (Grafik 7). Dies entspricht einer prozentualen Abnahme auf 61%. Innerhalb der Verumgruppe konnte eine Abnahme des Ausgangswertes von 0,66 ml/min auf 0,14 ml/min festgestellt werden. Es liegt somit eine prozentuale Abnahme auf 21,2% vor.

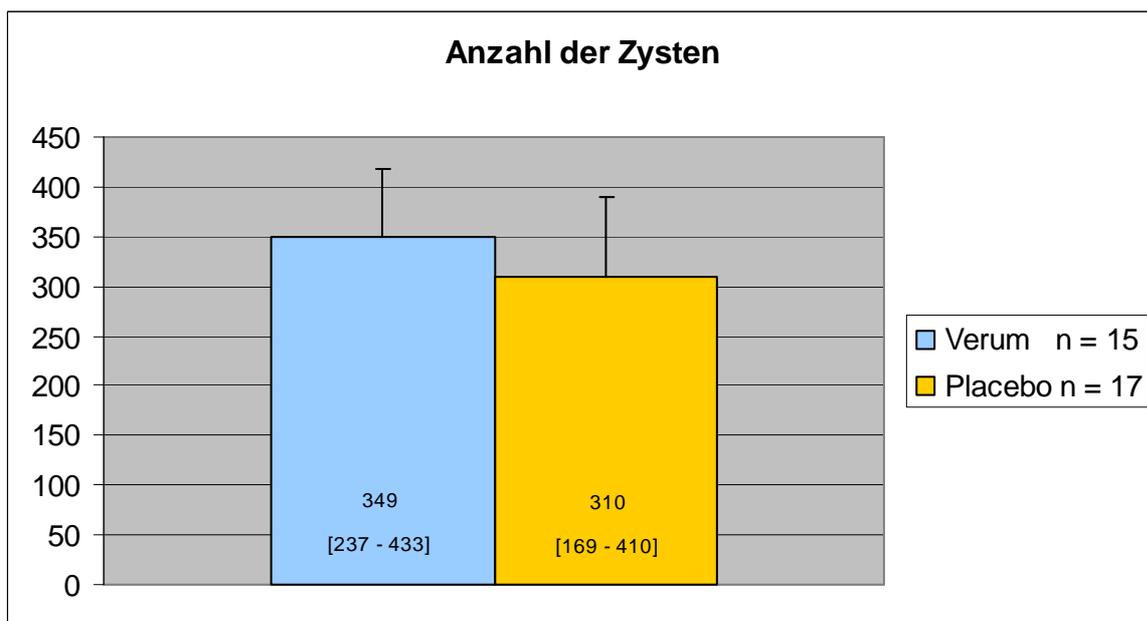


Grafik 7: Keatinin-Clearance in ml/min. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

3.3. Morphometrie der Hämatoxylin/Eosin gefärbten histologischen Schnitte

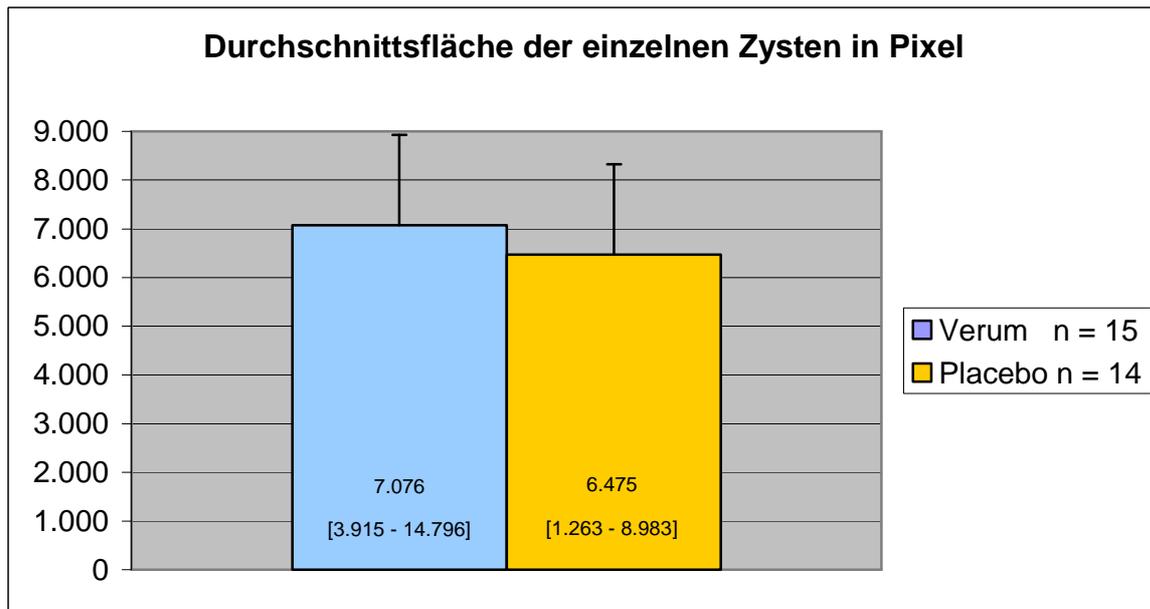
Nierenzysten sind keine physiologische Erscheinung im Nierenparenchym. Vielmehr geben sie einen Hinweis auf pathologisches Geschehen. Da Nierenzysten gehäuft bei der polyzystischen Nierenerkrankung auftreten, sind die Anzahl der Zysten, der prozentuale Anteil der Nierenzysten an der Nierenfläche und die Größe der Einzelzyste von besonderem Interesse.

Bei der Auswertung wurde eine größere Anzahl von Zysten festgestellt. In der Placebogruppe lagen 310 Zysten/Niere und in der Verumgruppe 349 Zysten/Niere vor. Im Vergleich der beiden Gruppen liegt in der Verumgruppe die 1,13-fache Menge an Zysten vor (Grafik 8).



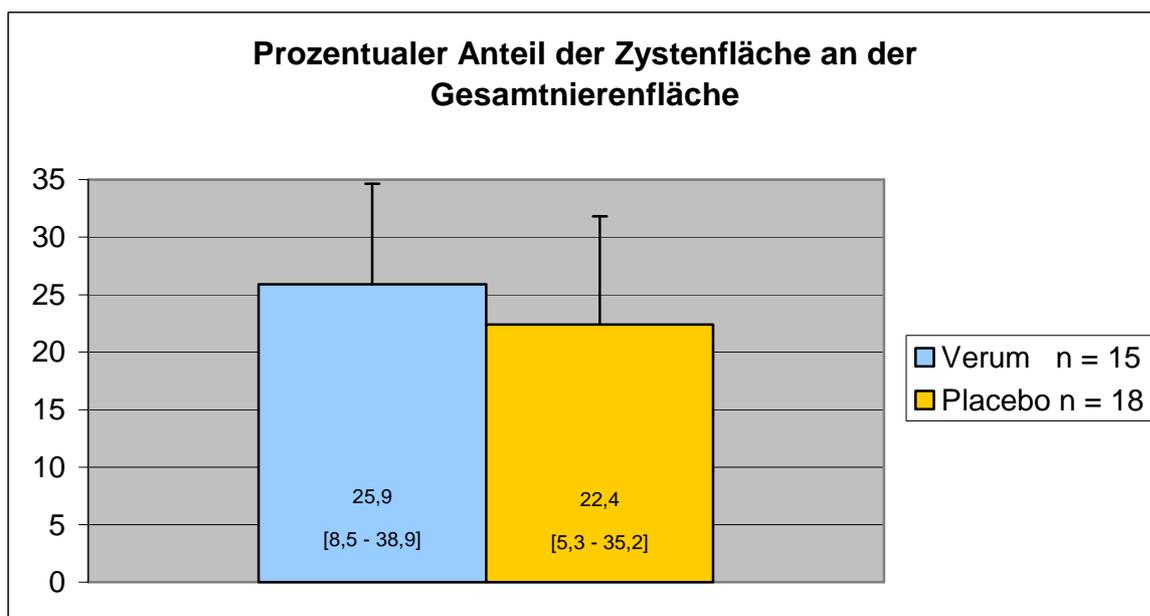
Grafik 8: Anzahl der Zysten pro Tier im Durchschnitt. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

Auch die Zystengröße kann durch die polyzystische Nierenerkrankung verändert werden. Die Durchschnittsfläche der Einzelzyste liegt bei der Verumgruppe mit 7.076 Pixel höher als in der Placebogruppe mit 6.475 Pixel pro Zyste. Das entspricht einem prozentualen Anstieg auf 118,8% in der Verumgruppe (Grafik 9).



Grafik 9: Durchschnittsfläche der einzelnen Zyste in Pixel. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

Da im Verlauf der polyzystischen Nierenerkrankung das Nierenparenchym mehr und mehr zystisch umgebaut wird, wurde der prozentuale Anteil der Zystenfläche an der Gesamtnierenfläche bestimmt. Der Anteil der Zystenfläche an der Nierefläche betrug in der Verumgruppe 25,9% und in der Placebogruppe 22,4% (Grafik 10).

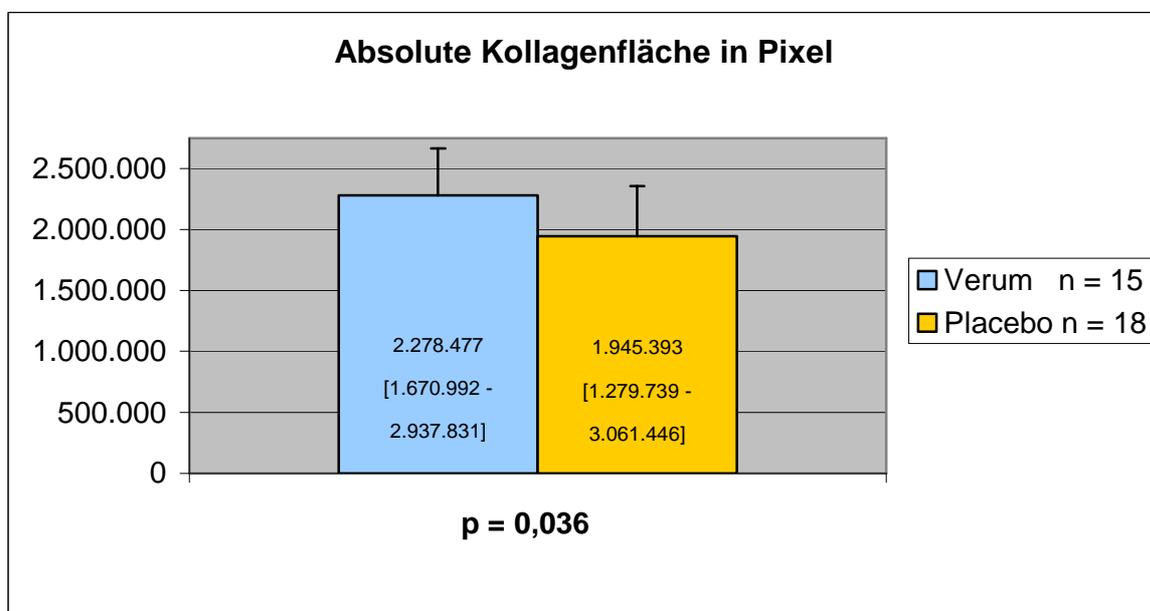


Grafik 10: Prozentualer Anteil der Zystenfläche an der Gesamtnierenfläche. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

3.4 Morphometrie der mit Sirius-Rot gefärbten histologischen Schnitte

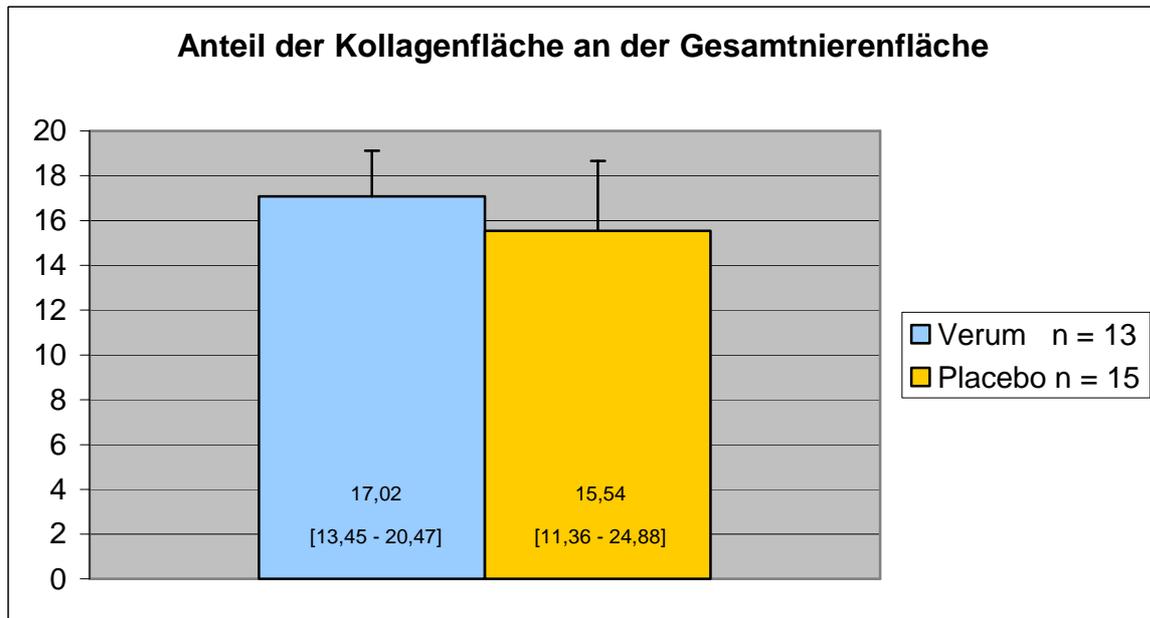
Derzeit sind 28 verschiedene Kollagentypen bekannt. Im menschlichen Körper ist Kollagen mit über 30 % Anteil am Gesamtgewicht aller Proteine das am meisten verbreitete Eiweiß. Unterschieden werden unter anderem fibrilläre Kollagene (Kollagene des Typs I, II, III, V und XI), netzbildende Kollagene (Kollagene des Typs IV in der Lamina densa der Basalmembran, VIII und X), fibrillenassoziierte Kollagene (Kollagene des Typs IX, XII, XIV, XXII), perlenschnurartige Kollagene (Kollagen Typ VI) und Verankerungsfibrillen (Kollagen Typ VII). Da einige MMPs die besondere Eigenschaft besitzen, Kollagen zu spalten, wurde die Entwicklung der Kollagenkonzentration in den Mäusenieren gesondert erfasst.

Bei der Untersuchung der Kollagenfläche konnte in der Placebogruppe eine Fläche von 1.945.393 Pixel ermittelt werden. In der Verumgruppe wurde eine Pixelfläche von 2.278.477 gemessen. Es besteht somit eine Differenz von 333.084 Pixel, dies entspricht 17,1% (Grafik 11). Das Ergebnis ist mit $p = 0,036$ als statistisch signifikant zu betrachten.



Grafik 11: Absolute Kollagenfläche. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

Der Anteil der Kollagenfläche an der Gesamtnierenfläche beträgt in der Verumgruppe 17,02%, in der Placebogruppe 15,54%. Dies entspricht einem Anstieg in der Verumgruppe auf 109,5% (Grafik 12).

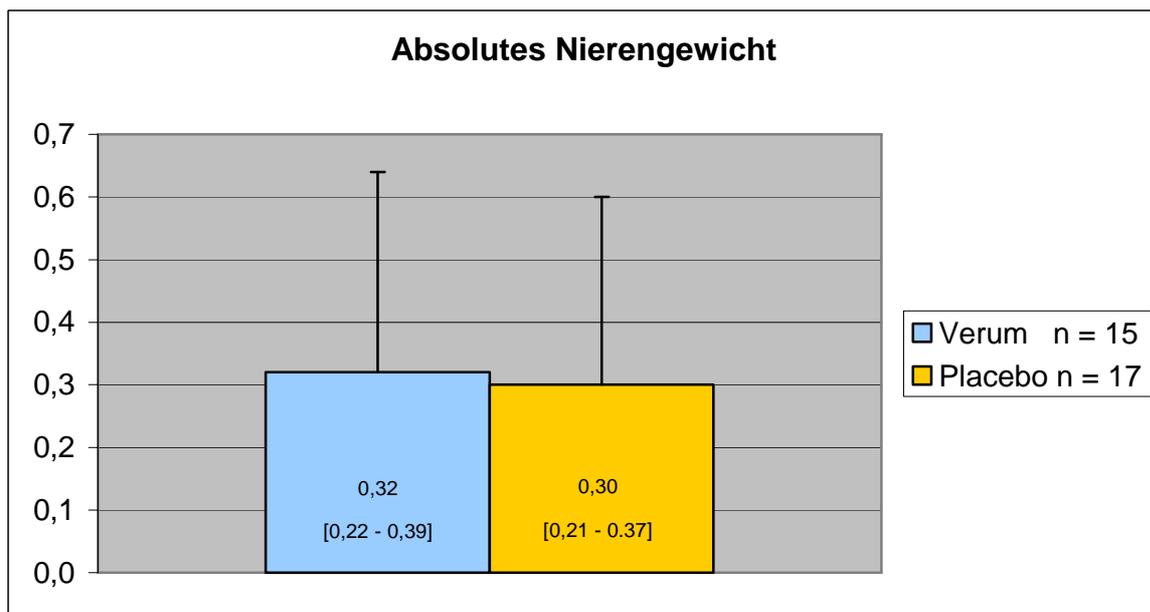


Grafik 12: Prozentualer Anteil der Kollagenfläche an der Gesamtnierenfläche. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

3.5 Physikalische Daten

Das Gesamtgewicht der Tiere sowie das Gewicht einzelner Organe geben Auskunft über die körperliche Entwicklung und die Entwicklung bestimmter Organsysteme. Da die Nieren bei der polyzystischen Nierenerkrankung ein Vielfaches des physiologischen Gewichtes erreichen können, wurde das Gewicht der Nieren der Einzeltiere erfasst.

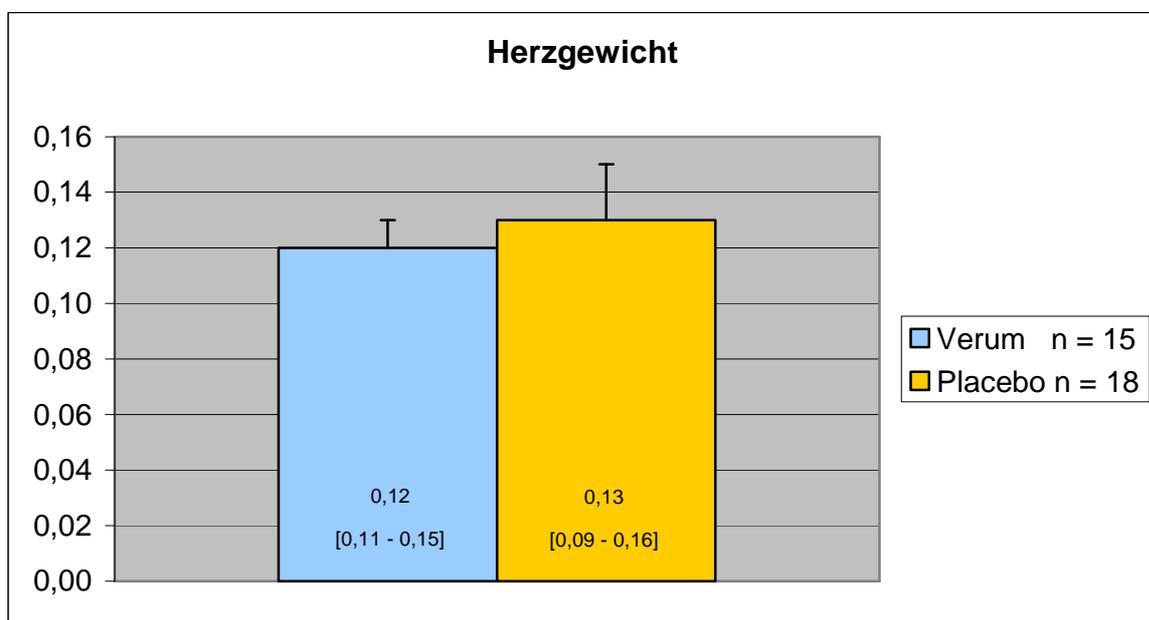
In der Verumgruppe der Gesamtgruppe wurde ein absolutes Nierengewicht von durchschnittlich 0,32 g, in der Placebogruppe ein absolutes Nierengewicht von durchschnittlich 0,30 g erreicht. Das absolute Nierengewicht in der Verumgruppe übersteigt somit dasjenige in der Placebogruppe um das 0,07-fache (Grafik 13).



Grafik 13: Absolutes Nierengewicht in Gramm. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

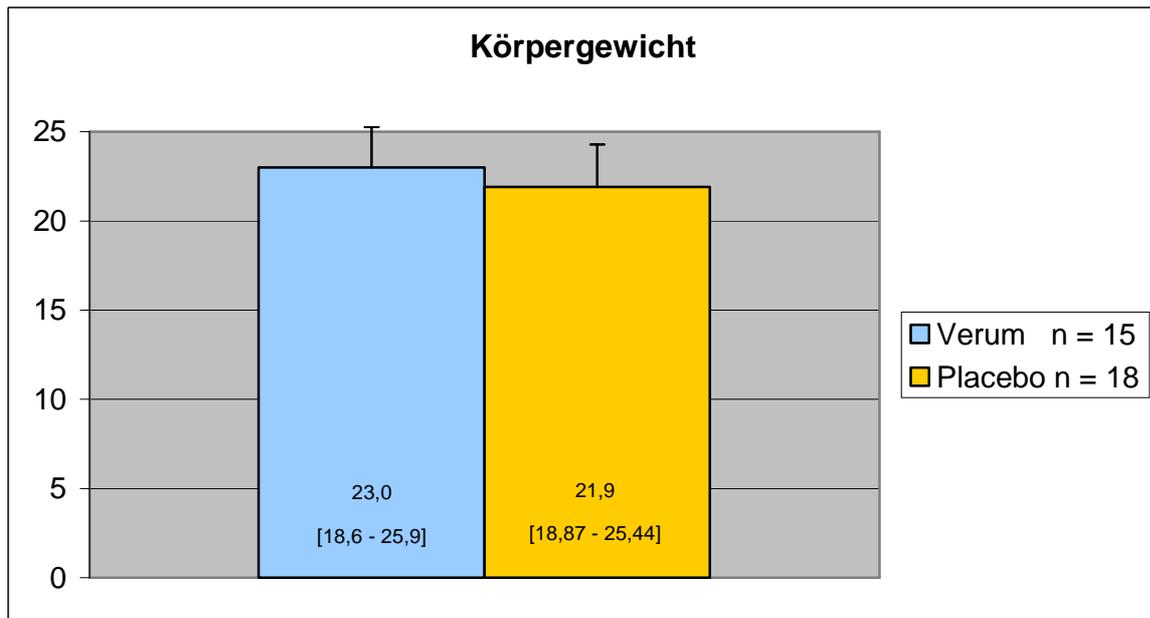
Bei der polyzystischen Nierenerkrankung sind auch viele andere Organsysteme wie z.B. Leber, Herz oder Gehirn durch eine Störung des Bindegewebsstoffwechsels betroffen. So kommt bei etwa 25% der ADPKD-Patienten ein Mitralklappenprolaps vor (im Gegensatz zu 2-3% bei der Normalbevölkerung). Hierbei kann sich eine linksventrikuläre Hypertrophie mit Veränderung von Herzgewicht und Größe entwickeln.

Das Herzgewicht lag in der Verumgruppe bei 0,12 g und in der Placebogruppe bei 0,13 g (Grafik 14). Dies bedeutet eine Differenz von 7,8%.



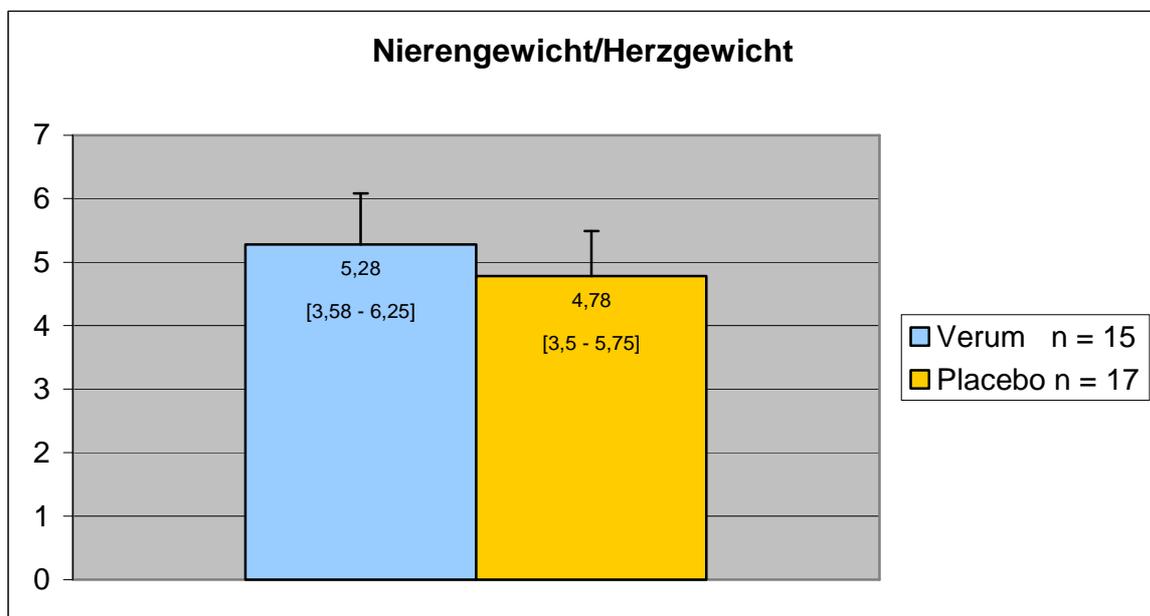
Grafik 14: Herzgewicht in Gramm. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

Typisch für chronische Erkrankungen ist das Wasting (Körperverfall), welches die kontinuierliche Abnahme des Körpergewichtes bzw. den Verlust von Körpersubstanz beschreibt. Ein weiterer Grund für eine Gewichtsabnahme kann die besondere katabole Stoffwechselsituation durch eine metabolische Azidose in der Urämie sein. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse wurde das Körpergewicht der CD1^{pcy/pcy}-Mäuse ermittelt. Das Gewicht der Verumtiere betrug 23 g und überstieg das der Placebogruppe mit 21,9 g um das 0,05-fache (Grafik 15).



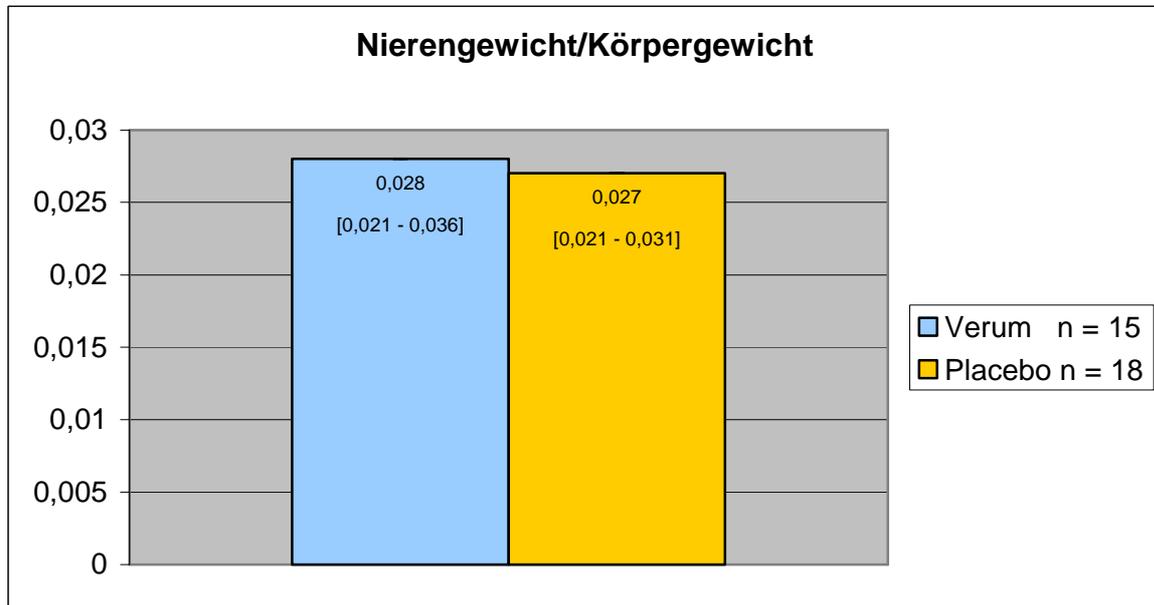
Grafik 15: Körpergewicht in Gramm. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

Der Quotient Nierengewicht/Herzgewicht betrug in der Verumgruppe 5,28 und in der Placebogruppe 4,78. Der Wert in der Verumgruppe übersteigt also denjenigen in der Placebogruppe um das 0,1-fache (Grafik 16).



Grafik 16: Nierengewicht/Herzgewicht. Die Standardabweichung ist als Balken, der Wertebereich ist in eckigen Klammern und die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

Der Quotient Nierengewicht/Körpergewicht in der Verumgesamtgruppe übersteigt mit 0,028 den der Placebog Gesamtgruppe mit 0,027 um das 0,04fache (Grafik 17).



Grafik 17: Quotient Nierengewicht/Körpergewicht. Der Wertebereich ist in eckigen Klammern, die Mittelwerte sind als Zahlenwerte über den Säulen dargestellt.

4. Diskussion

Die Ausbreitung von Zysten bei der polyzystischen Nierenerkrankung zeigt Parallelen zum Wachstum gutartiger Tumoren. Es wird daher vermutet, dass die die Zysten auskleidenden Epithelzellen extrazelluläre Matrix abbauende Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) bilden. Die Inhibierung dieser Enzyme könnte somit einen möglichen Ansatz zur Therapie dieser Krankheit darstellen.

Die Matrix-Metalloproteinasen spielen eine wichtige Rolle bei Um- und Abbauvorgängen der extrazellulären Matrix, wie der Wundheilung, Angiogenese, Morphogenese und Wachstum. Zur Wahrung eines physiologischen Gleichgewichts auf dem schmalen Grat zwischen Überexpression oder Unterproduktion sind engmaschige Kontrollmechanismen nötig. Diese erfolgen auf der Stufe der Transkription durch Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine. Eine Vielzahl der Matrix-Metalloproteinasen liegen auf dem langen Arm von Chromosom 11 in der 11q22.3 Region als Cluster in einer 135 kb großen Region (Abbildung 13) (Pendas et al., 1996).

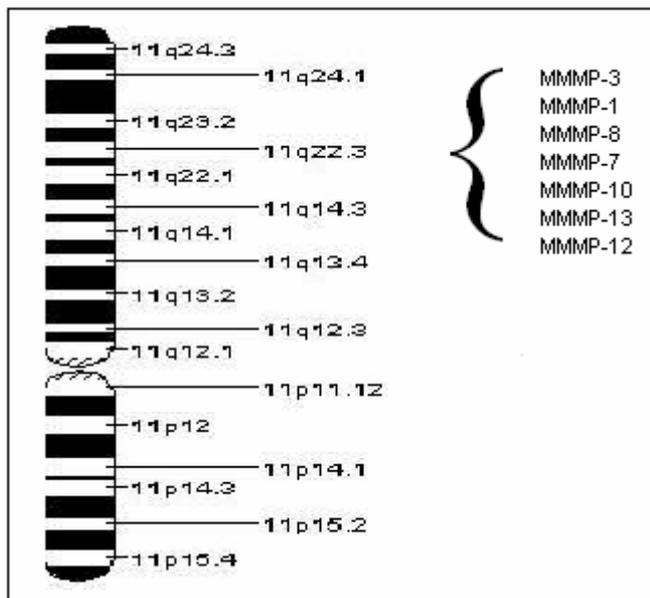


Abbildung 13: Kartierung des Chromosom 11 (modifiziert nach dem Gen Map Locus <http://ghr.nlm.nih.gov/chromosome=11>).

Die proteolytische Aktivität der MMPs im Gewebe wird durch physiologische Inhibitoren, die TIMPs 1-4, reguliert (Nagase et al., 1999). Wird dieses Gleichgewicht gestört, führt dies zu unterschiedlichen pathologischen Zuständen. So kann eine Überexpression von MMPs wie z.B. bei Arthritiden, Tumordinvasion und Metastasierung (Murphy et al., 1992; Nagase et al., 1999) zu einem beschleunigten Abbau von extrazellulärer Matrix führen. Eine Reihe von Studien belegen, dass synthetische Matrix-Metalloproteinase Inhibitoren eine bedeutende Rolle in der Behandlung von Krebs spielen können (Zucker et al., 2000). 1994 wurde Batimastat als erster MMP Inhibitor klinisch getestet. Seine Einsatzmöglichkeit war jedoch durch die geringe Löslichkeit stark eingeschränkt (Hidalgo und Eckhardt, 2001; Macaulay et al., 1999). Die Applikation musste intraperitoneal oder intrapleural erfolgen. In den vergangenen Jahren wurde an weiteren spezifischen Inhibitoren der MMPs geforscht (Levin et al. 2004; Rutkauskaite et al., 2004; Klimiuk et al., 2004). Zu diesen zählt unter anderem Ro 28-2653, welcher oral verabreicht werden kann. Es wurde vermutet, dass Ro 28-2653 eine ähnlich inhibierende Wirkung auf das Wachstum von Nierenzysten bei $CD1^{pcy/pcy}$ -Mäusen hat wie auf das Wachstum von Tumoren beim Prostatakrebs von Ratten (Lein et al., 2002) oder auf das Wachstum von Leberzysten beim Syrischen Hamster (Gregor et al., 2008). Tiere des Mäusestammes $CD1^{pcy/pcy}$ entwickeln eine langsam voranschreitende polyzystische Nierenkrankheit, welche bezüglich ihrer Entwicklung und Pathologie der autosomal rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung beim Mensch ähnelt. Hier soll nun die Wirksamkeit des synthetischen Matrix-Metalloproteinase Inhibitors Ro 28-2653, der unter anderem eine hohe Selektivität für MMP2, MMP9 und Membran Typ1 Matrix-Metalloproteinase besitzt (Lein et al., 2002), auf die polyzystische Nierenkrankheit von $CD1^{pcy/pcy}$ -Mäusen anhand der vorliegenden Methoden und Ergebnisse diskutiert werden.

4.1. Diskussion der Methoden

Bei den chemischen Analysen zu Studienbeginn waren in den einzelnen Vergleichsgruppen deutliche Unterschiede der Ausgangswerte zu erkennen. Die Werte von Kreatinin und Harnstoff im Blut unterschieden sich in den Placebo- und Verumgruppen jeweils um rund 50% bzw. 26% (Grafik 1, Grafik 3). Bei den Ergebnissen der aus dem Urin gewonnenen Parameter waren bei den Ausgangswerten der jeweiligen Vergleichsgruppe in der Placebo- und Verumgruppe Differenzen von 10% bei Kreatinin, 47% bei Harnstoff, 9% bei Protein, 44% bei Albumin und 53% bei der errechneten Kreatinin-Clearance festzustellen (Grafik 2, 4, 5, 6 und 7). Trotz der oftmals sehr großen Differenz der Ergebnisse bei den einzelnen Testgruppen zwischen Studienbeginn und Studienende konnten nach Abschluss des Experimentes nur geringe Unterschiede innerhalb der Verum- und Placebogruppen festgestellt werden. Die ersten Blut- und Urinentnahmen erfolgten im Alter von 36 bis 42 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt hat sich die Krankheit nur begrenzt manifestiert, da die Tiere erst im Alter von 56 Tagen Zysten entwickeln, die im weiteren Krankheitsverlauf die Nieren mehr und mehr dominieren und zur typischen Pathologie einer polyzystischen Nierenerkrankung führen. Sollte sich die Krankheit dennoch bei einigen Tieren schon zum Entnahmezeitraum entwickelt haben, so könnte dies die Erklärung für die sehr heterogenen Messergebnisse bei den juvenilen Tieren sein.

Weiterhin sollte beachtet werden, dass die teilweise sehr geringen Urinmengen leicht durch Umwelteinflüsse oder durch die Tiere verändert worden sein können. Da die Tiere in den Käfigen freien Zugang zu Leitungswasser und Nagerfutter hatten, könnten Qualität und Quantität des Urins z.B. durch Verdunstung, Verwässerung oder Kontamination mit Kotpartikeln verändert worden sein. Werte, die offensichtlich durch die Aktivität der Tiere verändert wurden (Urinmengen, die das Durchschnittsvolumen um ein mehrfaches überschritten), wurden nicht zur Auswertung herangezogen. Andere, geringgradige und deswegen nicht offensichtliche Veränderungen können jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden. Es sollte daher eine Überprüfung der Ergebnisse mit anderen Tiermodellen, die schon in juvenilen Stadien größere Urinmengen aufweisen, erfolgen.

Die Größe der Testgruppen lag zwischen 13 und 18 Tieren. Hierbei ist eine Tendenz der Entwicklung in den behandelten und nicht behandelten Gruppen abzulesen, aber der p-Wert liegt meist bei $> 0,05$. Es ist davon auszugehen, dass bei größeren Testgruppen auch niedrigere p-Werte erreicht worden wären.

Die Tiere zeigten trotz des gleichen Alters zum Ende der Studie sehr große Differenzen in Körpergröße und Gewicht. Das Körpergewicht variierte in beiden Gruppen zwischen 18 g und 25,9 g. Die weiblichen Tiere wiesen hierbei physiologischerweise ein geringeres Körpergewicht als die männlichen Tiere auf. Da aber sowohl das Medikament als auch das Vehikel proportional zum Körpergewicht verabreicht wurden, dürfte dies nicht zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt haben. Eine durch Wasting bedingte katabole Stoffwechsellage und somit eine dadurch bedingte veränderte Metabolisierung des verabreichten Medikamentes kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Weitere blutspiegelkontrollierte Studien könnten diese offenen Fragen beantworten. Es ist jedoch zu bedenken, dass sich andere Tiermodelle wie z.B. Ratten besser für häufige Blutentnahmen eignen. Vor allem die Jungtiere der $CD1^{pcy/pcy}$ -Mäuse könnten nach einer retrobulbären Blutentnahme Probleme wie Infektionen oder intrakranielle Blutungen entwickelt haben.

Einen weiteren Diskussionspunkt dieser Arbeit stellt die morphometrische Auswertung dar. Um Strukturen, die nicht zur Auswertung gelangen sollten (Blutgefäße, Verunreinigungen, Artefakte) auszusparen und eine möglichst gleichmäßige Kennzeichnung der Zysten und Kollagenflächen durch einen Hell/Dunkelabgleich zu erreichen, wurden die Messbereiche manuell festgelegt. Dadurch könnten sich evtl. geringgradige Überschneidungen ergeben haben. Da die Bilder verblindet ausgewertet wurden, kann aber ein Beobachter-abhängiger Fehler ausgeschlossen werden (Rosenthal-Effekt).

Die Konzentrationen von MMP2, MMP9 und Membran Typ1 Matrix-Metalloproteinasen, für die Ro 28-2653 eine hohe Selektivität besitzt (Lein et al., 2002), wurden in dieser Studie nicht gemessen. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Konzentration von Matrix-Metalloproteinasen und der Medikamentenwirkung konnte somit in dieser Studie nicht nachgewiesen werden.

Weitere Studien, die Analysen und Messungen der oben genannten Enzyme mit Hilfe von PCR und Gelelektrophorese einschließen, sollten zum Beweis des direkten Zusammenhanges der Konzentrationen der Proteine mit den morphologischen und physiologischen Veränderungen durchgeführt werden.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Kreatinin wird kontinuierlich von der Muskulatur in das Blut abgegeben. Es ist ein stark basisches Amid (Lactam) aus der Säure Kreatin (Abbildung 14). Kreatinin wird in physiologischer Konzentration weder sezerniert noch tubulär rückresorbiert, d.h. praktisch jedes filtrierte Molekül erscheint letztlich im Harn. Dies ermöglicht Rückschlüsse auf die glomeruläre Filtrationsrate. Das Sinken der glomerulären Filtrationsrate auf 1/10 der Norm bedeutet einen Anstieg von Kreatinin um das 10fache der Norm (Böcker et al., 2001). Dies bedeutet für die Verumgruppe, deren Kreatininwert auf das 10fache angestiegen ist, dass die glomeruläre Filtrationsrate auf 1/10 gesunken ist.

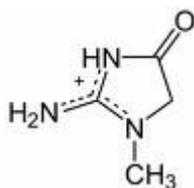


Abbildung 14: Strukturformel von Kreatinin

Die Ausscheidung mit dem Harn erfolgt beim Mensch größtenteils glomerulär und relativ konstant (1,0–1,5 g/24 h). Bei hohen Plasmawerten geschieht dies teilweise auch aktiv tubulär. Der Kreatininspiegel im Blut steigt ab einer Schädigung des Nierenparenchyms von über 50% an. Kreatinin eignet sich so besonders als Nachweis von ausgeprägten, meist langwierigen Nierenschädigungen. Steigt der Kreatininspiegel im Blut, so ist anzunehmen, dass die Filtrationsrate vermindert ist. Dabei ist die Erhöhung des Kreatininspiegels im Blut nicht proportional zur Nierenschädigung. Eine mögliche toxisch-pathologische Wirkung von Ro 28-2653 auf die Funktionalität der Nieren von CD1^{pcy/pcy}-Mäusen sollte bei den vorliegenden Ergebnissen in Betracht gezogen werden. So lässt der Anstieg des

Blutkreatininwertes bei beinahe unveränderter Urinkreatininkonzentration innerhalb der Verumgruppe auf eine vermehrte Degeneration, Umstrukturierung und verschlechterte Filtrationsleistung der Glomerula sowie Beeinträchtigung der Tubuli schließen.

Der Kreatinin-Clearance kommt in der Nierenfunktionsdiagnostik eine zentrale Bedeutung zu. Die Clearance drückt das Verhältnis der pro Zeiteinheit ausgeschiedenen Substanzmenge zur Plasmakonzentration der betreffenden Substanz aus (Schmidt und Thews, 1997). In dieser Studie kam es zum Studienende in beiden Testgruppen zum Abfallen der Kreatinin-Clearance. Eine niedrigere Clearance entsteht rechnerisch durch eine höhere Plasmakonzentration bzw. durch eine niedrigere Urinkonzentration des Kreatinins und/oder ein niedrigeres Urinminutenvolumen. Hier liegt ein Anstieg der Plasmakonzentration bei fast unveränderter Urinkonzentration von Kreatinin vor.

Harnstoff ist das Hauptabbauprodukt des Proteinstoffwechsels im Körper (Abbildung 15). Im Körper anfallender Ammoniak wird im Harnstoffzyklus zu Harnstoff abgebaut. Die Ausscheidung erfolgt zu über 90% über die Nieren.

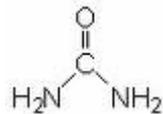


Abbildung 15: Strukturformel von Harnstoff

Ein Anstieg der Harnstoffkonzentration im Blut ist mitunter auch nach erhöhter Proteinaufnahme möglich. Bei dieser Studie wird jedoch die Bildung von Zysten als Ursache der Azotämie angenommen. Die Blutharnstoffkonzentration war gegenüber dem Ausgangswert um über die Hälfte, gegenüber der Placebogruppe nach Studienende um knapp ein Drittel erhöht.

Die Filtrationsbarriere der Glomerula besteht aus Endothelzellen, Basalmembran und Podozyten. Kleinere Proteine passieren das Glomerulum und werden tubulär reabsorbiert. Bei einem tubulären Schaden ist diese Rückresorption eingeschränkt. Wird die Filtrationsbarriere beschädigt, kommt es zu einem unphysiologischem

Übertritt von Plasmaproteinen in das Glomerulusfiltrat. In dieser Studie zeigte sich in der Verumgruppe gegenüber dem Ausgangswert und gegenüber der Placebogruppe nur ein geringgradiger Anstieg der Proteinkonzentration im Urin.

Albumin (Molekulargewicht 65 kDa) wird im intakten Glomerulum kaum filtriert, so wird physiologischerweise die Filtrationsbarriere nicht überschritten. Albumin, welches dennoch in das Nierenbecken gelangt, wird im proximalen Tubulus zu 99% rückresorbiert. Dieser Rückresorptionsmechanismus kann bedingt eine erhöhte Filtration von Albumin kompensieren. Die mit Ro 28-2653 behandelte Gruppe zeigte gegenüber der nicht behandelten Gruppe und im Vergleich mit dem Ausgangswert zu Studienbeginn einen relativ schwachen Abfall von Albumin im Urin. In dieser Studie hatte somit das Wachstum der Zysten entweder keinen Einfluss auf die Durchlässigkeit von Albumin am glomerulären Filter und den Rückresorptionsmechanismus im proximalen Tubulus oder es liegt eine Verunreinigung der Ausgangswerte durch Kontamination durch Futterpartikel in den Stoffwechselläufigen vor.

Nierenzysten sind mit flachem bis kubischem Epithel ausgekleidet. Das umliegende Gewebe ist oftmals von Druckatrophie, chronischer Entzündung und Fibrose geprägt (patho.vetmed.uni-muenchen.de). Anders als z.B. bei der Anwendung von Ro 28-2653 beim duktualen Pankreaskarzinom des Syrischen Hamsters, bei dem eine Metastasierung in der Leber signifikant verringert wurde (Gregor et. al., 2008), konnte in dieser Studie keine Verringerung des Zystenwachstums in den Mäusenieren festgestellt werden. Das Zystenwachstum schien durch das Medikament eher begünstigt zu werden. So stieg, verglichen mit den Placebotieren, bei den Tieren, denen Ro 28-2653 verabreicht wurde, die Anzahl der Zysten, die Durchschnittsfläche der Einzelzyste sowie der Anteil der Zystenfläche an der Gesamtnierenfläche. Durch eine Messung von MMP-2, MMP-9 und Membran Typ1 Matrix-Metalloproteinasen in kommenden Studien könnte diese Annahme bestätigt werden. Zystennieren können in ihrer typischen Ausprägung ein Vielfaches ihres Gewichtes erreichen. Das Gewicht der Nieren bei den Tieren der Verumgruppe hat, verglichen mit der Placebogruppe, um 6,7% zugenommen. Diese Gewichtszunahme

steht in Relation zu dem erhöhten Anteil der Zystenfläche an der Gesamtnierenfläche sowie der erhöhten Gesamtzystenzahl in der Verumgruppe.

Kollagene sind eine Familie fibrillärer Proteine, die 25-30% des Gesamtkörperproteins ausmachen. Je nach Verteilung und Struktur lassen sich die Kollagene in interstitielle und basalmembranorientierte Typen gliedern. Nieren besitzen wie alle inneren Organe hohe Anteile an Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV (Basalmembran) und Kollagen Typ V (Gefäße) (Böcker et al., 2001). Mit der Sirius-Rot Färbung werden alle unterschiedlichen Kollagenarten markiert. In der Tumorprogression z.B. beim Prostatakarzinom (Lein et al., 2002) oder beim kolorektalen Karzinom (Tomita et al. 1996; Duncan et al. 1996; Roeb et al., 2001), spielen MMP-2 und MMP-9 eine besondere Rolle. Diese MMPs haben unter anderem die besondere Eigenschaft Kollagen IV spalten zu können. Dies ist ein wichtiger Schritt beim Durchbruch der Basalmembran und somit bei der Gewebsinvasion und Tumormetastasierung. Im Verlauf der Studie konnte in der Verumgruppe trotz kleiner Tierzahl ein verglichen mit dem Ausgangswert höherer Kollagenwert ermittelt werden. Die absolute Kollagenfläche ist um 17% ($p = 0,036$), der Anteil der Kollagenfläche an der Gesamtnierenfläche um 9,5% höher. Es ist davon auszugehen, dass Ro 28-2653 den Abbau des Kollagens in den Nieren verhindert hat. Ein ausgeprägtes Zystenwachstum in den Nieren konnte jedoch durch diesen Mechanismus nicht verhindert werden.

Die Proliferation von Zellen des Zystenepithels und die Sekretion von Flüssigkeit in die Zysten ist von cAMP abhängig. cAMP stimuliert den Ras/MAP-Kinase-Weg (Rat sarcoma/mitogen-activated-protein) und führt so zu einem abnormalen Zellwachstum. Zudem fördert cAMP die Flüssigkeitssekretion in die Zysten (Calvet, 2008). Erhöhte Werte von cAMP stimulieren die Proliferation und Sekretion zystischer Epithelzellen (Belibi et al., 2004; Yamaguchi et al., 2000). Da das Zystenwachstum in dieser Studie nicht verringert werden konnte, sollte der Einsatz der cAMP-Antagonisten Somatostatin und Vasopressin (Masoumi et al., 2007) überlegt werden. Weiterhin sollten Ergebnisse aus derzeit laufenden Studien (Qian et al., 2008; Edelstein et al., 2008), die sich mit der Anwendung eines Immunsuppressivums wie Sirolimus (Rapamycin) (Flechner et al., 2002) beschäftigen, mit in die weitere Diskussion aufgenommen werden. Die hemmende Wirkung dieser Substanz auf das Zystenwachstum wurde bereits in verschiedenen Tiermodellen nachgewiesen (Tao et al., 2005; Wahl et al., 2006).

Die Differenz des Herzgewichtes zwischen Verum- und Placebogruppe liegt bei 8,3%. Bei der ADPKD des Menschen liegt bei 25% der betroffenen Personen ein Mitralklappenprolaps, welcher eine linksventrikuläre Hypertrophie bedingt, vor. Bei den Tieren der Testgruppe wurde nur das Herzgewicht erfasst und keine Untersuchung der Herzklappen durchgeführt. Es ist deshalb unklar, ob die Tiere eine Pathologie ähnlich der menschlichen ADPKD entwickelten, die durch die Verabreichung des Medikamentes nicht oder nur im geringen Maße beeinflusst wurde.

Für die Effektivität von Ro 28-2653 zur Verringerung des Nierenzystenwachstums bei CD1^{pcy/pcy}-Mäusen konnten bis jetzt nur Vermutungen angestellt werden. Diese Studie bestätigt eine signifikante Verminderung des Kollagenabbaus in den Nieren dieser Tiere, welche jedoch das Zystenwachstum nicht signifikant verringern konnte. Diese Studie dient weiterhin als Ergänzung für Studien an anderen Tiermodellen (z.B. Syrischer Hamster und Ratten mit Prostatakrebs), bei denen Ro 28-2653 erfolgreich zur Verringerung der Metastasierung eingesetzt werden konnte.

5. Literaturverzeichnis

- Anderson, I. C., Sugarbaker, D. J., Ganju, R. K., Tsarwhas, D. G., Richards, W. G., Sunday, M., Kobzik, L., Shipp, M. A. (1995). Stromelysin-3 is overexpressed by stromal elements in primary non-small cell lung cancers and regulated by retinoic acid in pulmonary fibroblasts. *Cancer Res.* 55, 4120-4126.
- Barrick, B., Campell, E. J., Owen, C. A. (1999). Leukocyte proteinases in wound healing: roles in physiologic and pathologic processes. *Wound Rep. Reg.* 7, 410-422.
- Barthez, P. Y., Rivier, P. (2003). Prevalence of polycystic kidney disease in Persian and Persian related cats in France. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 5, 345-347.
- Bernard, E. J., Muschel, R. J., Hughes, E. N. (1990). Gelatinase Release Correlates with the Metastatic Phenotype in Transformed Rat Embryo Cells. *Cancer Res.* 50, 3872-3877.
- Belibi, F., A., Reif, G., Wallace, D. P., Yamaguchi, T., Olsen, L., Helmkamp, G. M., Grantham, J. J. (2004). Cyclic AMP promotes growth and secretion in human polycystic kidney epithelial cells. *Kidney Int.* 66, 964–973.
- Boesken, W. H., Mamier, A. (1985). Molekulargewichtsbezogene Urinprotein-Elektrophorese in der Diagnostik von Nierenkrankheiten. *Lab. med.* 9, 285-291.
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U. (2001). *Allgemeine Tumorpathologie. Pathologie 2. Auflage.*
- Calvet, J. P. (1998). Molecular genetics of polycystic kidney disease. *J. Nephrol.* 11, 24-34.
- Calvet, J. P. (2008). Strategies to inhibit cyst formation in ADPKD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 3, 1205-1211.
- Chew, D. J.; Dibartola, S. P. (1986). *Manual of Small Animal Nephrology and Urology*, 1. Aufl., Churchill Livingstone, New York.
- Crawford, H. C., Matrisian, L. M. (1994). Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression Invasion Metastasis 14, 234-245.
- Daoust, M. C., Reynolds, D. M., Bichet, D. G., Somlo, S. (1995). Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics* 25, 733-736.
- Davies, B., Miles, D. W., Happerfield, L. C., Naylor, M. S., Bobrow, L. G., Rubens, R. D., Balkwill, F. R. (1993). Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *British journal of cancer* 67, 1126-1131.
- Duncan, M. E., Murray, G. I., O'Neil, P., Melvin, W. T., Fothergill, J. (1996). Expression of Metalloproteinases in Colorectal Cancer. *Biochemical Society Transactions* 24, 329S.
- Edelstein, C. L. (2008). Mammalian target of rapamycin and caspase inhibitors in polycystic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 3, 1219-1226.
- Frei, U., Schober-Halstenberg, H. J. (2005/2006). *Nierenersatztherapie in Deutschland. QuaSi-Niere Jahresbericht*, www.quasi-niere.de.
- Gabow P. A. (1993). Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 329, 332-342.
- Gardner, K. D. (1983). Cystic disease of kidney. *Textbook of Nephrology* 1, 160.
- Gardner, K. D., Burnside, J. S., Elzinga, L. W., Locksley, R. M. (1991). Cytokines in fluids from polycystic kidneys. *Kidney Int.* 39, 718–724.

Germino G. G. (1997). Autosomal dominant polycystic kidney disease: a two-hit model. *Hosp. Pract.* 32, 81-82, 85-88, 91-92.

González-Perrett, S., Kim, K., Ibarra, C., Damiano, A. E., Zotta, E., Batelli, M., Harris, P. C., Reisin, I. L., Arnaout, M. A., Cantiello, H. F. (2001). Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca^{2+} -permeable nonselective cation channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1182-1187.

Gravallese, E. M., Darling, J. M., Ladd, A. L., Katz, J. N., Glimcher, L. H. (1991). In situ hybridisation studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 34, 1076-1084.

Gregor, J. I., Heukamp, I., Kilian, M., Hanel, M., Kristiansen, G., Schimke, I., Walz, M. K., Jacobi, C. A., Wenger, F. A. (2008). Selective Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor RO 28-2653 decreases TumorGrowth and Liver Metastasis due to a reduction of Matrix-Metalloproteinases-2 and -9 in ductal Pancreatic Cancer in Syrian Hamsters? *Chirurgisches Forum*, Band 37.

Guelfi, J. F.; Florio, R. (1974). De l'electrophorese des proteines seriques et urinaires en pathologie canine. *Révue de Médecine Vétérinaire* 37, 1-26.

Hanaoka, K., Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A. K., Piontek, K., Tsiokas, L., Sukhatme, V. P., Guggino, W. B., Germino, G. G. (2000). Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 408, 990-994.

Hateboer, N., Van Dijk, M. A., Bogdanova, N., Coto, E., Saggat-Malik, A. K., San Millan, J. L., Torra, R., Breuning, M., and Ravine, D. (1999). Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet* 353, 103-107.

Helmig, S. (2005): Populationsgenetische Untersuchung an dem PKD1-Gen der Katze im Hinblick auf das Polyzystische Syndrom. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Hidalgo, M., Eckhardt, S. G. (2001). Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 178-193.

Hierholzer, K., Fromm, M. (1987). Wasser- und Elektrolythaushalt; Physiologie der Niere. In Scheunert, A. und Trautmann A., *Lehrbuch der Veterinärphysiologie*, 7. Aufl., Paul Parey, Berlin, 359-436.

Hughes, J., Ward, C. J., Peral, B., Aspinwall, R., Clark, K., San Millán, J. L., Gamble, V., Harris, P. C. (1995). The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat. Genet.* 10, 151-159.

Kappe, E. C. (2008): Molekularbiologische Untersuchungen am PKD1-Gen der Katze. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen.

Klimiuk, P. A., Sierakowski, S., Domyslawska, J., Chwiecko, J. (2004). Effekt of repeated infliximab therapie on serum matrix-metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 31, 238-242.

Koulen, P., Cai, Y., Geng, L., Maeda, Y., Nishimura, S., Witzgall, R., Ehrlich, B. E., Somlo, S. (2002). Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat. Cell Biol.* 4, 191-197.

Kühn, W., Walz, G. (2007). Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung. *Ärztblatt* 104, 3022-3028.

Labato, M. A., Ross, L. A. (1991). Plasma disappearance of creatinine as a renal function test in the dog. *Res. Vet. Science* 50, 253-258.

Larue, L. H., Feldmann, B. F. (1988). Function tests: Kidney function. *Modern veterinary practice*, 172-175.

- Lein, M., Jung, K., Ortel, B., Stephan, C., Rothaug, W., Juchem, R., Johannsen, M., Deger, S., Schnorr, D., Loening, S. Krell, H. W. (2002). The new synthetic matrix-metalloproteinase inhibitor (Roche 28-2653) reduces tumor growth and prolongs survival in a prostate cancer standard rat model. *Oncogene* 21, 2089-2096.
- Lelongt, B., Trugnan, G., Murphy, G., Ronco, P. M. (1997). Matrix-metalloproteinases MMP2 and MMP9 are produced in early stages of kidney morphogenesis but only MMP9 is required for renal organogenesis in vitro. *J. Cell Biol.* 136, 1363–1373.
- Levin, J. I. (2004). The design and synthesis of aryl hydroxamic acid inhibitors of MMPs and TACE. *Curr. Top. Med. Chem.* 4, 1289-1310.
- Liotta, L. A., Stetler-Stevenson, W. G. (1991). Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res.* 51, 5054-5059.
- Macaulay, V. M., O'Byrne, K. J., Saunders, M. P., Braybrooke, J. P., Long, L., Gleeson, F., Mason, C. S., Harris, A. L., Brown, P. Talbot, D. C. (1999). Phase I study of intrapleural batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in the treatment of malignant pleural effusions. *Clin. Cancer Res.* 5, 513-520.
- Massova, I., Kotra, L. P., Fridman, R., Mobashery, S. (1998). Matrix-metalloproteinases: structures, evolution and diversification. *FASEB J.* 12, 1075-1095.
- Masoumi, A., Reed-Gitomer, B., Kelleher, C., Schrier, R. W. (2007). Potential pharmacological interventions in polycystic kidney disease. *Drugs* 67, 2495–2510.
- Murphy, G., Docherty, A. J. (1992). The matrix-metalloproteinases and their inhibitors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7, 120-125.
- Nagao, S., Watanabe, T., Ogiso, N., Marunouchi, T., Takahashi, H. (1995). Genetic mapping of the polycystic kidney gene, *pcy*, on mouse chromosome 9. *Biochem. Genet.* 33, 401-412.
- Nagase, H., Woessner, J. F. (1999). Matrix-metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274, 21491-21494.
- Newby, L. J., Streets, A. J., Zhao, Y., Harris, P. C., Ward, C. J., Ong, A. C. M. (2002). Identification, characterization, and localization of a novel kidney polycystin-1-polycystin-2 complex. *J. Biol. Chem.* 277, 20763-20773.
- Norman, J. T., Gatti, L., Wilson, P. D., Lewis, M. (1995). Matrix-metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix-metalloproteinases expression by tubular epithelia and interstitial fibroblasts in the normal kidney and in fibrosis. *Exp. Nephrol.* 3, 88-89.
- Ochieng, J., Fridman, R., Nangia-Makker, P., Kleiner, D. E., Liotta, L. A., Statler-Stevenson, W. G., Raz, A. (1994). Galectin-3 Is a Novel Substrate for Human Matrix-Metalloproteinases-2 and -9. *Biochemistry* 33, 14109-14114.
- Olbrich, H., Fliegau, M., Hoefele, J., Kispert, A., Otto, E., Volz, A., Wolf, M. T., Sasmaz, G., Trauer, U., Reinhardt, R., Sudbrak, R., Antignac, C., Gretz, N., Walz, G., Schermer, B., Benzing, T., Hildebrandt, F., Omran, H. (2003). Mutations in a novel gene, *NPHP3*, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nat. Genet.* 34, 355-356.
- Omran, H., Häffner, K., Burth, S., Fernandez, C., Fargier, B., Villaquiran, A., Nothwang, H. G., Schnittger, S., Lehrach, H., Woo, D., Brandis, M., Sudbrak, R., Hildebrandt, F. (2001). Human adolescent nephronophthisis: Gene locus synteny with polycystic kidney disease in *pcy* mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 107-113.
- Onuchic, L. F., Furu, L., Nagasawa, Y., Hou, X., Eggermann, T., Ren, Z., Bergmann, C., Senderek, J., Esquivel, E., Zeltner, R., Rudnik-Schöneborn, S., Mrug, M., Sweeney, W., Avner, E. D., Zerres, K., Guay-Woodford, L. M., Somlo, S., Germino, G. G. (2002). *PKHD1*, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 1305-1317.

- Pei, Y., Watnick, T., He, N., Wang, K., Liang, Y., Parfrey, P., Germino, G. George-Hyslop P. S. (1999). Somatic PKD2 mutations in individual kidney and liver cysts support a "two-hit" model of cystogenesis in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1524-1529.
- Pendas, A. M., Santamaria, I., Alvarez, M. V., Pritchard, M., Lopez-Otin, C. (1996). Fine physical mapping of the human matrix-metalloproteinase genes clustered on chromosome 11q22.3. *Genomics* 37, 266-268.
- Powell, W. C., Matrisian, L. M. (1996). Complex roles of matrix-metalloproteinases in tumor progression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 213, 1-21.
- Qian, F., Germino, F. J., Cai, Y., Zhang, X., Somlo, S., Germino, G. G. (1997). PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat. Genet.* 16, 179-183.
- Qian, Q., Du, H., King, B. F., Kumar, S., Dean, P. G., Cosio, F. G. Torres, V. E. (2008). Sirolimus reduces polycystic liver volume in ADPKD patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 631-638.
- Rabbani, S. A. (1998). Metalloproteases and urokinase in angiogenesis and tumor progression. *In Vivo* 12, 135-142.
- Rankin, C. A., Itoh, Y., Tian, C., Ziemer, D. M., Calvet, J. P., Gattone, V. H. (1999). Matrix-metalloproteinase-2 in a murine model of infantile-type polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 210-217.
- Rankin, C. A., Suzuki, K., Itoh, Y., Ziemer, D. M., Grantham, J. J., Calvet, J. J., Nagase, H. (1996). Matrix-metalloproteinases and TIMPs in cultured C57BL/6J-cpk kidney tubules. *Kidney Int.* 50, 835-844.
- Roeb, E., Dietrich, C. G., Winograd, R., Arndt, M., Breuer, B., Fass, J., Schumpelick, V., Marten, S. (2001). Activity and Cellular Origin of Gelatinases in Patients with Colon and Rectal Carcinoma. Differential Activity of Matrix-Metalloproteinase-9. *Cancer* 92, 2680-2691.
- Rogers, K. S., Komokov, A., Brown, S. A., Lees, G. E., Hightower, D., Russo, E. A. (1991). Comparison of four methods of estimating glomerular filtration rate in cats. *Am. J. Vet. Res.* 52, 961-964.
- Russo, E. A., Lees, G. E., Hightower D. (1986). Evaluation of renal function in cats, using quantitative urinalysis: *Am. J. Vet. Res.* 47, 1308-1312.
- Rutkauskaite, E., Zacharias, W., Schedel, J., Muller-Lachner, U., Mawrin, C., Seemayer, C. A., Alexande, D., Gay, R. E., Aicher, W. K., Michel, B. A., Gay, S., Pap, T. (2004). Ribozymes that inhibit the production of matrix-metalloproteinase 1 reduce the invasiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 50, 144-156.
- Schaefer, L., Han, X., Gretz, N., Hafner, C., Meier, K., Matzkies, F., Schaefer, R. M. (1996). Tubular gelatinase A (MMP-2) and its tissue inhibitors in polycystic kidney disease in the Han:SPRD rat. *Kidney Int.* 49, 75-81.
- Schrier, R. W. (1999). Atlas of Diseases of the kidney Volume two, Chapter 9: Cystic Diseases of the kidney Yvey Pirson & Dominique Chauveau.

- Schwendenwein, I. (1989). Labordiagnostische Möglichkeiten für Praktiker bei Nierenerkrankungen des Hundes und der Katze. *Tierärztl. Mschr. Wien* 76, 244-248.
- Shingu, M., Nagai, Y., Isayama, T., Naono, T., Nobunga, M., Nagai, Y. (1993). The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 94, 145-149.
- Simons, M., Walz, G. (2006). Polycystic kidney disease: cell division without a clue? *Kidney Int.* 70, 854-864.
- Slade, M. J., Kirby, R. B., Po'csi, I., Jones, J. K., Price, R. G. (1998). Presence of laminin fragments in cyst fluid from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): role in proliferation of tubular epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1401, 203-210.
- Stetler-Stevenson, W. G., Kruttsch, H. C., Liotta, L. A. (1989). The activation of human type IV collagenase proenzyme. Sequence identification of the major conversion product following organomercurial activation. *J. Biol. Chem.* 264, 17374-17378.
- Sutter, M., Germino G. G. (2003). Autosomal dominant polycystic kidney disease: Molecular genetics and pathophysiology. *J. Lab. Clin. Med.* 141, 91-106.
- Tao, Y., Kim, J., Schrier, R. W., Edelstein, C. L. (2005). Rapamycin Markedly Slows Disease Progression in a Rat Model of Polycystic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 46-51.
- Takahashi, H., Calvet, J. P., Dittmore-Hoover, D., Yoshida, K., Grantham, J. J., Gattone, V. H. 2nd (1991). A Hereditary Model of Slowly Progressive Polycystic Kidney Disease in Mouse. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1, 980-989.
- Tomita, T., Iwata, K. (1996). Matrix-Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Colonic Adenomas-Adenocarcinomas. *Diseases Colon Rectum* 39, 1255-1264.
- Tsiokas, L., Kim, E., Arnould, T., Sukhatme, V. P., (1997). Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 6965-6970.
- Turpeenniemi-Hujanen, T., Thorgeirsson, U. P., Hart, I. R., Grant, S. S., Liotta, L. A. (1985). Expression of Collagenase IV (Basement Membrane Collagenase) Activity in Murine Tumor Cell Hybrids that differ in Metastatic Potential. *J. Natl. Cancer Inst.* 75, 99-103.
- Ura, H., Bonfil, R. D., Reich, R., Redel, R., Pfeifer, A., Harris, C. C., Klein-Szanto, A. J. P. (1989). Expression of Type IV Collagenase and Procollagen Genes and its Correlation with the Tumorigenic, Invasive and Metastatic Abilities of Oncogene-transformed Human Bronchial Epithelial Cells. *Cancer Res.* 49, 4615-4621.
- Van Dijk, M. A., Chang, P. C., Peters, D. J., Breuning, M. H. (1995). Intracranial aneurysms in polycystic kidney disease linked to chromosome 4. *J. Am. Soc. Nephrol.* Vol 6, 1670-1673.
- Vassilev, P. M., Guo, L., Chen, X. Z., Segal, Y., Peng, J. B., Basora, N., Babakhanlou, H., Cruger, G., Kanazirska, M., Ye, C., Brown, E. M., Hediger, M. A., Zhou, J. (2001). Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca²⁺ homeostasis in polycystic kidney disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 341-350.
- Wagener, C. (1999). *Molekulare Onkologie. Entstehung und Progression maligner Tumoren* 2. Auflage Georg Thieme Verlag, 279-291.
- Ward, C. J., Hogan, M. C., Rossetti, S., Walker, D., Sneddon, T., Wang, X., Kubly, V., Cunningham, J. M., Bacallao, R., Ishibashi, M., Milliner, D. S., Torres, V. E., Harris, P. C. (2002). The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat. Genet.* 30, 259-269.

Ward, C. J., Yuan, D., Masyuk, T. V., Wang, X., Punyashthiti, R., Whelan, S., Bacallao, R., Torra, R., LaRusso, N. F., Torres, V. E., Harris, P. C. (2003). Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein fibrocystin is expressed on primary cilia. *Human Molecular Genetics* Vol. 12, No. 20, 2703-2710.

Yamaguchi, T., Pelling, J. C., Ramaswamy, N. T., Eppler, J. W., Wallace, D. P., Nagao, S., Rome, L. A., Sullivan, L. P., Grantham, J. J. (2000). cAMP stimulates the in vitro proliferation of renal cyst epithelial cells by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Kidney Int.* 57, 1460-1471.

Yoder, B. K., Mulroy, S., Eustace, H., Boucher, C., Sandford, R. (2006). Molecular pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Expert. Rev. Mol. Med.* 8, 1-22.

Zhang, M. Z., Mai, W., Li, C., Cho, S. Y., Hao, C., Moeckel, G., Zhao, R., Kim, I., Wang, J., Xiong, H., Wang, H., Sato, Y., Wu, Y., Nakanuma, Y., Lilova, M., Pei, Y., Harris, R. C., Li, S., Coffey, R. J., Sun, L., Wu, D., Chen, X. Z., Breyer, M. D., Zhao, Z. J., Mc Kanna, J. A., Wu, G. (2004). *PKHD1* protein encoded by the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease associates with basal bodies and primary cilia in renal epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 2311-2316.

6. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Karl
Vorname: Martina Andrea
Geburtsdatum: 26.10.1976
Geburtsort: Straubing/Niederbayern
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, ein Kind
Anschrift: Tassilostraße 14
94377 Münster/Steinach

Schulische und berufliche Ausbildung

1983 - 1989: Grund- und Hauptschule in Straubing-Ittling
1989 - 1993: Mädchenrealschule der Ursulinen in Straubing mit Erwerb der „Mittleren Reife“
1993 - 1994: Vorpraktikum im Kindergarten St. Johannes in Straubing
1994 - 1995: Vorpraktikum an der Förderstätte für Schwerstbehinderte St. Josef in Straubing
1995 - 1997: Fachakademie für Sozialpädagogik der Ursulinen in Straubing mit Berufsabschluss als „Staatlich anerkannte Erzieherin“ mit Erwerb der „Fachgebundenen Fachhochschulreife“
1997 - 1998: Tätigkeit beim Stadtjugendring Straubing im Bereich Jugendarbeit und Erlebnispädagogik
1995 - 1998: Berufsbegleitende Ausbildung zum heilpädagogisch-therapeutischen Reiten
1998 - 1999: Berufsoberschule Stufe 12 in Straubing mit Erwerb der „Fachhochschulreife“
1999 - 2000: Berufsoberschule Stufe 13 in Regensburg mit Erwerb der „Allgemeinen Hochschulreife“ (Facharbeit: Die Evolution des Pferdes)

- 2000 - 2001: Tätigkeit beim Bund Naturschutz in Straubing im Bereich
Umweltpädagogik
- 2001: Dreimonatige Reise durch Südafrika, Namibia und
Zimbabwe mit Hospitanzen an verschiedenen
tiermedizinischen und zoologischen Einrichtungen
- 2001: Tätigkeit als Betreuerin beim Flugtransport von Pferden in
den Libanon
- 2001 - 2006 : Tätigkeit im Hofbräu-Festzelt am Oktoberfest in München
im Bereich Service/Bedienung
- 2001: Beginn des Studiums der Tiermedizin an der
Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität in München
- 2003 - 2004: Auslandssemester an der Ecole de Veterinaire de
Toulouse in Frankreich
- 2004 - 2005: Studentische Hilfskraft in der Pferdeklinik München-Riem
bei Dr. Dietz Donant und Dr. Michael Zeitelhack
- 2006: Nachtdienstpflegerin an der Klinik für Wiederkäuer in
Oberschleißheim
- 2007: Abschluss des Studiums der Tiermedizin an der
Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität in München

Tierärztliche Tätigkeit

- 01.07.2007 - 31.12.2008: Teilzeitassistenz bei Dr. Klaus Bachmeier in
Stallwang/Rattiszell (Rinderpraxis)
- 01.09.2007 - 31.12.2008: Teilzeitassistenz bei Dr. Folker Schulz in
Neutraubling (Kleintiermedizin/Chirurgie)
- 01.04.2008 - 31.03.2009: Amtliche Tierärztin beim Veterinäramt am
Schlachthof in Straubing
- 01.01.2009 - 30.06.2009: Assistenz bei Dr. Konrad Schwarz in Straubing
(Gemischtpraxis - Schwerpunkt Pferdemedizin)
- seit 04.07.2009: Freiberufliche Tierärztin (Tätigkeitsschwerpunkt in
der Praxis Dr. Konrad Schwarz in Straubing)

7. Anhang

Kreatinin im Blut

<i>Geschlecht</i>	<i>Nummer</i>	<i>Placebo vorher</i>	<i>Placebo nachher</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Nummer</i>	<i>Verum vorher</i>	<i>Verum nachher</i>
♂	79	0,09	0,10	♂	76	0,01	0,50
♂	80	0,05	0,06	♂	94	0,03	0,07
♂	86	0,08	0,06	♂	95	0,03	0,56
♂	89	0,07	0,08	♂	96	0,01	0,07
♂	98	0,03	0,07	♂	140	0,01	0,05
♂	856	0,06	0,07	♂	146	0,05	0,33
♂	857	0,02	0,33	♂	858	0,02	0,07
♂	866	0,04	0,26	♂	864	0,02	0,10
♀	83	0,06	0,09	♂	872	0,01	0,12
♀	84	0,08	0,06	♂	873	0,03	0,35
♀	99	0,06	0,06	♂	876	0,03	0,15
♀	133	0,01	0,07	♀	85	0,01	0,42
♀	145	0,01	0,10	♀	92	0,02	0,06
♀	151	0,01	0,10	♀	877	0,03	0,08
♀	867	0,01	0,07	♀	968	0,05	0,11
♀	967	0,01	0,09				
Mittelwert		0,04	0,11			0,02	0,20
♂+♀							

Tabelle 1: Kreatinin in mg/dl Blut

Harnstoff im Blut

Geschlecht	Nummer	Placebo vorher	Placebo nachher	Geschlecht	Nummer	Verum vorher	Verum nachher
♂	79	57	62	♂	76	58	245
♂	80	57	65	♂	94	68	90
♂	86	51	84	♂	95	67	220
♂	89	57	72	♂	96	77	57
♂	98	42	60	♂	140	90	61
♂	856	48	51	♂	146	94	232
♂	857	55	240	♂	858	75	41
♂	866	87	117	♂	864	84	52
♀	83	52	53	♂	872	97	78
♀	84	65	70	♂	873	75	171
♀	99	49	67	♂	876	108	79
♀	133	73	45	♀	85	66	214
♀	145	61	50	♀	92	81	48
♀	151	90	66	♀	877	49	76
♀	867	52	83	♀	968	51	79
♀	967	62	72				
Mittelwert		56,35	81,59			76	116,2
♂+♀							

Tabelle 2: Harnstoff in mg/dl Blut

Kreatinin im Urin

Geschlecht	Nummer	Placebo vorher	Placebo nachher	Geschlecht	Nummer	Verum vorher	Verum nachher
♂	79	14,59	8,95	♂	76	8,09	10,20
♂	80	11,49	13,40	♂	94	21,96	26,74
♂	86	11,93	11,49	♂	95	12,44	27,31
♂	89	15,09	13,60	♂	96	6,14	10,94
♂	97	12,86	15,33	♂	140	9,34	10,50
♂	98	16,27	21,33	♂	146	15,05	7,39
♂	856	10,84	11,45	♂	858	7,31	11,29
♂	857	12,10	11,76	♂	864	7,94	14,54
♂	866	7,50	8,26	♂	872	13,00	8,84
♀	83	16,42	21,64	♂	873	12,79	13,66
♀	84	11,96	11,67	♂	876	17,61	7,56
♀	99	11,12	38,21	♀	85	42,29	19,08
♀	133	26,68	9,50	♀	92	10,45	18,21
♀	145	33,55	10,02	♀	877	12,85	7,59
♀	151	19,18	10,16	♀	968	15,43	19,56
♀	867	8,98	17,61				
♀	967	11,09	9,89				
Mittelwert		14,8	14,37			14,18	14,23
♂+♀							

Tabelle 3: Kreatinin in mg/dl Urin

Harnstoff im Urin

<i>Geschlecht</i>	<i>Nummer</i>	<i>Placebo vorher</i>	<i>Placebo nachher</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Nummer</i>	<i>Verum vorher</i>	<i>Verum nachher</i>
♀	83	6.845	8.397	♀	85	2.197	8.802
♀	84	4.155	4.567	♀	92	5.493	4.589
♀	99	6.409	7.853	♀	877	4.897	3.920
♀	133	6.572	4.490	♀	968	9.113	4.318
♀	145	15.981	4.972	♂	76	2128	3432
♀	151	5.994	4.891	♂	94	6802	4387
♀	867	7.315	5.179	♂	95	3751	4610
♀	967	7.094	6.770	♂	96	2378	3623
♂	79	3147	3320	♂	140	4650	4231
♂	80	3596	5093	♂	146	4656	3767
♂	86	9064	5667	♂	858	2398	4013
♂	89	6164	4386	♂	864	3426	4882
♂	97	3784	4623	♂	872	4805	3601
♂	98	6313	6994	♂	873	4415	4130
♂	856	5512	4259	♂	876	4564	2847
♂	857	6921	4673				
♂	866	4688	3509				
Mittelwert		6.444,35	5.273,12			4.378,2	4.343,47
♂ + ♀							

Tabelle 4: Harnstoff in mg/dl Urin

Protein im Urin

<i>Geschlecht</i>	<i>Nummer</i>	<i>Placebo vorher</i>	<i>Placebo nachher</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Nummer</i>	<i>Verum vorher</i>	<i>Verum nachher</i>
♀	83	0,22	0,42	♀	85	0,37	0,86
♀	84	0,36	0,42	♀	92	0,32	0,33
♀	99	0,29	0,54	♀	877	0,20	0,17
♀	133	0,20	0,52	♀	968	0,56	0,32
♀	145	0,86	0,24	♂	76	0,15	0,40
♀	151	0,22	0,26	♂	94	0,20	0,39
♀	867	0,46	0,28	♂	95	0,35	0,38
♀	967	0,42	0,34	♂	96	0,24	0,37
♂	79	0,22	0,40	♂	140	0,44	0,28
♂	80	0,16	0,34	♂	146	0,39	0,32
♂	86	0,30	0,36	♂	858	0,26	0,54
♂	89	0,40	0,40	♂	864	0,37	0,51
♂	97	0,27	0,47	♂	872	0,34	0,53
♂	98	0,54	0,54	♂	873	0,55	0,51
♂	856	0,57	0,42	♂	876	0,48	0,34
♂	857	0,60	0,43				
♂	866	0,43	0,41				
Mittelwert	0,38	0,40				0,35	0,42
♂ + ♀							

Tabelle 5: Protein in mg/ml Urin

Albumin im Urin

Geschlecht	Nummer	Placebo vorher	Placebo nachher	Geschlecht	Nummer	Verum vorher	Verum nachher
♀	83	9,40	11,32	♀	85	27,10	14,94
♀	84	14,90	18,72	♀	92	16,70	9,81
♀	99	16,15	45,44	♀	877	11,55	16,65
♀	133	14,78	6,51	♀	968	21,68	9,63
♀	145	14,30	7,36	♂	76	20,32	3,32
♀	151	13,20	5,36	♂	94	15,68	14,78
♀	867	50,49	9,34	♂	95	17,82	8,52
♀	967	18,91	10,49	♂	96	15,71	7,44
♂	79	10,32	22,63	♂	140	13,44	8,24
♂	80	8,15	7,67	♂	146	23,36	7,31
♂	86	8,14	15,04	♂	858	17,10	8,69
♂	89	12,21	7,58	♂	864	18,49	10,74
♂	97	22,18	12,21	♂	872	15,73	6,34
♂	98	15,56	18,30	♂	873	21,51	11,19
♂	856	12,50	7,30	♂	876	26,40	8,22
♂	857	40,41	7,20				
♂	866	29,41	6,12				
Mittelwert		10,54	10,19			18,84	9,72
♂ + ♀							

Tabelle 6: Albumin in µg/ml Urin

Kreatinin-Clearance

Geschlecht	Nummer	Placebo vorher	Placebo nachher	Geschlecht	Nummer	Verum vorher	Verum nachher
♀	83	0,14	0,16	♀	85	0,29	0,01
♀	84	0,15	0,25	♀	92	0,61	0,20
♀	99	0,11	0,20	♀	877	0,28	0,12
♀	133	0,85	0,10	♀	968	0,35	0,11
♀	867	0,77	0,19	♂	76	0,98	0,03
♀	967	0,70	0,05	♂	94	0,31	0,20
♂	79	0,13	0,18	♂	95	0,34	0,02
♂	80	0,22	0,27	♂	96	1,51	0,23
♂	86	0,07	0,18	♂	140	1,02	0,38
♂	89	0,18	0,24	♂	146	0,21	0,04
♂	98	0,28	0,10	♂	858	0,50	0,26
♂	856	0,15	0,25	♂	864	0,54	0,24
♂	857	0,40	0,05	♂	872	2,40	0,12
♂	866	0,20	0,07	♂	873	0,45	0,06
				♂	876	0,46	0,07
Mittelwert		0,31	0,19			0,66	0,14
♂ + ♀							

Tabelle 7: Kreatinin-Clearance

Anzahl der Zysten

Geschlecht	Nummer	Placebo	Geschlecht	Nummer	Verum
♀	83	273	♀	85	285
♀	84	252	♀	92	300
♀	98	252	♀	877	378
♀	99	253	♀	968	433
♀	856	410	♂	76	390
♀	857	328	♂	94	355
♀	867	426	♂	95	278
♀	967	444	♂	96	257
♂	79	226	♂	140	329
♂	80	246	♂	146	363
♂	86	326	♂	858	251
♂	89	169	♂	864	237
♂	97	319	♂	872	364
♂	133	378	♂	873	335
♂	145	302	♂	876	302
♂	151	267	♂	876	302
♂	866	408			
Mittelwert		310			349
♂ + ♀					

Tabelle 8: Anzahl der Zysten pro Tier

Durchschnittsfläche der einzelnen Zyste in

Geschlecht	Nummer	Placebo	Geschlecht	Nummer	Verum
♀	83	7.920,97	♀	85	5.899,53
♀	84	7.179,51	♀	92	5.885,22
♀	99	1.263,42	♀	877	8.196,43
♀	133	7.105,35	♀	968	8.321,88
♀	867	6.396,75	♂	76	7.600,89
♀	967	8.983,00	♂	94	13.488,28
♂	79	8.326,57	♂	95	4.100,53
♂	80	7.820,93	♂	96	7.781,50
♂	86	6.752,61	♂	140	6.673,88
♂	89	4.451,40	♂	146	4.782,48
♂	98	6.696,90	♂	858	3.914,85
♂	856	8.692,67	♂	864	8.400,30
♂	857	5.142,88	♂	872	5.784,02
♂	866	5.942,07	♂	873	7.534,10
			♂	876	14.797,74
Mittelwert		6.474,83			7.075,77
♂ + ♀					

Tabelle 9: Durchschnittsfläche der einzelnen Zyste in Pixel

Prozentualer Anteil der Zystenfläche an der Gesamtnierenfläche

Geschlecht	Nummer	Placebo	Geschlecht	Nummer	Verum
♀	83	18,62	♀	85	15,94
♀	84	16,10	♀	92	17,96
♀	98	12,61	♂	94	38,90
♀	99	25,00	♀	877	23,44
♀	856	22,93	♀	968	33,25
♀	857	14,19	♂	94	38,90
♀	867	34,90	♂	95	9,80
♀	967	34,50	♂	96	22,50
♂	79	14,90	♂	140	20,10
♂	80	16,10	♂	146	16,50
♂	83	18,62	♂	858	8,50
♂	86	18,50	♂	864	13,90
♂	89	14,11	♂	872	24,50
♂	97	17,57	♂	873	27,40
♂	133	19,70	♂	876	26,50
♂	145	5,30			
♂	151	35,20			
♂	866	21,11			
Mittelwert		22,36			25,9
♂ + ♀					

Tabelle 10: Prozentualer Anteil der Zystenfläche an der Gesamtnierenfläche

Absolute Kollagenfläche

Geschlecht	Nummer	Placebo	Geschlecht	Nummer	Verum
♀	83	1.367.382	♀	85	1.882.622
♀	84	1.869.304	♀	92	1.773.976
♀	98	1.279.739	♀	877	2.376.260
♀	99	1.898.384	♀	968	1.670.992
♀	856	1.784.756	♂	76	2.093.651
♀	857	2.274.198	♂	94	2.937.831
♀	867	1.985.362	♂	95	1.996.712
♂	79	2.002.122	♂	96	2.307.290
♂	80	2.236.281	♂	858	2.269.986
♂	86	1.938.798	♂	864	2.438.744
♂	89	1.965.698	♂	872	2.687.902
♂	97	1.941.697	♂	873	2.389.446
♂	145	1.653.030	♂	876	2.794.790
♂	151	1.922.700			
♂	866	3.061.446			
Mittelwert		1.945.393			2.278.477
♂ + ♀					

Tabelle 11: Absolute Kollagenfläche in Pixel

Kollagenflächenanteil an der Gesamtnierenfläche

Geschlecht	Nummer	Placebo	Geschlecht	Nummer	Verum
♀	83	13,64	♀	85	13,45
♀	84	17,09	♀	92	17,12
♀	99	11,36	♀	877	18,66
♀	133	16,40	♀	968	19,20
♀	151	16,60	♂	76	16,03
♀	867	24,88	♂	94	19,91
♀	967	17,83	♂	95	15,08
♂	79	13,54	♂	96	16,29
♂	80	13,57	♂	858	16,41
♂	86	14,29	♂	864	15,60
♂	89	14,21	♂	872	17,49
♂	98	15,43	♂	873	15,55
♂	856	15,81	♂	876	20,47
♂	857	12,90			
♂	866	15,50			
Mittelwert		15,54			17,02
♂ + ♀					

Tabelle 12: Kollagenflächenanteil an der Gesamtnierenfläche in Prozent

Absolutes Nierengewicht

Geschlecht	Nummer	Placebo	Geschlecht	Nummer	Verum
♀	83	0,24	♀	85	0,27
♀	84	0,34	♀	92	0,22
♀	98	0,31	♀	877	0,37
♀	99	0,24	♀	968	0,32
♀	133	0,29	♂	76	0,32
♀	145	0,24	♂	94	0,32
♀	867	0,31	♂	95	0,29
♀	967	0,32	♂	96	0,32
♂	79	0,34	♂	140	0,39
♂	80	0,27	♂	146	0,30
♂	86	0,21	♂	858	0,35
♂	89	0,29	♂	864	0,33
♂	97	0,36	♂	872	0,30
♂	151	0,29	♂	873	0,38
♂	856	0,35	♂	876	0,38
♂	857	0,37			
♂	866	0,30			
Mittelwert		0,30			0,32
♂ + ♀					

Tabelle 13: Absolutes Nierengewicht in Gramm

Nierengewicht/Herzgewicht

Geschlecht	Nummer	Placebo	Geschlecht	Nummer	Verum
♀	867	5,64	♀	85	4,91
♀	967	5,33	♀	92	3,58
♀	83	4,00	♀	877	6,64
♀	84	4,25	♀	968	5,73
♀	99	3,62	♂	76	4,85
♀	133	5,18	♂	94	5,33
♀	145	5,33	♂	95	4,75
♀	151	5,18	♂	96	4,20
♂	79	5,67	♂	140	5,50
♂	80	4,42	♂	146	5,36
♂	86	3,50	♂	858	5,38
♂	89	4,14	♂	864	5,50
♂	97	4,73	♂	872	4,92
♂	98	4,69	♂	873	6,33
♂	856	5,75	♂	876	6,25
♂	857	5,21			
♂	866	4,54			
Mittelwert		4,78			5,28
♂ + ♀					

Tabelle 14: Nierengewicht/Herzgewicht

Nierengewicht/Körpergewicht

Geschlecht	Nummer	Placebo	Geschlecht	Nummer	Verum
♀	83	0,024	♀	85	0,029
♀	84	0,028	♀	92	0,021
♀	99	0,026	♀	877	0,036
♀	133	0,028	♀	968	0,031
♀	145	0,024	♂	76	0,027
♀	151	0,030	♂	94	0,031
♀	867	0,031	♂	95	0,024
♀	967	0,030	♂	96	0,026
♂	79	0,027	♂	140	0,033
♂	80	0,025	♂	146	0,024
♂	86	0,021	♂	858	0,028
♂	89	0,023	♂	864	0,026
♂	97	0,031	♂	872	0,024
♂	98	0,027	♂	873	0,030
♂	99	0,026	♂	876	0,031
♂	856	0,028			
♂	857	0,031			
♂	866	0,027			
Mittelwert		0,027			0,028
♂ + ♀					

Tabelle 15: Nierengewicht/Körpergewicht

Herzgewicht

Geschlecht	Nummer	Placebo	Geschlecht	Nummer	Verum
♀	83	0,12	♀	85	0,11
♀	84	0,16	♀	92	0,12
♀	99	0,13	♀	877	0,11
♀	133	0,11	♀	968	0,11
♀	145	0,09	♂	76	0,13
♀	151	0,11	♂	94	0,12
♀	867	0,11	♂	95	0,12
♀	967	0,12	♂	96	0,15
♂	79	0,12	♂	140	0,14
♂	80	0,12	♂	146	0,11
♂	86	0,12	♂	858	0,13
♂	89	0,14	♂	864	0,12
♂	97	0,15	♂	872	0,12
♂	98	0,13	♂	873	0,12
♂	856	0,12	♂	876	0,12
♂	857	0,14			
♂	866	0,13			
Mittelwert		0,13			0,12
♂ + ♀					

Tabelle 16: Herzgewicht in Gramm

Körpergewicht

Geschlecht	Nummer	Placebo	Geschlecht	Nummer	Verum
♀	83	19,90	♀	85	18,60
♀	84	24,70	♀	92	20,80
♀	99	18,00	♀	877	20,07
♀	133	20,12	♀	968	20,19
♀	145	20,44	♂	76	23,80
♀	151	18,87	♂	94	20,80
♀	867	20,00	♂	95	23,80
♀	967	21,40	♂	96	23,90
♂	79	25,44	♂	140	23,71
♂	80	20,90	♂	146	24,75
♂	86	20,00	♂	858	24,90
♂	89	25,30	♂	864	25,90
♂	97	23,00	♂	872	24,30
♂	98	22,90	♂	873	25,15
♂	856	25,11	♂	876	24,30
♂	857	23,90			
♂	866	22,30			
Mittelwert		21,9			23
♂ + ♀					

Tabelle 17: Körpergewicht in Gramm

8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Martina Andrea Karl, geboren am 26.10.1976 in Straubing, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Therapiestudie über die Wirkung des Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor RO 28-2653 auf das Zystenwachstum bei der polyzystischen Nieren-krankheit von CD1^{pcy/pcy}-Mäusen“

selbst verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet wurden.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen Form noch an keiner anderen Hochschule eingereicht und diente noch keinen sonstigen Prüfungszwecken.

Steinach, im März 2010

(Martina Karl)

9. Danksagung

Ich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Sinowatz der die Durchführung dieser Arbeit in Koopertation mit dem Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Universität Regensburg möglich machte.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Ralph Witzgall für die Überlassung des Themas, die Unterstützung und die Geduld bei der Vollendung dieser Arbeit. Ich möchte mich auch für sein Verständnis und die menschliche und freundliche Art mir gegenüber bedanken

Bei den Verantwortlichen des Tierstalles des Vorklinikums der Universität Regensburg bedanke ich mich für die praxisorientierte und professionelle Anleitung im Umgang mit den Tieren und den Techniken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Brandis, die mich gekonnt in die labortechnischen Arbeitsschritte eingewiesen hat. Auch allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Universität Regensburg möchte ich meinen Dank für die freundliche Aufnahme, die gute Stimmung und die oftmals aufmunternden Worte aussprechen.

Ich danke meinem Ehemann, der mich auch in schwierigen Situationen unterstützte. Weiterhin möchte ich mich bei Cornelia Karl und Kerstin Pietzko für ihre Unterstützung bedanken. Meinem kleinen Sohn Leopold danke ich dafür dass er bei den unsäglichen Attacken auf meinen Computer meine Arbeit nicht gelöscht hat.