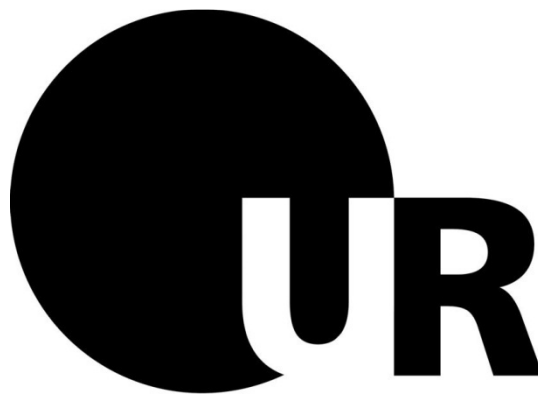


Die Mechanismen der kompensatorischen renalen Hypertrophie



Dissertation

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT FÜR
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT
REGENSBURG

vorgelegt von
Andrea Schreiber
aus Deggendorf

im Jahr 2012

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 22.05.2012

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Frank Schweda

Prüfungskommission: Vorsitzender: Prof. Dr. Richard Warth

1. Prüfer: Prof. Dr. Frank Schweda

2. Prüfer: Prof. Dr. Hayo Castrop

3. Prüfer: Prof. Dr. Jens Schlossmann

Ersatzprüfer: Prof. Dr. Will Minuth

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Aufbau und Funktion der Niere	7
1.1.1 Die Filtration des Primärharns	7
1.1.2 Aufbau und Transportmechanismen des proximalen Tubulus	9
1.2 Die kompensatorische renale Hypertrophie	11
1.3 Die natriuretischen Peptide	15
1.3.1 Synthese des atrialen natriuretischen Peptids	15
1.3.2 Synthese des B-Typ natriuretischen Peptids	16
1.3.3 Der NPR-A und die Bildung des Second Messengers cGMP	17
1.3.4 Regulation und physiologische Wirkungsmechanismen	18
1.4 Zielsetzung der Arbeit	22
2. Methoden	24
2.1 Tierhaltung	24
2.2 Unilaterale Nephrektomie	24
2.3 BNP-Infusion mittels osmotischer Minipumpe	25
2.4 Untersuchung klinischer Parameter	26
2.4.1 Urinanalyse	26
2.4.2 Plasmakonzentrationsbestimmung der natriuretischen Peptide	26
2.4.3 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate	27
2.4.4 Messung des Blutdruckes und der Herzfrequenz	28
2.5 Untersuchung der entnommenen Organe	28
2.5.1 Bestimmung der Protein- und DNA-Konzentration	28
2.5.2 Isolierung der Gesamt-RNA	29
2.5.3 Reverse Transkription der RNA (RT-PCR)	29
2.5.4 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)	29
2.5.5 Western Immunoblotting	30
2.5.6 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung	30
2.6 Isoliert perfundierte Niere	31
2.7 <i>In vitro</i> -Experimente	32
2.7.1 Zellpräparation und -kultivierung	32
2.7.2 Superfusion proximaler Tubuluszellen	33
2.7.3 Stimulation der proximalen Tubuluszellen	33
2.7.4 Bestimmung der Protein- und DNA-Konzentration	34
2.7.5 Bestimmung des Zellvolumens	34

2.7.6	Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung	35
3.	Ergebnisse	36
3.1	Entwicklung der kompensatorischen renalen Hypertrophie bei Wildtypmäusen nach unilateraler Nephrektomie	36
3.1.1	Diurese und Natriurese nach Uninephrektomie	36
3.1.2	Plasmakonzentration der kardialen natriuretischen Peptide	37
3.1.3	Untersuchung der entnommenen Organe	38
3.1.3.1	Genexpression der natriuretischen Peptide und ihre Rezeptoren	39
3.1.3.2	Proteinanalyse	40
3.2	Die kompensatorische renale Hypertrophie bei Guanylatzyklase-A Knockoutmäusen	41
3.2.1	Der Phänotyp der GC-A Knockoutmäuse im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistern	42
3.2.2	Die funktionelle Anpassung der verbleibenden Niere bei GC-A Knockoutmäusen	43
3.2.3	Das kompensatorische Nierenwachstum bei GC-A Knockoutmäusen	45
3.2.4	Bestimmung der Zellfläche von proximalen Tubuli nach Uninephrektomie	47
3.3	Die kompensatorische renale Hypertrophie bei ANP Knockoutmäusen	49
3.4	Die Wirkung des BNPs auf die Funktion und das Wachstum der Nieren	52
3.5	Die Wirkung des BNPs auf die Nierenfunktion am Modell der „isoliert perfundierten Niere“	54
3.6	<i>in vitro</i> – Untersuchungen	56
3.6.1	Charakterisierung der verwendeten Zellmodelle	56
3.6.2	Superfusion von proximalen Tubuluszellen	58
3.6.2.1	Superfusion anderer Nierenzellen	61
3.6.2.2	Die Beteiligung verschiedener Transportproteine des proximalen Tubulus	62
3.6.2.3	Der mTor Signalweg	64
3.6.2.4	Die Rolle des Transforming Growth Factors β	65
3.6.2.5	Transfer des konditionierten Mediums	66
3.6.3	Direkter Effekt natriuretischer Peptide auf die Hypertrophie des proximalen Tubulus	67
4.	Diskussion	69
5.	Zusammenfassung	80
6.	Literaturverzeichnis	82
7.	Anhang	90
7.1	Verwendete Materialien	90

7.1.1	Die Versuchstiere	90
7.1.2	Die Zellen	90
7.1.3	Die Puffer und Lösungen	91
7.1.3.1	Isolierung proximaler Tubuluszellen	91
7.1.3.2	Western Immunoblotting	92
7.1.3.3	Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung	92
7.1.4	Die Oligonukleotide	93
7.1.5	Internetdienste und Software	93
7.2	Abkürzungen	94
7.3	Abbildungsverzeichnis	96
7.4	Danksagung	98

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Niere

Die Niere als zentrales überlebenswichtiges Organ im Körper erfüllt zahlreiche wichtige physiologische Funktionen. Sie scheidet Stoffwechselendprodukte und Giftstoffe aus dem Körper aus, reguliert den Säure- und Basenhaushalt und ist wesentlich an der Einstellung des Blutdruckes beteiligt. Zudem stellt die Niere ein endokrines Organ dar, das unter anderem Erythropoetin, 1,25-(OH)₂-Cholecalciferol (Calcitriol) und Renin bildet. Die Niere der Säugetiere lässt sich in eine außen liegende Nierenrinde (*Cortex renalis*) und ein innen liegendes Nierenmark (*Medulla renalis*) einteilen und besteht aus einer Ansammlung von Nephronen, der funktionell kleinsten Einheit der Niere. Jedes Nephron besteht aus einem kortikalen Nierenkörperchen, in dem der Primärharn vom Blut abfiltriert wird und dem anschließenden Tubulussystem, in dem der Primärharn zum Endharn konzentriert wird. Das Tubulussystem setzt sich aus proximalem Tubulus, Henle-Schleife und distalem Tubulus zusammen. Mehrere distale Tubuli münden in ein Sammelrohr, welches von der Nierenrinde durch das Nierenmark verläuft, wo es sich mit weiteren Sammelrohren vereint. Diese münden schließlich ins Nierenbecken, von welchem der Urin über den Harnleiter in die Harnblase gelangt.

Da bei der kompensatorischen renalen Hypertrophie, dessen Entwicklung im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, vor allem die Filtration des Primärharns im Glomerulus und der proximale Tubulus von Bedeutung sind, werden diese im Folgenden näher erläutert.

1.1.1 Die Filtration des Primärharns

Die Filtration des Primärharns findet im Glomerulus statt, einem Gefäßknäuel zwischen afferenter und efferenter Arteriole, welches von der Bowman-Kapsel umgeben ist. Zwischen dem Glomerulus und der Bowman-Kapsel liegt der Kapselraum, in dem der Primärharn filtriert wird. Die Filtration (siehe Abbildung 1.1) erfolgt über die sogenannte „Blut-Harn-Schranke“, die aus dem gefensterten Endothel der Glomeruluskapillaren, den Podozyten und der dazwischen liegenden Basalmembran gebildet wird. Die Fußfortsätze der einzelnen Podozyten sind ineinander verzahnt und lassen dabei kleine Schlitzfreiräume frei. Durch die Porengröße und die negative Ladung des glomerulären Filters wird das Durchtrittsvermögen bestimmt. Stoffe, die kleiner als 50 kDa und

positiv oder neutral geladen sind, können ungehindert passieren. Die treibende „Kraft“ der Filtration ist der effektive Filtrationsdruck, welcher sich aus dem Blutdruck in den Glomeruluskapillaren abzüglich des Druckes in der Bowman-Kapsel und des onkotischen Druckes im Plasma ergibt.

Das Flüssigkeitsvolumen, das von allen Glomeruli pro Zeiteinheit filtriert wird, wird als glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bezeichnet. Diese entspricht bei einem erwachsenen Menschen etwa 120 ml/min. Um die GFR und den renalen Blutfluss trotz der systemischen Blutdruckschwankungen konstant zu halten, werden diese intrarenal autoreguliert. Dabei sind vor allem der Bayliss-Effekt und der tubuloglomeruläre Feedbackmechanismus zu nennen. Der Bayliss-Effekt beschreibt die intrinsische Fähigkeit der präglomerulären Nierengefäße auf Druckänderungen mit einer Kontraktion oder einer Dilatation zu reagieren. Bei der tubuloglomerulären Rückkopplung handelt es sich um einen parakrinen Signalmechanismus, durch den die Zusammensetzung des Filtrates im distalen Tubulus die GFR beeinflusst. Die in der Wand des distalen Tubulus gelegene Macula densa steht im direkten Kontakt mit dem Glomerulus. Steigt die luminale Salzkonzentration an der Macula densa, so wird die Filtrationsrate am zugehörigen Glomerulus über eine Kontraktion der afferenten Arteriole gesenkt. Neben der intrarenalen Autoregulation wird die GFR über eine Vielzahl von Hormonen und dem vegetativen Nervensystem reguliert, was letztlich auch der Kontrolle des systemischen Blutdruckes dient. Die Regulation der GFR kann sowohl über Änderung des glomerulären Perfusionsdruckes, vorwiegend über die Regulierung des Strömungswiderstandes in der afferenten und/oder der efferenten Arteriole als auch über eine Änderung des Filtrationskoeffizienten erfolgen. Mittlerweile werden auch den Podozyten als kontraktilen Zellen eine aktive Wirkung auf die Regulation der glomerulären Filtration zugeschrieben [8, 9].

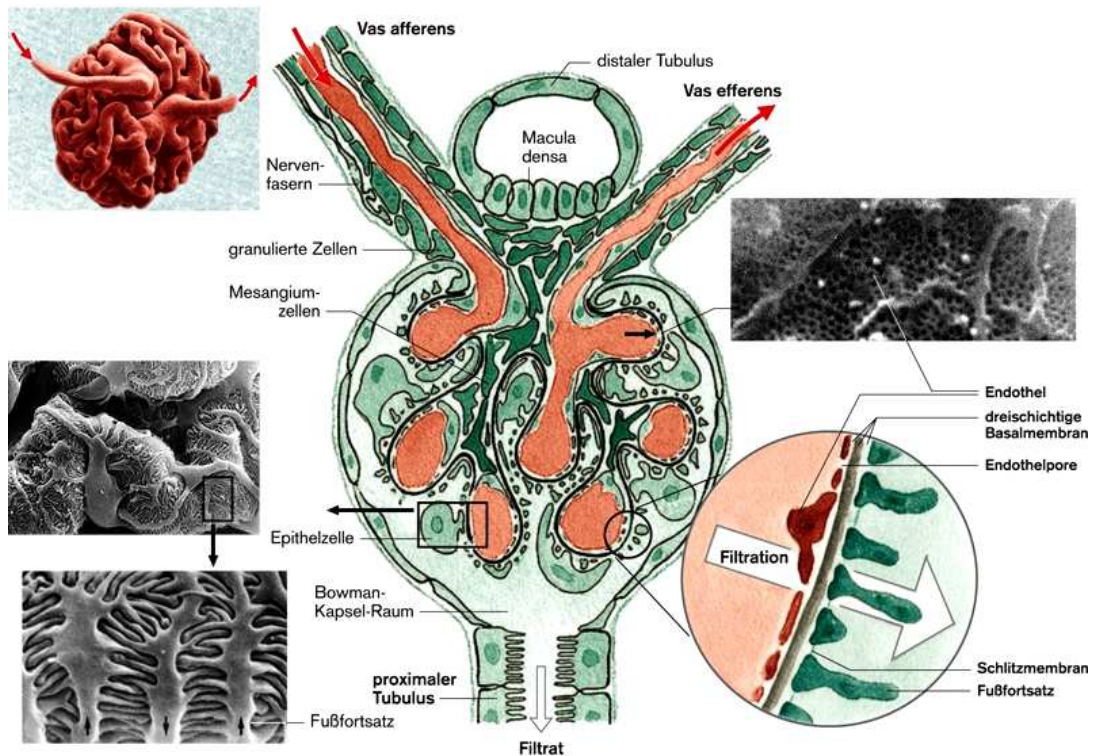


Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung des glomerulären Filters.

(aus R. Klinke, H.-C. Pape, A. Kurtz und S. Silbernagl: Lehrbuch der Physiologie, 6. Auflage)

1.1.2 Aufbau und Transportmechanismen des proximalen Tubulus

Der im Nierenkörperchen filtrierte Primärharn fließt zunächst in den proximalen Tubulus, welcher sich aus einem gewundenen Teil, dem *Pars convoluta*, und einem geraden Teil, dem *Pars recta*, zusammensetzt. Luminal tragen die Epithelzellen einen dichten Bürstensaum und basolateral sind sie ebenfalls tief eingefaltet, wodurch die Oberfläche des proximalen Tubulus auf das 30-60-fache vergrößert wird. Diese beidseitige Oberflächenvergrößerung spiegelt die hohe Transportrate des proximalen Tubulus wider. Zudem sind die proximalen Tubuluszellen mit vielen Mitochondrien nahe der basolateralen Membran besetzt, welche die Na^+/K^+ -ATPase mit ATP versorgen. Das lecke Epithel der Wand des proximalen Tubulus sorgt für eine enge Kopplung der Wasser- und Salzresorption. Im proximalen Tubulus findet ein isoosmolarer Massentransport statt, es werden bereits über 65 % des filtrierten Wassers und des Natriumchlorids resorbiert. Des Weiteren werden Glucose und die meisten Aminosäuren fast vollständig, Kalium, Calcium, Phosphat und Chlorid zu 55-65 % und Bikarbonat zu 95 % in diesem Nephronabschnitt resorbiert. Die Substratresorption ist meist an den Transport von Natriumionen entlang des Na^+ -Konzentrationsgradienten gekoppelt, welcher von der Na^+/K^+ -ATPase bereit gestellt

wird. Diese ist in der basolateralen Membran lokalisiert und pumpt unter ATP-Verbrauch 3 Na⁺ im Austausch gegen 2 K⁺ aus der Zelle und garantiert somit eine geringe intrazelluläre Na⁺-Konzentration. Glucose wird luminal über die Na⁺/Glucose Kotransporter SGLT2 und SGLT1 zusammen mit einem bzw. mit zwei Natriumionen in die Zelle transportiert. Über die Uniportcarrier GLUT1 und GLUT2 diffundiert die luminal aufgenommene Glucose, getrieben vom chemischen Glucosegradienten, aus der Zelle ins peritubuläre Blut. Wie auch Glucose werden die meisten Aminosäuren luminal über Na⁺-gekoppelte Symportcarrier in die proximale Tubuluszelle aufgenommen und passiv über verschiedene Uniporter ins Blut abgegeben. Größere Peptide werden im proximalen Tubulus durch spezifische, rezeptorvermittelte Endozytose resorbiert. Die an den Megalin-Cubilin-Rezeptorkomplex gebundenen Proteine werden über Endozytose in die Tubuluszelle aufgenommen und in den Lysosomen durch Proteasen abgebaut. Über diesen Mechanismus werden auch einige proteingebundene Vitamine, beispielsweise das Calcidiol, welches zum aktiven Hormon Calcitriol hydroxiliert wird, in die proximalen Tubuluszelle aufgenommen. Für bestimmte Di- und Tripeptide gibt es zwei Peptid/H⁺-Symportcarrier, PEPT1 und PEPT2, mit denen sie entlang des in die Zelle gerichteten H⁺-Gradienten aktiv über die Membran transportiert werden. Intrazellulär werden sie in ihre Aminosäuren gespalten. Neben Glucose, Aminosäuren und anderen organischen Substanzen wird auch Phosphat im proximalen Tubulus sekundär-aktiv über den luminalen Na⁺-Symporter NaP_i-IIa transportiert. Dagegen werden Calcium, Magnesium, Chlorid und Kalium in diesem Tubulusabschnitt vorwiegend über einen passiven, parazellulären Transport resorbiert. Die Triebkraft hierfür liefert ein lumenpositives transzelluläres Potenzial. Außerdem finden im proximalen Tubulus Transportprozesse statt, welche im Dienst der Regulation des Säure-Basen-Haushaltes stehen. Intrazelluläre H⁺-Ionen werden sekundär-aktiv über den Antiportcarrier NHE₃ (Na⁺/H⁺-Exchanger, Typ 3) ins Lumen des proximalen Tubulus im Austausch gegen ein Natriumion sezerniert. Zusätzlich befindet sich spätproximal eine primär-aktive H⁺-Pumpe (H⁺-ATPase), welche unabhängig von der Na⁺-Resorption H⁺-Ionen ins Lumen transportiert. Diese H⁺-Ionen stammen aus der Dissoziation von H₂O. Das entstandene OH⁻ reagiert mit CO₂, katalysiert von der zytoplasmatischen Carboanhydrase II, zu HCO₃⁻. Dieses entstandene Hydrogencarbonat verlässt über den basolateralen Symportcarrier NBC-1 (Na⁺-Bikarbonat-Kotransporter) zusammen mit einem Na⁺ die proximale Tubuluszelle. Im proximalen Tubulus finden außerdem Sekretionsmechanismen für organische Verbindungen statt, über die zahlreiche Abfall-, Fremd- und Giftstoffe (Xenobiotika) rasch ausgeschieden werden.

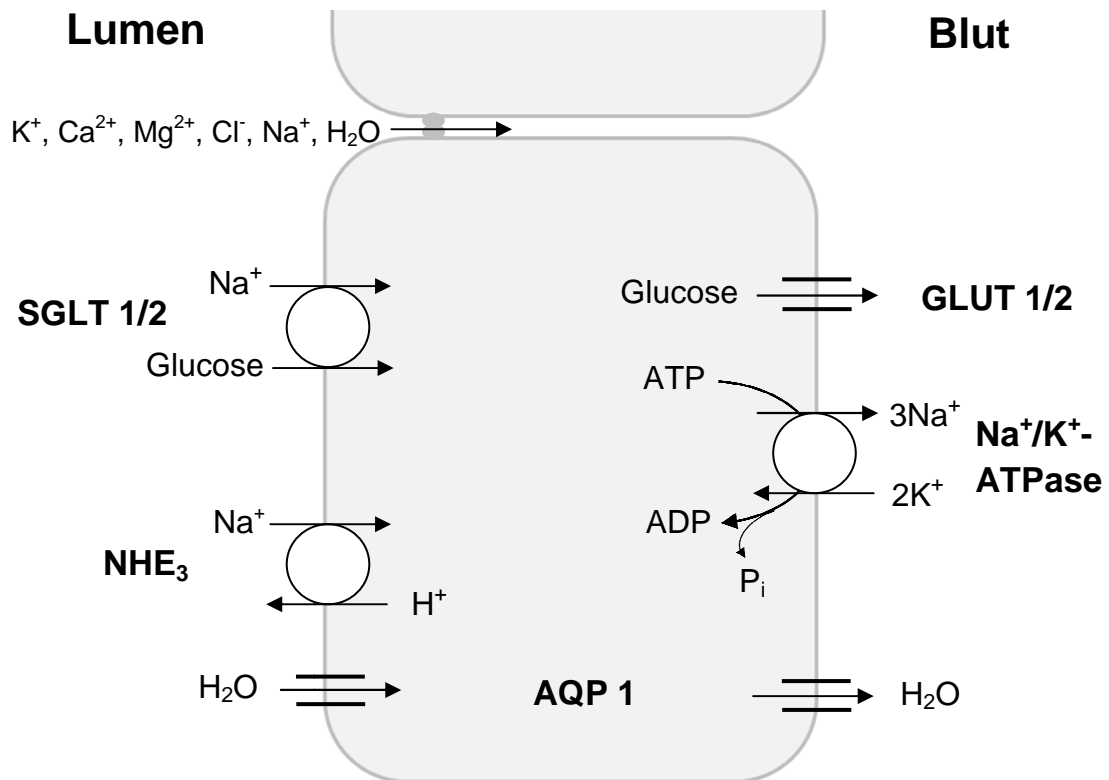


Abbildung 1.2.: Die in dieser Arbeit behandelten Transportprozesse des proximalen Tubulus

1.2 Die kompensatorische renale Hypertrophie

Die paarweise angelegte Niere des Menschen wiegt in etwa 120-200 g, ist im Durchschnitt 12 cm lang, 6 cm breit und 3 cm dick. Die Nierengröße und das -gewicht bleiben für gewöhnlich nach Abschluss des Körperwachstums bei einem Erwachsenen im Laufe seines Lebens konstant. Kommt es allerdings zu einem Verlust von Nierengewebe oder auch der Funktion, ist es dem verbleibenden intakten Nierengewebe möglich, den Verlust zu kompensieren, indem es an Größe zunimmt und die Leistung erhöht. Dieses Phänomen ist schon sehr lange bekannt, bereits Aristoteles (384-322 v.Chr.: *De animalium generatione*) erkannte es. Dieses kompensatorische Nierenwachstum kann durch vielfältige Ursachen ausgelöst werden. So führt neben einem Verlust von funktionsfähigem Nierengewebe auch eine Vielzahl von Nierenerkrankungen zur Zunahme der Größe und der Funktion der kontralateralen Niere. Hier zu nennen sind beispielsweise eine diabetische Nephropathie [10-13], eine ischämische Nierenschädigung [14-18], eine einseitige Hydronephrose, bedingt durch eine Störung im Harnabfluss [19-24] und renale Infektionen und Entzündungen [25-27]. Des Weiteren fördert eine Schwangerschaft [28, 29] und verschiedene Diäten, z.B. eine hohe Proteinaufnahme [30, 31] und eine Kalium-Depletion [32-34], das Wachstum

der Niere. Ein klassisches Beispiel der kompensatorischen Hypertrophie ist die einseitige Entfernung einer Niere (unilaterale Nephrektomie) im Rahmen einer Nierenlebenspende oder einer Tumoroperation. Dabei tritt ein kompensatorisches Wachstum der verbleibenden Niere um etwa 50 % ein. Dieses beruht beim Erwachsenen neben einer Vergrößerung der Glomeruli vor allem auf einer Hypertrophie der proximalen Tubuli [35, 36]. Eine Hypertrophie bezeichnet die Größenzunahme eines Gewebes allein durch Zellvergrößerung und ergibt sich durch vermehrte Synthese von RNA und Protein. Eine Erhöhung der Zellzahl (Hyperplasie) findet dabei nicht statt. Hier unterscheidet sich das kompensatorische Wachstum als Folge von Gewebsverlust beispielsweise von der diabetischen Nephropathie oder des durch die Kalium-Depletion bedingtem Nierenwachstum. Neben einer Hypertrophie kommt es hierbei auch zu einer Hyperplasie [37].

Bei der kompensatorischen renalen Hypertrophie wird abgesehen von der Größe auch die Funktion der kontralateralen Niere gesteigert. Die strukturellen und auch die funktionellen Veränderungen, die sich nach einem Verlust von Nierengewebe ergeben, sind dabei proportional zum entfernten Gewebe [35, 38].

Die funktionelle Anpassung beinhaltet vor allem eine Steigerung der glomerulären Filtrationsrate und eine erhöhte Resorptionsleistung von Natrium im proximalen Tubulus [39]. Dieser gesteigerte Natriumtransport wird durch eine erhöhte Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase sicher gestellt, welche durch eine gesteigerte Synthese von ATP in den Mitochondrien gewährleistet wird [40]. Zudem ist der Na^+/H^+ -Austausch sowie der Glucose- und der Aminosäuretransport im hypertrophierten Tubulus erhöht [35].

Infolge einer einseitigen Nierenentnahme wird die glomeruläre Filtrationsrate der verbleibenden Niere um 70 % gesteigert, so dass eine Filtrationsleistung von insgesamt 85 % erhalten bleibt. Diese enorme Funktionssteigerung ist letztlich die Grundlage für die Möglichkeit der Nierenlebenspende [41]. Durch die kompensatorische Anpassung der verbleibenden Niere ist es dem Nierenspender möglich, ein normales uneingeschränktes Leben zu führen. Auch hat die Nierenentnahme keinen negativen Einfluss auf die Lebenserwartung. Statistisch gesehen leben Nierenspender sogar besser, was wahrscheinlich auf die Zufriedenheit der Spender, etwas Gutes getan zu haben, zurückzuführen ist [42-44].

Das klinisch hoch relevante Phänomen der kompensatorischen renalen Hypertrophie war schon Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, da durch die Aufklärung der Mechanismen die Regulation des Organwachstums auch im erwachsenen Alter besser verstanden werden kann. Zudem könnte ein therapeutischer Ansatz zu Verbesserung der Nierenfunktion gefunden werden. Mittlerweile sind einige intrarenale Prozesse und Hormone, die am kompensatorischen Nierenwachstum beteiligt sind, beschrieben. So

ist bekannt, dass die Entstehung der tubulären Zellhypertrophie auf einem Zellzyklus-abhängigen Mechanismus beruht. Dabei wird dem Transforming Growth Factor β (TGF β), den Zellzyklusproteinen Cyclin D und Cyclin E sowie den Cyclin-Kinase Inhibitoren der Cip/Kip-Familie eine bedeutende Rolle zugeschrieben [45-49]. Die Zellen arrestieren in der G₁-Phase des Zellzyklus, so dass durch Verhinderung des Eintrittes in die Synthese-Phase eine Hypertrophie anstatt einer Proliferation der Zelle ausgelöst wird. Das Fortschreiten des Zellzyklus von der G₁ in die Synthese-Phase wird über die Cycline D und E reguliert. Diese Cycline binden und aktivieren die Cyclin-abhängigen Kinasen (cyclin-dependent kinases, CDKs). In der frühen G₁-Phase wird das Retinoblastom-Protein (Rb) durch den Cyclin D/CDK 4, 6 phosphoryliert. Dieses aktive hypo-phosphorylierte Rb wird somit im Komplex mit dem Transkriptionsfaktor E2F gehalten. Durch eine weitere Phosphorylierung (Hyper-phosphorylierung) des Rbs in der späten G₁-Phase durch Cyclin E/CDK 2 löst sich pRb aus der Komplexierung mit E2F. Der nun aktive E2F veranlasst die Expression der Gene der Synthese-Phase. Bei der tubulären Zellhypertrophie wird der Cyclin D/CDK 4 Komplex zwar aktiviert, aber die Aktivierung von Cyclin E/CDK 2 bleibt aus. Das pRb bleibt im hypo-phosphorylierten Zustand und die DNA-Synthese wird unterdrückt [50]. Die CDKs unterliegen einer negativen Regulation durch Inhibitorproteine, welche in zwei Klassen eingeteilt werden können: die Cip/Kip-Familie mit p21, p27 und p57 und die INK4-Proteine mit p15, p16, p18 und p19. Diese Inhibitorproteine können die Cyclin/CDK Komplexe binden und hemmen. TGF β induziert den Zellzyklusarrest in der G₁-Phase, indem er mit den Cyclin-Kinase-Inhibitoren der Cip/Kip-Familie wechselwirkt [48, 50-52]. Außerdem ist bekannt, dass die Growth Hormone (GH)/Insulin-like Growth Factor1 (IGF1)-Achse eine wesentliche Rolle in der kompensatorischen renalen Hypertrophie spielt. Es konnte gezeigt werden, dass die IGF1-Konzentration im hypertrophierten Nierengewebe von Mäusen und Ratten ansteigt und dieser Anstieg vom Growth Hormone abhängig ist [36]. Zudem hemmt eine Behandlung der Mäuse und Ratten mit einem GH-Rezeptor- oder einem IGF1-Rezeptor-Antagonisten das kompensatorische Nierenwachstum nach unilateraler Nephrektomie [36, 53-55]. Jedoch zeigten sich keine Unterschiede in der Entwicklung der kompensatorischen renalen Hypertrophie zwischen Mäusen mit einer genetischen Deletion von IGF1 und ihren Wildtypgeschwistern [56]. Neben der IGF1-Konzentration ist auch die Konzentration des Epidermal Growth Factors (EGF) [57, 58] und des Hepatocyte Growth Factors (HGF) [59, 60] in der hypertrophierten Niere erhöht. Des Weiteren wurde auch dem Mammalian Target of Rapamycin (mTor)-Signalweg, welcher die Wirkung von Wachstumsfaktoren und Nährstoffen auf die Proteinsynthese und das Zellwachstum vermittelt, eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der kompensatorischen renalen

Hypertrophie zugeschrieben. Schon 30 Minuten nach Uninephrektomie konnte in der verbleibenden Niere von Mäusen eine verstärkte Aktivität des mTor-Signalweges detektiert werden. Außerdem wurde das kompensatorische Nierenwachstum ein oder vier Tage nach Uninephrektomie durch tägliche Applikation des mTor Inhibitors Rapamycin deutlich vermindert [61]. Zudem zeigten Chen et al. im Jahr 2009, dass das Target von mTor, die Serin/Threonin Proteinkinase p70S6 Kinase 1 (S6K1) wesentlich an der Entwicklung der kompensatorischen renalen Hypertrophie beteiligt ist. Bei Mäusen mit Deletion der S6K1 war das kompensatorische Nierenwachstum im Gegensatz zu Wildtypmäusen deutlich vermindert [10].

Trotz dieser Erkenntnisse ist der initiale Mechanismus, der den Funktionsverlust an das gesunde Gewebe vermittelt und somit die kompensatorische Hypertrophie der Niere auslöst, immer noch unbekannt. Nach der „workload“-Hypothese initiiert die tubuläre Mehrbelastung als Konsequenz der erhöhten glomerulären Filtrationsrate die Hypertrophie des proximalen Tubulus [35]. Durch welche Faktoren die glomeruläre Filtrationsrate nach Uninephrektomie gesteigert wird, ist jedoch nicht gesichert. Allerdings wird seit den 60er Jahren, basierend auf Versuchen an parabiotischen Mäusen (zwei in einem Kreislauf vereinigte Tiere), die Existenz eines zirkulierenden Faktors postuliert [62, 63]. Diese Erkenntnis wurde durch weitere *in vivo*- und *in vitro*-Studien gestützt. Beispielsweise führte eine Inkubation von Nierenschnitten mit Plasma von 24-Stunden uninephrektomierten Ratten zu einer Zunahme des Trockengewichtes und des Proteingehaltes [64]. Auch zeigten Harris und Best durch Re-Infusionsstudien von Urin an Ratten, dass der zirkulierende Hypertrophie-auslösende Faktor über die Niere ausgeschieden wird [65]. Zudem ist bekannt, dass weder die Hypophyse noch andere endokrine Drüsen, wie der Nebenniere oder der Schilddrüse, an der Entwicklung der kompensatorischen renalen Hypertrophie beteiligt sind [35, 66]. Des Weiteren kann die renale Innervierung als Auslöser ausgeschlossen werden. Eine Denervierung der verbleibenden Niere unmittelbar nach Uninephrektomie hatte keinen inhibitorischen Einfluss auf das kompensatorische Nierenwachstum [63, 67].

In Anbetracht der gegebenen Kennzeichen der kompensatorischen Hypertrophie, wurde eine Beteiligung der natriuretischen Peptide in Erwägung gezogen. Diese, insbesondere die kardialen natriuretischen Peptide, stimulieren als zirkulierende Hormone die glomeruläre Filtrationsrate sowie die Diurese und Natriurese, womit die kompensatorische renale Hypertrophie einhergeht. Im Folgenden werden die natriuretischen Peptide hinsichtlich ihres Aufbaus, ihrer Synthese und ihres Signalweges näher beschrieben.

1.3 Die natriuretischen Peptide

Anfang der 80er Jahre zeigte eine Studie, dass eine Injektion von Extrakten aus atrialen Myozyten bei Ratten zu einer deutlichen Natriuresis und Diuresis führt [68, 69]. Als auslösenden Faktor identifizierten Flynn et al. zwei Jahre später das atriale natriuretische Peptid (ANP) [70]. In den folgenden Jahren konnten vier weitere natriuretische Peptide, das „B-Typ natriuretische Peptid“ (BNP), das C-Typ natriuretische Peptid (CNP), das Urodilatin und das erst kürzlich entdeckte „Dendroaspis natriuretische Peptid“ (DNP) nachgewiesen werden. Das natriuretische Peptidsystem stellt ein endokrines, parakrines und autokrines System dar, das wesentlich an der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes beteiligt ist und somit auch eine zentrale Rolle in der Regulation des systemischen Blutdruckes spielt. Alle natriuretischen Peptide weisen eine ähnliche Struktur auf. Sie besitzen eine 17-AS-Ringstruktur, die über eine Disulfidbrücke geschlossen ist. Die N-terminale wie auch C-terminale Aminosäurekette variiert in Länge und Sequenz zwischen den einzelnen natriuretischen Peptiden [71]. Die natriuretischen Peptide binden mit unterschiedlicher Affinität an membrangebundene Rezeptoren, die natriuretischen Peptidrezeptoren A, B und C, über die sie ihre physiologischen Effekte ausüben. ANP und BNP werden hauptsächlich in den Kardiomyozyten der Atrien und Ventrikel gebildet, weshalb sie als kardiale Hormone bezeichnet werden. Im Folgenden werden die Synthese, die Sekretion und die physiologischen Funktionen dieser kardialen Botenstoffe näher betrachtet.

1.3.1 Synthese des atrialen natriuretischen Peptids (ANP)

Das für ANP codierende Gen, NPPA, befindet sich beim Menschen auf Chromosom 1, bei der Maus auf Chromosom 4 und wird in vielen Geweben des Körpers exprimiert, wobei die atrialen Kardiomyozyten die höchste Expressionsrate aufweisen. Aus diesem Grund wird ANP auch als atriales natriuretisches Peptid deklariert. NPPA setzt sich aus 2075 Basenpaaren zusammen, die in drei Exons und zwei Introns organisiert sind. Die 840 bp große mRNA wird zunächst in das ANP Vorläuferpeptid prä-proANP aus 151 Aminosäuren translatiert. Durch Abspaltung von 25 Aminosäuren am N-terminalen Ende wird proANP gebildet, welches bis zu seiner Freisetzung in sekretorischen Granula vor allem der atrialen Myozyten gespeichert wird. Infolge eines entsprechenden Reizes wird das proANP durch die Serinprotease Corin weiter in ein N-terminales Fragment, das NT-proANP, und in das C-terminale biologisch aktive ANP gespalten und sezerniert [72]. In der Niere wird zudem ein weiteres Peptid aus NT-

proANP synthetisiert, das Urodilatin, welches an der lokalen Regulation der renalen Salz- und Wasserausscheidung beteiligt ist. Urodilatin ist dem ANP nahezu identisch, es besitzt am N-terminalen Ende jedoch vier zusätzliche Aminosäuren.

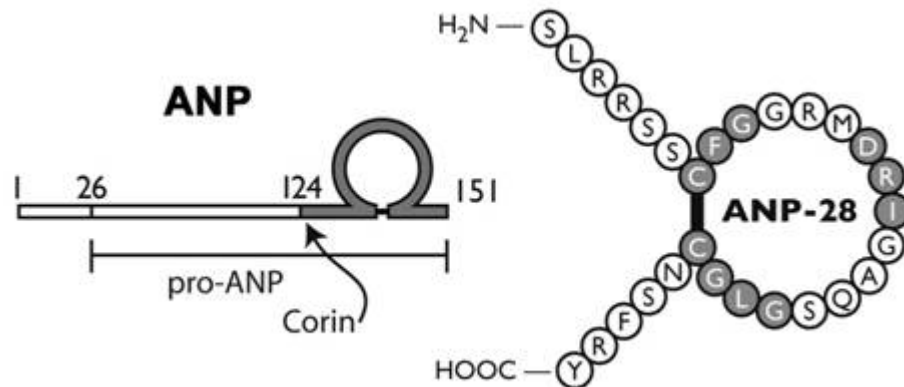


Abbildung 1.3.: Die Struktur des atrialen natriuretischen Peptids
(modifiziert nach Potter et al., 2006) [2]

1.3.2 Synthese des B-Typ natriuretischen Peptids (BNP)

Im Jahr 1988 wurde erstmals das B-Typ natriuretische Peptid aus dem Schweinehirn isoliert, weshalb dieses Peptid als „Brain natriuretisches Peptid“ bezeichnet wurde. Die Synthese von BNP erfolgt jedoch vor allem in den kardialen Myozyten und beginnt mit der Transkription des für BNP codierenden Gens, NPPB (1466 bp). Dieses ist ebenfalls beim Menschen auf Chromosom 1 und bei der Maus auf Chromosom 4 lokalisiert und in drei Exons und zwei Introns organisiert. Die transkribierte 691 bp große mRNA wird zunächst in das prä-proBNP aus 134 Aminosäuren translatiert, welches durch Abspaltung von 26 Aminosäuren in das proBNP umgewandelt wird. Zusammen mit proANP wird proBNP in den atrialen Granula gespeichert und vor Sekretion in das N-terminale inaktive NT-proBNP und das biologisch aktive BNP gespalten [72]. In den Ventrikeln wird proBNP nicht gespeichert, sondern dort wird die Produktion direkt auf Transkriptionsebene reguliert, wobei eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors GATA 4 beschrieben ist [2]. Im Gegensatz zu ANP variiert das aktive BNP in seiner Aminosäurenlänge zwischen den verschiedenen Spezies. Das BNP des Menschen, des Schweines und des Hundes besteht aus 32 Aminosäuren, das der Maus und der Ratte dagegen aus 45 Aminosäuren [73-75]. Die Plasmakonzentration des BNP liegt beim gesunden Menschen in 10-fach geringerer Konzentration als ANP vor, bei etwa 1 fmol/ml. Bei Patienten mit kardiovaskulärer Erkrankung oder einem chronischen Nierenversagen ist die Konzentration dagegen um das 100-fache erhöht [2]. Diese große Spanne macht BNP zu einem idealen Indikator kardiovaskulärer Belastung. Da BNP bzw. die NT-proBNP Plasmakonzentration mit dem Schweregrad einer

Herzinsuffizienz korreliert, stellen sie wichtige Parameter für die Diagnostik und die Verlaufskontrolle dar.

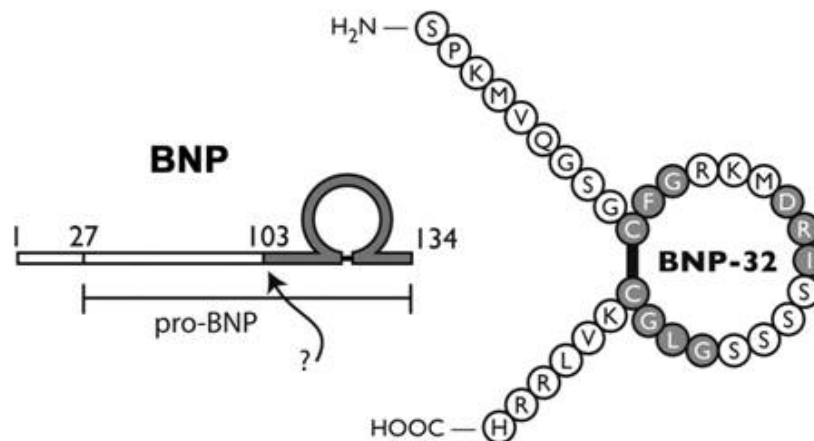


Abbildung 1.4.: Die Struktur des humanen B-Typ natriuretischen Peptids
(modifiziert nach Potter et al., 2006) [2]

1.3.3 Der NPR-A und die Bildung des Second Messengers cGMP

ANP und BNP entfalten ihre biologische Wirkung über Aktivierung des natriuretischen Peptidrezeptors-A (NPR-A), der zur Familie der membranständigen Guanylatzyklen (GCs) zählt. Aufgrund dessen wird der NPR-A auch als Guanylatzyklase-A (GC-A) deklariert. Die GC-A ist in vielen Geweben des Körpers, insbesondere aber in der Niere, der Nebenniere, in den Blutgefäßen und im Herz, exprimiert [76]. Sie besteht aus 1061 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 130 kDa. Alle membranständigen GCs bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer Transmembran-Domäne und einer Intrazellulärregion, welche sich aus einer Kinase-Homologiedomäne, einer amphipathischen Gelenkregion und der C-terminalen katalytischen Guanylatzyklase-Domäne zusammensetzt. Der Rezeptor kann in drei Zuständen vorliegen: basal, aktiv und desensibilisiert. Im basalen Zustand, also in Abwesenheit des Liganden, liegt NPR-A als Homodimer oder Homotetramer vor, ist phosphoryliert und seine Zyklaseaktivität unterdrückt. Die Bindung des Liganden ANP oder BNP bewirkt eine Konformationsänderung in der extrazellulären Domäne, wodurch das Signal über die Membran zu der intrazellulären Domäne geleitet wird. Durch die daraus resultierende Zusammenlagerung der Zyklase-Domänen kann das aktive Zentrum gebildet und der sekundäre Botenstoff zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) gebildet werden. Eine langanhaltende Ligandenbindung

stimuliert die Dephosphorylierung des Rezeptors, was zu einer Reduktion der Aktivität, als Desensibilisierung bezeichnet, führt [2].

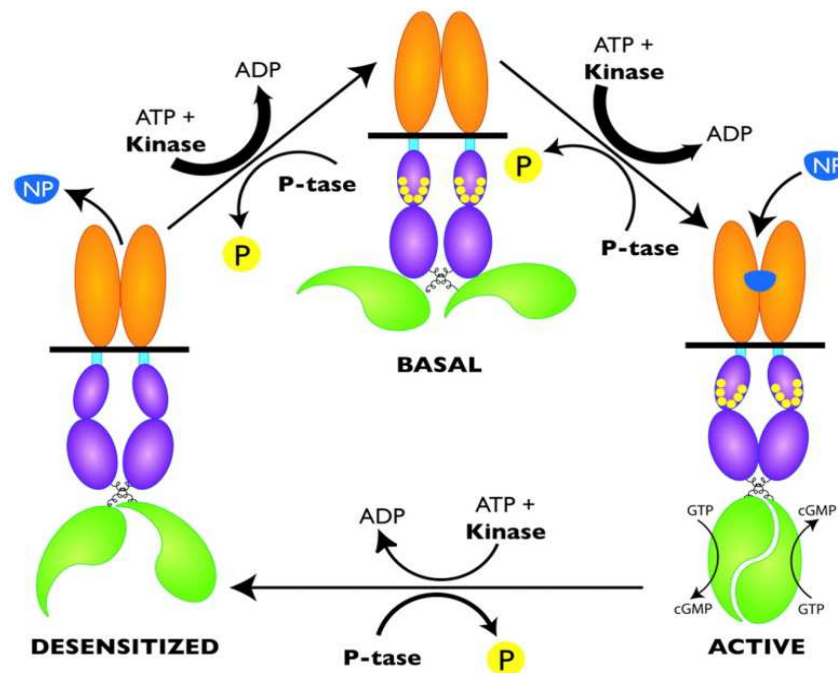


Abbildung 1.5.: Schematische Darstellung der Aktivierung der GC-A (Potter et. al, 2006 [2])

Die physiologischen Effekte von ANP und BNP werden durch die Synthese des intrazellulären Second Messengers cGMP ausgelöst. Es gibt drei bekannte cGMP-bindende Proteinfamilien: die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), die cGMP-bindenden Phosphodiesterasen (PDEs) und die cyclic nucleotide-gated (CNG)-Ionenkanäle. Die am meisten untersuchten cGMP-abhängigen Effekte werden durch die PKGs vermittelt. Es handelt sich dabei um Serin- und Threoninkinasen, die durch Bindung von cGMP aktiviert werden [77]. Auch die PDEs regulieren die Effekte des intrazellulären sekundären Botenstoffe, da sie cGMP degradieren und dadurch die Konzentration regulieren [78].

1.3.4 Regulation und physiologische Wirkungsmechanismen

Die Aktivität des ANP- und des BNP-Gens unterliegt mechanischen als auch zahlreichen hormonellen Einflüssen, wobei die Dehnung der Myokardzellen durch Druck- oder Volumenbelastung den Hauptstimulus darstellt [79]. Unter anderem stimulieren Endothelin-1 [80, 81], Katecholamine [82, 83], Glukokortikoide [84], Angiotensin II [85, 86], AVP [87] und einige Zytokine [88, 89] die Bildung und Sekretion von ANP und BNP. Die Konzentration der natriuretischen Peptide wird nicht nur über

ihre Synthese und Freisetzung reguliert, auch die Eliminierung aus dem Plasma spielt eine zentrale Rolle. Der Abbau der natriuretischen Peptide findet hauptsächlich über zwei Mechanismen statt. Einerseits über Bindung an den als Clearance-Rezeptor fungierenden natriuretischen Peptidrezeptor-C (NPR-C), der die natriuretischen Peptide aus dem Blutkreislauf oder dem extrazellulären Raum durch Internalisierung und Degradation eliminiert [90]. Neben dem rezeptorvermittelten Abbau werden die natriuretischen Peptide auch durch die membrangebundene, Zink-abhängige neutrale Endopeptidase 24.11 (NEP) abgebaut. Diese ist vor allem in der Niere, im Endothel, im Gehirn, in den Hoden und in der Lunge lokalisiert. In der Niere ist die NEP hauptsächlich im Bürstensaum der proximalen Tubuli exprimiert [91, 92]. Über diese beiden Mechanismen erfolgt eine relativ schnelle Eliminierung der natriuretischen Peptide aus dem Plasma. Die verschiedenen Affinitäten zum Clearance-Rezeptor und zur NEP spiegeln die unterschiedlichen biologischen Halbwertszeiten von ANP und BNP wider. Die HWZ des ANPs mit höchster Affinität liegt bei etwa 3 Minuten, die des BNPs dagegen mit niedrigerer Affinität bei circa 20 Minuten [93, 94].

ANP und BNP haben vor allem natriuretische, diuretische und vasodilatorische Wirkungen und sind somit wesentlich an der Regulation des Blutvolumens und des Blutdruckes beteiligt. Untersuchungen an Knockoutmausmodellen belegen die enorme Bedeutung dieses Hormon-Rezeptorsystems für die Regulation der Harn- und Salzausscheidung sowie des arteriellen Blutdruckes. Mäuse mit einer Deletion des ANP Gens (ANP $-/-$) oder dessen Rezeptor (GC-A $-/-$) sind hypertensiv, zeigen ein erhöhtes Blutvolumen und eine kardiale Hypertrophie [95-98]. Im Gegensatz dazu führt eine Überexpression von ANP und der GC-A zu einer Dosis-abhängigen Steigerung der Harn- und Salzausscheidung und zur Senkung des arteriellen Blutdruckes [99, 100]. Auch eine erhöhte Plasmakonzentration von BNP durch Applikation synthetischen BNPs oder durch genetisch veränderte Überexpression bewirken bei Mäusen eine Hypotonie sowie eine gesteigerte Diurese und Natriurese [74, 101]. Jedoch entwickeln Mäuse mit Deletion des BNP Gens einen anderen Phänotyp als ANP Knockoutmäuse. Statt zu einer Hypertonie und kardialer Hypertrophie führt die BNP Defizienz zu einer ventrikulären Fibrose [5].

Die natriuretischen Peptide wirken auf eine Vielzahl von Geweben und sind über Aktivierung der GC-A an zahlreichen Prozessen im Körper beteiligt, welche in Abbildung 1.6 zusammenfassend dargestellt sind:

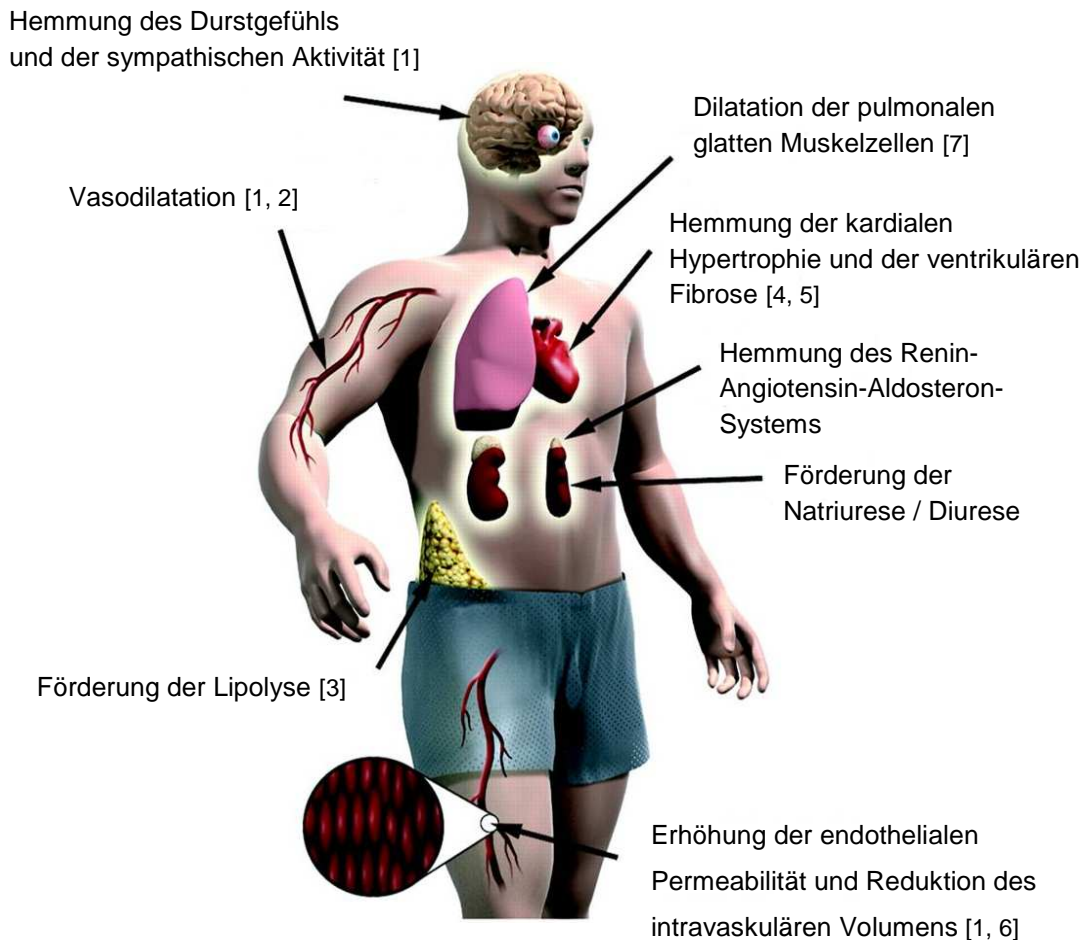


Abbildung 1.6.: Physiologische Wirkung der natriuretischen Peptide ANP und BNP (modifiziert nach Potter et. al, 2006 [2])

In Anbetracht der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Beteiligung an der kompensatorischen Hypertrophie der Niere, wird im Folgenden genauer auf die renalen Wirkungen der natriuretischen Peptide eingegangen.

In der Niere stimulieren sie über Aktivierung der GC-A die Diurese und Natriurese, was durch zahlreiche Infusionsstudien an Menschen und Hunden belegt wurde. Schon unmittelbar nach Beginn einer kontinuierlichen Applikation von ANP und BNP nimmt die Harn- und Salzausscheidung stark zu [102-107].

Sowohl ANP als auch BNP erhöhen die glomeruläre Filtrationsrate. Dies geschieht vorwiegend über Veränderung der renalen Hämodynamik, indem die natriuretischen Peptide durch Dilatation der afferenten und/oder Konstriktion der efferenten Arteriole den Druck in den Glomeruluskapillaren steigern [108, 109]. Infusionen von BNP beim Menschen in einer Konzentration von 2 oder 4 pmol/kg/min zeigen, dass die GFR schon während einer 60-minütigen Infusion signifikant um 20 % erhöht wird [104, 105]. Des Weiteren wird die Diurese und Natriurese direkt durch Hemmung der

Rückresorption von Natrium im Tubulussystem gefördert. ANP wirkt dabei vor allem auf den proximalen Tubulus und auf das Sammelrohr [104, 110, 111]. BNP hemmt dagegen die Natriumresorption vorzugsweise in den distalen Segmenten des Nephrons, aber auch eine Wirkung auf den proximalen Tubulus konnte gezeigt werden [104, 105]. Weiterhin gelten ANP und BNP als zentrale Gegenspieler des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, welches durch Aktivierung eine Steigerung des Blutvolumens und des Blutdruckes bewirkt. Sie hemmen die Synthese und Freisetzung sowohl von Renin in der Niere als auch von Aldosteron in der Nebenniere [112-114]. Mittlerweise gibt es zahlreiche Veröffentlichungen, die den therapeutischen Nutzen der natriuretischen Peptide diskutieren. Beispielsweise zeigen Studien, dass eine Infusion von rekombinanten ANP (Anaritide®) in Patienten mit Bluthochdruck [115], chronischer Herzinsuffizienz [102, 103] oder einem ischämischen Nierenversagen [116] die Nierenfunktion verbessert und den Blutdruck vermindert. Humanes rekombinantes BNP (Nesiritide®) ist in den USA zur Behandlung der Herzinsuffizienz zugelassen [117-119]. Neben dem therapeutischen Einsatz stellt die Verwendung der natriuretischen Peptide als diagnostische Marker einen weiteren Nutzen in der Klinik dar. Sowohl die ANP als auch die BNP Konzentration ist im Plasma von Patienten, die an einer Herzinsuffizienz, einer Hypertonie oder einem chronischen Nierenversagen leiden, stark erhöht [120-124]. Mittlerweile wird die Bestimmung der Plasmakonzentration von BNP oder dem stabileren NT-proBNP generell in der Klinik genutzt [122, 123].

Da die natriuretischen Peptide eine fördernde Wirkung auf die Natriurese / Diurese und die glomeruläre Filtrationsrate haben und infolge einer Nierenerkrankung im Plasma erhöht sind, wurde eine Beteiligung dieser bei der kompensatorischen renalen Hypertrophie in Betracht gezogen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Trotz jahrzehntelanger Forschung ist immer noch unklar, durch welchen Mechanismus die kompensatorische renale Hypertrophie infolge des Verlustes von funktionsfähigem Nierengewebe ausgelöst wird. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Signalweg untersucht werden, der initial der verbleibenden Niere den Verlust vermittelt und diese zum Wachstum und zur Funktionssteigerung anregt. Dieses Phänomen ist klinisch hoch relevant und letztlich die Grundlage für die Möglichkeit der Nierenlebendspende. Infolge einer einseitigen Nephrektomie wird die glomeruläre Filtrationsrate der verbleibenden Niere um 70 % gesteigert, so dass eine Filtrationsleistung von insgesamt 85 % erhalten bleibt. Diese Nierenfunktion reicht für ein normales uneingeschränktes Leben nach einer Nierenspende aus. Die Aufklärung der Mechanismen, die zur kompensatorischen Hypertrophie führen, könnten nicht nur neue Erkenntnisse in der Regulation des Organwachstums ermöglichen, sondern möglicherweise auch therapeutisch angewendet werden, um die Nierenfunktion zu verbessern.

Die funktionelle Anpassung der verbleibenden Niere beinhaltet vor allem eine Zunahme der glomerulären Filtrationsrate und der Diurese / Natriurese. Zudem ist die Existenz eines zirkulierenden Faktors als Auslöser der kompensatorischen renalen Hypertrophie beschrieben. Aufgrund dessen stellte sich die Frage, ob die natriuretischen Peptide, welche als zirkulierende Hormone sowohl an der Regulation der GFR als auch an der Diurese / Natriurese beteiligt sind, das kompensatorische Nierenwachstum vermitteln. Dazu wurden zunächst uninephrektomierte Wildtypmäuse hinsichtlich ihrer Konzentration an natriuretischen Peptiden im Plasma untersucht und mit „zum Schein“-operierten Kontrollmäusen verglichen. Außerdem wurde die Genexpression der natriuretischen Peptide im Herzen und deren Rezeptoren in der verbleibenden Niere bestimmt. Darüber hinaus wurde in Studien an Mäusen mit genetischer Deletion des natriuretischen Peptidrezeptors-A (GC-A Knockoutmäuse) eine Beteiligung der natriuretischen Peptide an der Entwicklung der kompensatorischen renalen Hypertrophie überprüft. Dazu wurde das kompensatorische Wachstum und die funktionelle Anpassung der verbleibenden Niere infolge einer unilateralen Nephrektomie in einem Zeitverlauf bei Wildtypmäusen und GC-A Knockoutmäusen untersucht. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die natriuretischen Peptide möglicherweise therapeutisch zur Verbesserung der Nierenfunktion einsetzbar sind.

Gemäß der populären „workload“-Hypothese könnte die Hypertrophie des proximalen Tubulus durch die erhöhte tubuläre Beladung, welche sich durch die gesteigerte GFR ergibt, initiiert werden. Zellkulturstudien mithilfe eines selbst entwickelten *in vitro*-Flusssystemes soll diese Hypothese bestätigen und den beteiligten Mechanismus identifizieren.

2. Methoden

2.1 Die Tierhaltung

Die Mäuse hatten über den gesamten Versuchszeitraum freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter und wurden bei gleich bleibender Raumtemperatur und 12-stündigen Hell-Dunkel-Intervallen gehalten.

2.2 Unilaterale Nephrektomie (UNx)

Nach Einleitung einer Inhalationsnarkose mit Sevofluran erfolgte die unilaterale Nephrektomie auf einem beheizbaren Operationstisch mit sterilem Operationsbesteck. Nachdem das Operationsfeld großflächig desinfiziert wurde, erfolgte ein ca. 1 cm langer Hautschnitt entlang der linken Flanke. Über einen kleinen Schnitt der Muskelschicht wurde die Körperhöhle eröffnet, die linke Niere aus dem Retroperitoneum mobilisiert und vorsichtig freipräpariert. Anschließend wurde der Harnleiter durchtrennt und Nierenarterie und -vene über eine Ligatur verschlossen. Die Niere wurde entnommen, gewogen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Zum Wundverschluss wurde die Muskelschicht genäht und die Hautschicht mit Wundklammern verschlossen. Die Operationsdauer betrug in etwa 15 Minuten.

Als Kontrolltiere dienten „zum Schein“-operierte Tiere (Sham), um einen vergleichbaren Operationsstress zu erzeugen. Das Operationsprotokoll war gleich dem der unilateralen Nephrektomie, allerdings wurde nach vorsichtiger Freipräparation der linken Niere weder Harnleiter noch Nierengefäße durchtrennt bzw. verschlossen.

2.3 BNP-Infusion mittels osmotischer Minipumpe

Um eine kontinuierliche Abgabe von BNP zu gewährleisten, wurden den Wildtypmäusen osmotische Minipumpen (Alzet, Model 2001) eingesetzt. Die Pumpen bestehen aus einer semipermeablen äußeren Membran, einer Salzhülle und einer inneren impermeablen Membran, die das Reservoir umschließt. Fließt Wasser bedingt durch Osmose zur Salzhülle wird die im flexiblen Reservoir befindliche Lösung verdrängt.

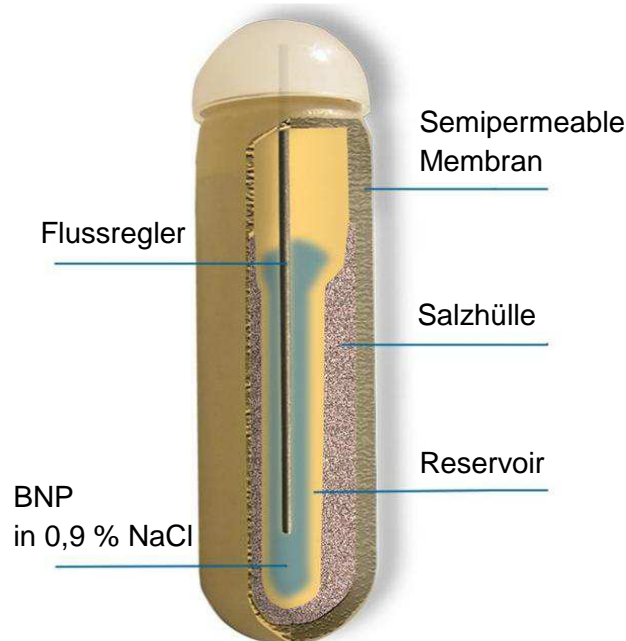


Abbildung 2.1.: Aufbau einer osmotischen Minipumpe (modifiziert nach <http://www.alzet.com>).

Vor Implantierung der osmotischen Pumpen wurden die Reservoirs mit BNP (Phoenix Pharmaceuticals) in 0,9 % NaCl so gefüllt, dass eine konstante Abgabe von 2 ng pro g KG in einer Stunde gewährleistet war. Die Kontrolltiere erhielten auf gleiche Weise 0,9 % NaCl. Die Pumpen wurden subkutan am Rücken in einer Sevoflurannarkose implantiert. Dazu wurde die Haut durch einen ca. 1 cm langen Schnitt eröffnet, die Haut von darunterliegendem Muskelgewebe getrennt und eine subkutane Tasche geformt, in welche die Pumpe platziert wurde. Die Haut wurde abschließend mit Wundklammern verschlossen.

2.4 Untersuchung klinischer Parameter

2.4.1 Urinanalyse

Die Versuchstiere wurden zur Bestimmung des Urinvolumens und der Elektrolytausscheidung in metabolischen Käfigen untergebracht. In einem 24-Stunden-Rhythmus wurde der Urin insgesamt zweimal entnommen. Die Bestimmung der Natrium- und Kaliumkonzentration erfolgte mithilfe der Flammenphotometrie (Jenway Ltd.).

2.4.2 Plasmakonzentrationsbestimmung der natriuretischen Peptide

Zur Bestimmung der Konzentration der natriuretischen Peptide ANP und BNP wurden die Versuchstiere nach kurzer Narkotisierung mit Sevofluran dekapitiert. Das Blut wurde mit 2 mg/ml EDTA und 1 % Aprotinin (30 TIU, Phoenix Pharmaceuticals) als Proteaseinhibitor versehen und bei 1600 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Von jeder Blutprobe wurde die gleiche Menge an Plasma gesammelt und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Die Peptidextraktion aus dem Plasma erfolgte mithilfe von C18-Sep-Columns (Phoenix Pharmaceuticals). Zunächst wurde das Plasma mit 1 Vol. Puffer A (Phoenix Pharmaceuticals) angesäuert, bei 10000 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert und auf die mit Puffer B (Phoenix Pharmaceuticals) zuvor equilibrierten Säulen gegeben. Die nun an der Säulenmembran gebundenen Peptide wurden dreimal mit Puffer A gewaschen. Anschließend wurden die Peptide mit 3 ml Puffer B in ein Röhrchen aus Polystyrol eluiert, in flüssigen Stickstoff gefroren und in einer Lyophylle über Nacht getrocknet. Die Bestimmung der ANP und BNP Konzentration erfolgte mithilfe eines Enzym-Immunoassay-Kits (EIA, Phoenix Pharmaceuticals) gemäß dem Herstellerprotokoll. Dazu wurde das getrocknete Extrakt mit 200 µl EIA-Puffer gelöst und für die zwei verschiedenen Messungen aufgeteilt. Jede Probe wurde doppelt bestimmt. Generell ist die Immunplatte des Kits mit einem sekundären Antikörper beschichtet. Dieser interagiert mit dem primären Antikörper, an den das in der Probe enthaltene Zielpeptid und das biotinylierte Peptid binden. Das biotinylierte Peptid interagiert wiederum mit der Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (SA-HRP), welche die Substratbildung katalysiert. Die entstehende Farbintensität ist direkt proportional zu der Menge des biotinyliertem Peptid-SA-HRP-Komplexes aber indirekt proportional zum Zielpeptid. Die ANP bzw. BNP-Konzentration in der Probe wurde mithilfe einer Standardkurve aus bekannten Konzentrationen bestimmt.

2.4.3 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate

Die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate erfolgte mithilfe der „Single-Shot Clearance“-Methode [125] am wachen Tier unter Verwendung von FITC-markiertem Sinistrin (Mannheim Pharma & Diagnostics). Sinistrin, ein in den Zwiebeln von *Urginea maritima* vorkommendes Polysaccharid, stellt einen geeigneten GFR-Marker dar und wird auch klinisch zur Bestimmung der GFR verwendet (Inutest®) [126-128]. Sinistrin wird in den Glomeruli frei filtriert und im Tubulus weder resorbiert noch sezerniert und wird vollständig renal durch glomeruläre Filtration ausgeschieden. Während einer kurzen Betäubung mit Isofluran wurde der Maus eine FITC-Sinistrin-Lösung im Volumen von 3,74 µl pro g Körpergewicht retrobulbär injiziert. Diese wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt und bestand aus 1,5 % FITC-Sinistrin in 0,9 % NaCl. 3, 7, 10, 15, 35, 55 und 75 Minuten nach dieser Injektion wurde aus der Schwanzvene Blut entnommen, in Na⁺-heparinisierte Kapillaren überführt und anschließend bei 12000 g für 7 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde 1:10 mit 0,5 M HEPES (pH 7,4) verdünnt und die Fluoreszenz bei einer Anregung von 480 nm und einer Emission von 520 nm vermessen. Die GFR-Berechnung erfolgte unter Verwendung des 2-Kompartiment-Modells. Die Konzentrations-Zeitkurve (Abbildung 2.1) stellt dabei zwei exponentielle Abfälle des verabreichten FITC-Sinistrins dar: ein erster schneller Abfall, gekennzeichnet durch die Umverteilung des Tracers vom intravaskulären in den extrazellulären Raum und eine durch die renale Ausscheidung langsamere Abnahme der Markerkonzentration. Die GFR ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$GFR = I / (A/\alpha + B/\beta)$$

Dabei stellt I die Menge des injizierten FITC-Sinistrins dar. A bzw. B ergibt sich aus dem Schnittpunkt des jeweiligen Graphen der Exponentialfunktion mit der y-Achse und α bzw. β sind die Senkungskonstanten des jeweiligen exponentiellen Abfalls.

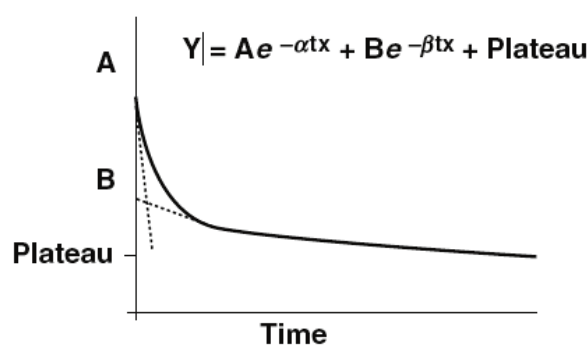


Abbildung 2.2.: Konzentrations-Zeitkurve der „Single-Shot Clearance“-Methode [129]

2.4.4 Messung des Blutdruckes und der Herzfrequenz

Der systolische arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz wurden nicht-invasiv mittels der „tail-cuff“-Methode (TSE, Deutschland) am wachen Tier an sechs aufeinander folgenden Tagen gemessen [130]. Vor der ersten Messung wurden die Versuchstiere für fünf Tage an den Versuchsablauf gewöhnt.

2.5 Untersuchung der entnommenen Organe

Nach Versuchsende wurden die Tiere getötet. Die entnommenen Organe wurden gewogen, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.1 Bestimmung der Protein- und DNA-Konzentration

Eine halbe Niere wurde mit 1 ml H₂O homogenisiert und anschließend bei -80 °C schockgefroren. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mithilfe des „Blue Fluorometric dsDNA Quantitation Kits“ von Invitrogen gemäß dem Herstellerprotokoll. 100 µl der homogenisierten Nierensuspension wurde mit 100 µl Fluoreszenzreagenz aus 0,25 % Hoechst 33258 in TNE-Puffer vermischt und anschließend bei einer Anregung von 360 nm und einer Emission von 460 nm gemessen. Die DNA wurde mithilfe einer bekannten Konzentrationsstandardkurve quantifiziert.

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das „Protein Quantification Kit“ von Machery Nagel verwendet. Das Homogenisat wurde 1:10 mit Protein Solving Buffer (PSB) verdünnt und zur besseren Lösung der Proteine für 3 Minuten bei 95 °C gekocht. Nachdem 20 µl davon in ein Well einer 96-Wellplatte pipettiert wurden, gab man weitere 40 µl PSB und 40 µl Quantification Reagent (QR) zu. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen.

Die Auswertung der Proteinkonzentration erfolgte in Bezug auf eine bekannte Konzentrationsreihe. Die DNA- sowie die Proteinkonzentration jeder Probe wurde doppelt bestimmt und der Mittelwert gebildet.

2.5.2 Isolierung der Gesamt-RNA

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels des TRIsure-Reagenz (Bioline) gemäß dem Herstellerprotokoll. Zunächst wurde eine halbe Niere mit 1 ml TRIsure homogenisiert, mit 200 µl Chloroform vermischt und zur Phasentrennung 20 Minuten bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige RNA-Phase wurde abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 Vol. 100 % Isopropanol und Inkubation für 10 Minuten bei RT wurde die RNA bei einer 10 minütigen Zentrifugation von 12000 rpm bei 4 °C gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Dazu wurde für 5 Minuten bei 7500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nachdem das gereinigte RNA-Pellet getrocknet worden war, wurde es mit 250 µl DEPC-H₂O bei einer maximal 2-minütigen Inkubation bei 65 °C gelöst und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.3 Reverse Transkription der RNA (RT-PCR)

Bei der reversen Transkription wird mithilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. cDNA dient als Basis für die quantitative PCR zur Bestimmung der mRNA Menge. Hierbei wurden 2 µg der isolierten RNA mit RNAase-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und mit 1 µl Oligo-dT Primer, der mit dem 3' Poly(A)-Schwanz der mRNAs reagiert und diese somit aus der Gesamt-RNA selektiert, vermischt. Dieser Ansatz wurde 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nach Hybridisierung des Primers an die mRNA wurde dem Reaktionsansatz 4 µl M-MLV Reverse Transkriptase Puffer (5x), 4 µl dNTPs (2,5 mM), 3 µl H₂O und 1 µl M-MLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl) zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte für eine Stunde bei 37 °C. Um das Enzym zu inaktivieren wurde der Reaktionsansatz anschließend für 2 Minuten auf 92°C erhitzt. Alle Proben wurden mit 22 µl H₂O verdünnt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5.4 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative PCR wurde mit dem SYBR Green PCR Master Mix von Roche in dem „Lightcycler 480“ von Roche durchgeführt. Die cDNA wurde in 10 µl Ansätzen vermessen. Hierzu wurden in einem Reaktionsgefäß pro Probe 5 µl SYBR Green, 3 µl H₂O und je 0,5 µl des „forward“ und des „reverse“ Primers gemischt.

9 µl davon wurden zusammen mit 1 µl Probe in ein Well einer 96-Well-Lightcycler-Platte pipettiert und diese anschließend kurz abzentrifugiert. Für die Negativkontrolle

wurde anstatt der Probe 1 µl H₂O verwendet. Nach einer 10-minütigen Aktivierung bei 95°C folgten 40 Amplifikationszyklen, die je aus einer Denaturierungsphase von 15 Sekunden bei 95°C, einer Annealingsphase von 30 Sekunden bei 60 °C und einer Elongationsphase von 20 Sekunden bei 72 °C bestanden. Am Ende jedes Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen. Nach Ablauf aller Zyklen wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels der dem Roche Lightcycler zugehörigen Software.

2.5.5 Western Immunoblotting

Die entnommenen Nieren wurden für die Proteinisolation mit 1 ml Lysispuffer (siehe Materialien) pro mg Nierengewebe homogenisiert. Nach kurzer Zentrifugation bei 4 °C und 12000 rpm zum Beseitigen des ungelösten Gewebes wurde der Überstand mit SDS-Probenpuffer versehen und zur Denaturierung der Proteine für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Für den Western Immunoblot wurden die Proteine zunächst entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laufpuffer: siehe Materialien) aufgetrennt. Anschließend wurde das Polyacrylamid-Trenngel für die weitere Analyse unter Verwendung des „Semi-Dry“-Blottingverfahren auf eine Nitrozellulose Membran transferiert (30 Minuten, 200 mA, Transferpuffer: siehe Materialien). Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran in 3 % Magermilchpulver in PBST (siehe Materialien) für 2 Stunden bei RT inkubiert. Die Bindung des primären GC-A Antikörpers (1:1000 in 3 % Magermilchpulver in PBST, bereitgestellt von Prof. M. Kuhn, Würzburg) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach zweimaligem Waschen für je 10 Minuten in H₂O, wurde die Membran für 1,5 Stunden bei RT mit dem an die Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörper (1:2500 in 3 % Magermilchpulver in PBST) inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde die Membran für 5 Minuten in PBST gelegt, ein weiteres Mal mit H₂O gewaschen und für 15 Minuten bei RT und 30 Minuten bei 4 °C in PBS inkubiert. Abschließend wurde die Membran nochmals viermal mit H₂O gewaschen. Die Detektion des gebundenen Peroxidasekonjugats erfolgte mit Hilfe des Western Blotting Detektionssubstrats (Pierce).

2.5.6 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung

Nachdem das entsprechende Gewebe mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert und in Paraffin eingebettet worden war, wurde es mithilfe eines Rotationsmikrotoms in 5 µm dicke Schnitte gebracht und auf Objektträger überführt. Zur vollständigen

Entfernung des Einbettungsmediums wurden die Nierenschnitte für 10 Minuten in Xylol und je für 5 Minuten in Isopropanol in absteigender Konzentration von 100 %, 96 %, 80 % und 70 % entparaffiniert. Nach kurzem Waschen mit H₂O wurde das Gewebe für 45 Minuten und 95 °C in Tris/EDTA (siehe Materialien) gekocht. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS (siehe Materialien) für 5 Minuten. Um unspezifische Bindungen in der nachfolgenden Antikörperreaktion zu vermeiden, wurde das Gewebe in 10 % Humanserum und 1 % BSA in PBS für 10 Minuten bei RT inkubiert. Die Antikörperreaktion erfolgte daraufhin mit dem primären Antikörper gegen Megalin (1:100 in 10 % Humanserum und 1 % BSA in PBS) über Nacht bei 4 °C. Nachdem die Nierenschnitte am folgenden Tag dreimal gewaschen worden waren, wurden diese mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (1:400 in 1 % BSA in PBS) und mit Hoechst 33342 zur Markierung der Zellkerne (1:400 in 1 % BSA in PBS) für 1,5 Stunden im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurde der Hintergrund durch Inkubation bei 37 °C zunächst mit 2 % Phenylhydrazin in PBS für 10 Minuten und dann mit 0,002 % H₂O₂ in PBS für 20 Minuten blockiert. Nach abschließendem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Nierenschnitte mit Mounting Medium (Dako) eingedeckelt.

2.6 Isoliert perfundierte Niere

Die technische Ausführung der Messungen an der isoliert perfundierten Niere wurden von Robert Götz nach dem Versuchprotokoll von Schweda et al., 2003 durchgeführt [131]. Die weitere Analyse der Proben erfolgte durch mich. Die Nieren stammten von C57BL/6 Mäusen. Für die Bestimmung der GFR wurde dem frisch angesetzten Perfusionsmedium FITC-markiertes Sinistrin (25 mg/l) hinzu gegeben. Nachdem ein konstanter Perfusatfluss durch die isolierte Niere unter Kontrollbedingungen erreicht worden war, wurde dem Perfusionsmedium BNP in aufsteigender Konzentration von 0,1 bis 10 nM zugegeben. Das arteriell in die Niere gepumpte und venös wieder ausgetretene Perfusat wurde über einen definierten Zeitraum, wodurch der Perfusatfluss pro Minute bestimmt werden konnte, gesammelt. Die Proben wurden anschließend für 5 Minuten bei 1500 g zentrifugiert, das Plasma 1:10 mit 0,5 M HEPES (pH 7,4) verdünnt und anschließend die Fluoreszenz bei einer Anregung von 480 nm und einer Emission von 520 nm vermessen. Aus der Differenz der FITC-Sinistrin Konzentration im arteriellen und im venösen Perfusionsmedium konnte die Ausscheidung des FITC-Sinistrin bestimmt und unter Einbezug des Perfusatflusses die GFR berechnet werden.

2.7 In vitro – Experimente

Vorraussetzung für Arbeiten in der Zellkultur ist Sterilität. Sterile Verbrauchsmaterialien, Medien und Puffer und Arbeiten unter der Sterilbank waren Standard. Die Medien und Reagenzien wurden auf 37°C vorgewärmt.

2.7.1 Zellpräparation und –kultivierung

Die proximalen Tubuluszellen wurden aus murinen Nieren isoliert. Dazu wurde eine Maus mit Isofluran betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Beide Nieren wurden entnommen, die Nierenkapseln entfernt und das zerkleinerte kortikale Nierengewebe für 20 Minuten bei 37 °C unter leichtem Rühren verdaut (Verdaulösung: siehe Materialien). Danach wurde dieser Verdau durch einen 150 µm Nylon-Filter filtriert, in ein 50 ml Falcon-Tube überführt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 600 g und 4 °C für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 ml kalter Percoll-Lösung, die aus 45 % Percoll in 2x PBS zuzüglich 5 mM Glucose bestand, resuspendiert und auf zwei 50 ml Sorvall-Zentrifugen-Röhrchen aufgeteilt. Durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 17500 rpm und 4 °C bildeten sich entsprechend ihrer Dichten vier Banden. Die unterste Bande, in welcher sich die proximalen Tubulusfragmente befanden, wurde abgenommen, in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und dreimal mit gekühltem PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1000 g für jeweils 4 Minuten). Die proximalen Tubuli wurden in das Kulturmedium (siehe Materialien) aufgenommen und in Falcon-Kulturschalen (Bd Bioscience) überführt. Um ein Anwachsen der Tubuli zu gewährleisten, wurde der Boden der Kulturschale nur leicht mit Medium bedeckt. Die proximalen Tubuluszellen, wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien LLC PK₁, MDCK und M1 Zellen erfolgte mit dem entsprechenden Kulturmedium (siehe Materialien) in einer 75 cm² Zellkulturflasche ebenfalls bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.7.2 Superfusion proximaler Tubuluszellen

Die in einer 24-Well-Platte konfluent gewachsenen Zellen wurden in Serum- und Hormon-freiem Medium mit Flussgeschwindigkeiten von 0,25 bis 2 mm/s für 20 Stunden überspült (superfundiert). Dazu wurde ein Flusssystem entwickelt, das wie folgt aufgebaut ist (siehe Abbildung 2.2):

Der Deckel einer 24-Well-Platte wird pro Well (insgesamt vier Wells) mit je zwei Löchern versehen, in die jeweils eine Kanüle eingebracht wird. Beide Kanülen sind miteinander über einen Schlauch, der an einer 4-Kanal-Peristaltikpumpe gekoppelt ist, verbunden. Durch die Rotation der Pumpe entsteht ein kontinuierlicher Fluss durch das Medium.

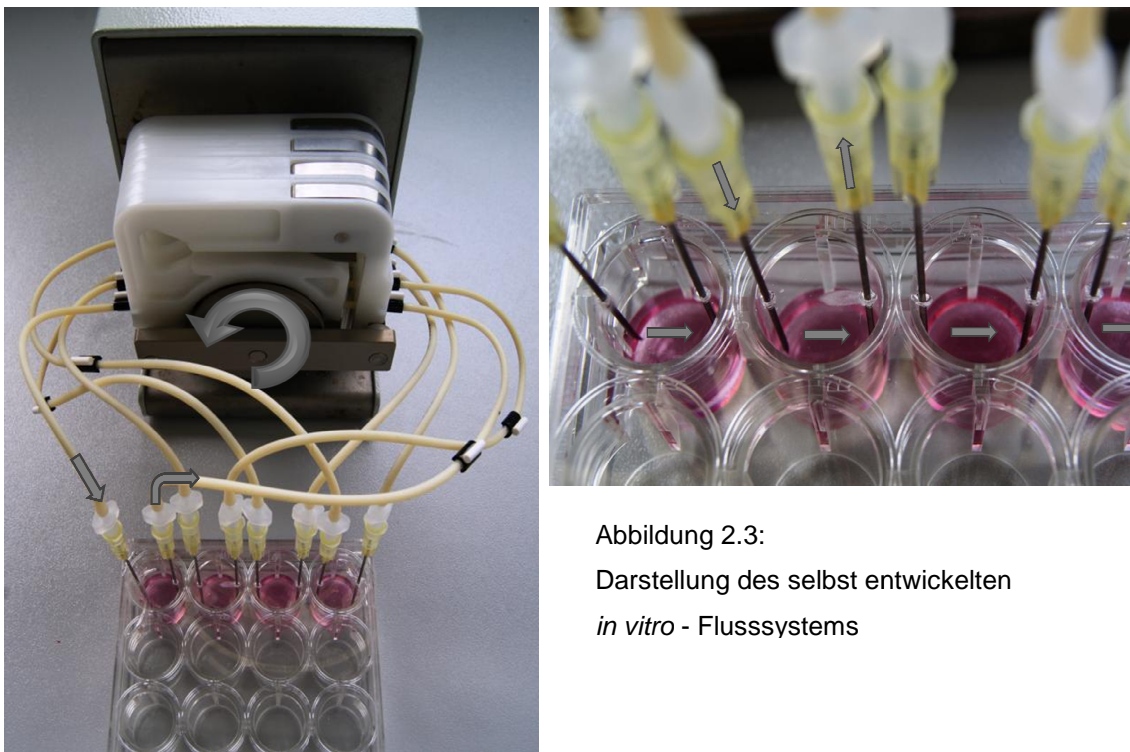


Abbildung 2.3:
Darstellung des selbst entwickelten
in vitro - Flusssystems

2.7.3 Stimulation proximaler Tubuluszellen

Die frisch isolierten proximalen Tubuli sowie die primären proximalen Tubuluszellen und die LLC PK₁ Zellen wurden mit folgenden Reagenzien für 20 Stunden stimuliert: ANP (Sigma, 100 nM), BNP (Phoenix Pharmaceuticals), EGF (Sigma, 100 nM), EIPA (Sigma, 100 nM), Phloridzin (Sigma, 1 mM), Rapamycin (Calbiochem, 40 µM), SB431542 (Sigma, 10 µM) und TGFβ (R&D Systems, 100 pM).

Für die Stimulation wurde Serum- und Hormon-freies Medium verwendet. Dabei wurden auf die in einer 24-Well-Platte konfluent gewachsenen Zellen oder auf die frisch isolierten proximalen Tubuli 500 µl des Stimulationsansatzes gegeben.

2.7.4 Bestimmung der Protein- und DNA-Konzentration

Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml PBS wurden die behandelten Zellen mit 320 µl H₂O pro Well lysiert. Dazu wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend bei -80 °C schockgefroren. Für die DNA-Konzentrationsbestimmung der Zellkultur, welche ebenfalls mithilfe des „Blue Fluorometric dsDNA Quantitation Kits“ von Invitrogen erfolgte, wurden aufgrund der Doppelbestimmung zweimal 100 µl des Zelllysats verwendet und, wie unter 2.4.1 beschrieben, fortgefahren.

Auf die restlichen 120 µl der lysierten Zellsuspension gab man 40 µl PSB des „Protein Quantification Kits“ von Machery Nagel. Davon wurden zweimal 60 µl mit je 40 µl QR versehen und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 620 nm nach 30 Minuten gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe einer Standardkurve aus bekannten Proteinkonzentrationen.

2.7.5 Bestimmung des Zellvolumens

Zur Bestimmung des Zellvolumens wurden die adhärennten Zellen zunächst mit 100 µl pro Well mit 0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA in PBS (Pan Biotech) vom Wellboden abgelöst und in 400 µl Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellzahl und das Zellvolumen im „Cell Counter CASY TT“ (Roche) ermittelt. Der „Cell Counter CASY TT“ ist ein elektronischer Zellzähler, welcher nach dem Widerstandsmessprinzip arbeitet. Bei jeder Messung werden aus der Probe, die sich aus 100 µl der Zellsuspension und 10 ml einer isotonen „CASY ton“-Elektrolytlösung zusammensetzt, 400 µl in eine Kapillare mit einem Innendurchmesser von 150 µm eingesaugt. Über zwei Platinelektroden ist eine elektrische Spannung angelegt und sobald eine Zelle in die Messkapillare eindringt, entsteht durch Änderung des elektrischen Widerstands ein elektrischer Impuls. Die Anzahl der Impulse ist ein Maß für die Zellzahl und die Größe eines Impulses für das Zellvolumen.

2.7.6 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung

Zur immunhistochemischen Färbung des α -Tubulins wurden die Zellen auf speziell beschichtete Glasplättchen (siehe Materialien) ausgesät. Nachdem die Zellen darauf konfluent gewachsen waren, wurde das Medium zunächst abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA in PBS fixiert. Die Fixierung wurde nach 20 Minuten durch dreimaliges Waschen mit PBS gestoppt. Nach Inkubation mit 2 % BSA und 0,1 % Triton-X in PBS für eine Stunde bei RT, wurden die Zellen ein weiteres Mal gewaschen und für eine Stunde bei RT mit dem primären Antikörper gegen α -Tubulin (Sigma, T6793, 1:200 in 2 % BSA in PBS) beschichtet. Daraufhin wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (1:400 in 2 % BSA in PBS) und Hoechst 33342 (1:400 in 2 % BSA in PBS) für eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen mit PBS konnten die Glasplättchen mit Mounting Medium (Dako) auf einem Objektträger fixiert werden.

3. Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten *in vivo*-, *ex vivo*- und *in vitro*-Ergebnisse konnten einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung des initialen Mechanismus, der eine kompensatorische renale Hypertrophie auslöst, leisten. In den *in vivo*-Experimenten an Mäusen, welche den ersten Teil dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden das kompensatorische Nierenwachstum und die Anpassung der Nierenfunktion durch eine unilaterale Nephrektomie (UNx) induziert. Da vor allem der initiale Signalweg, der die kompensatorische renale Hypertrophie auslöst, untersucht werden sollte, wurde ein früher Zeitpunkt von 72 Stunden nach unilateraler Nephrektomie für die Versuche gewählt. „Zum Schein“-operierte Mäuse (Sham), die einem ähnlichen Operationsstress unterzogen worden waren, dienten als Kontrolle.

3.1 Entwicklung der kompensatorischen renalen Hypertrophie bei Wildtypmäusen nach unilateraler Nephrektomie

3.1.1 Diurese und Natriurese nach Uninephrektomie

Zunächst wurden uninephrektomierte und „zum Schein“-operierte Wildtypmäuse hinsichtlich ihrer Urin- und Elektrolytausscheidung untersucht. Dazu wurden pro Gruppe 13 Versuchstiere 24 Stunden nach dem operativen Eingriff in metabolischen Käfigen untergebracht. Nach weiteren 24 und 48 Stunden wurde jeweils der Urin gesammelt, das Volumen sowie die Natrium- und die Kalium-Ausscheidung bestimmt.

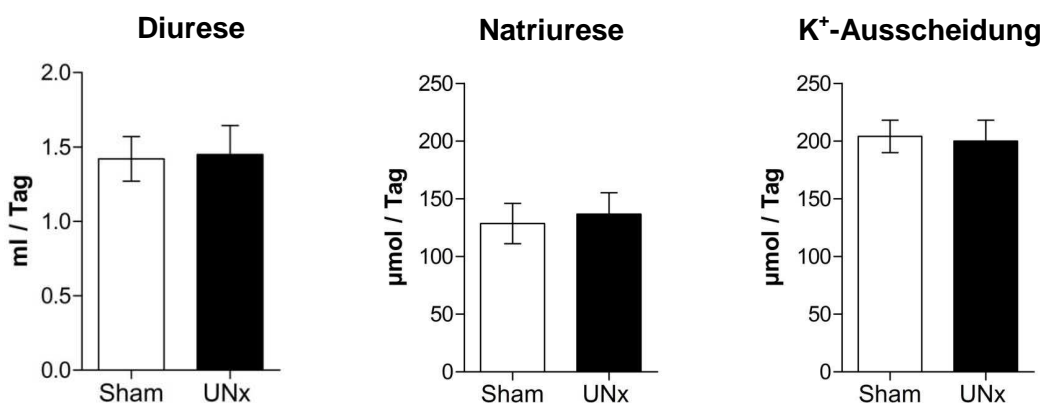


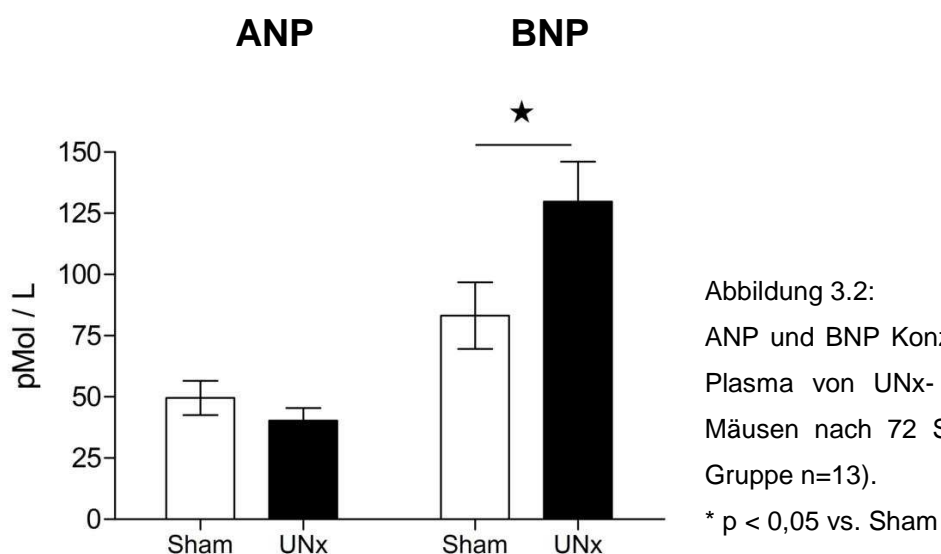
Abbildung 3.1: Diurese, Natriurese und Kaliumausscheidung von UNx- und Sham-Mäusen nach 72 Stunden (pro Gruppe n=13).

Die Analyse des Urins zeigte eine schnelle funktionelle Anpassung der verbleibenden Niere infolge der Uninephrektomie. Uninephrektomierte Mäuse mit nur einer Niere schieden schon nach 72 Stunden die gleiche Menge an Harn, Natrium und Kalium im Vergleich zu den „zum Schein“-operierten Kontrollmäusen mit beiden Nieren aus (Abbildung 3.1). Die verbleibende Niere der uninephrektomierten Tiere verdoppelte demnach ihre Ausscheidungsrate schon innerhalb der ersten 72 Stunden.

3.1.2 Plasmakonzentration der kardialen natriuretischen Peptide

Aufgrund der deutlich erhöhten Diurese und Natriurese unmittelbar nach Entnahme einer Niere wurde eine Beteiligung der natriuretischen Peptide in Erwägung gezogen. Die physiologische Funktion des atrialen und des B-Typ natriuretischen Peptids besteht unter anderem in der Förderung der Diurese und Natriurese sowie in der Steigerung der glomerulären Filtrationsrate, mit welcher auch die kompensatorische renale Hypertrophie einhergeht. Die Bestimmung der Konzentration von ANP und BNP im Blutplasma von „zum Schein“-operierten und von uninephrektomierten Mäusen nach 72 Stunden sollte zeigen, ob eine mögliche Beteiligung dieser an der Entstehung der kompensatorischen renalen Hypertrophie gegeben ist.

Während sich die Plasmakonzentration des ANPs von uninephrektomierten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen nicht unterschied, war eine deutliche Zunahme des im Plasma zirkulierenden BNPs von Mäusen, welche eine kompensatorische renale Hypertrophie entwickelten, zu sehen (Abbildung 3.2). Die Konzentration von BNP lag im Plasma der Sham-Tiere bei 83 ± 14 pMol/l, im Plasma der UNx-Tiere dagegen bei 130 ± 16 pMol/l.



Dieser Versuch zeigte einen möglichen Einfluss des B-Typ natriuretischen Peptids auf die Entwicklung einer kompensatorischen renalen Hypertrophie.

3.1.3 Untersuchung der entnommenen Organe

Nach Untersuchung der Wildtypmäuse bezüglich der klinischen Parameter galt zu überprüfen, ob ein kompensatorisches Nierenwachstum als Folge der Uninephrektomie nach 72 Stunden eingetreten war. Dazu wurde das Gewicht der verbleibenden rechten Niere bestimmt und auf die zuvor entnommene linke Niere bezogen. Dargestellt in Abbildung 3.3 löste die einseitige Nierenentnahme eine signifikante Gewichtszunahme der kontralateralen Niere um 16 % aus. Bei den „zum Schein“-operierten Kontrollmäusen ergab sich, wie erwartet, kein Unterschied im Gewicht der rechten im Bezug auf die linke Kontrollniere. Eine kompensatorische renale Hypertrophie war somit nach 72 Stunden gegeben.

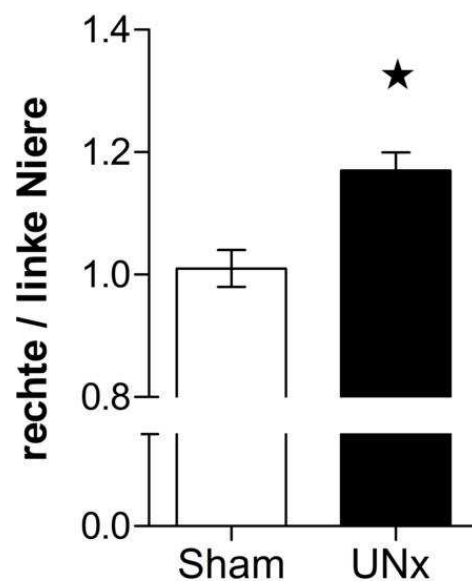


Abbildung 3.3: Gewichtszunahme der verbleibenden rechten Niere 72 Stunden nach Uninephrektomie

* $p < 0,05$ vs. Sham

3.1.3.1 Genexpression der natriuretischen Peptide und ihre Rezeptoren

Angesichts der Plasmakonzentrationsunterschiede von BNP zwischen den für 72 Stunden uninephrektomierten und den „zum Schein“-operierten Mäusen wurde daraufhin die Genexpression von BNP sowie von ANP im Herzen, das als Hauptexpressionsorgan gilt, bestimmt. In Abbildung 3.4 ist die Menge an ANP (links) und BNP mRNA (rechts) im Herzen von den UNx- und den Sham-Tieren dargestellt. Gleichsinnig zur Plasmakonzentration ergab sich kein Unterschied bezüglich der Genexpression des ANPs im Herzen zwischen den beiden experimentellen Gruppen. Jedoch stimulierte der Verlust einer Niere die Expression des BNP Gens. Die BNP mRNA Abundanz im Herzen der UNx-Tiere war gegenüber den Sham-Tieren signifikant um 73 % erhöht.

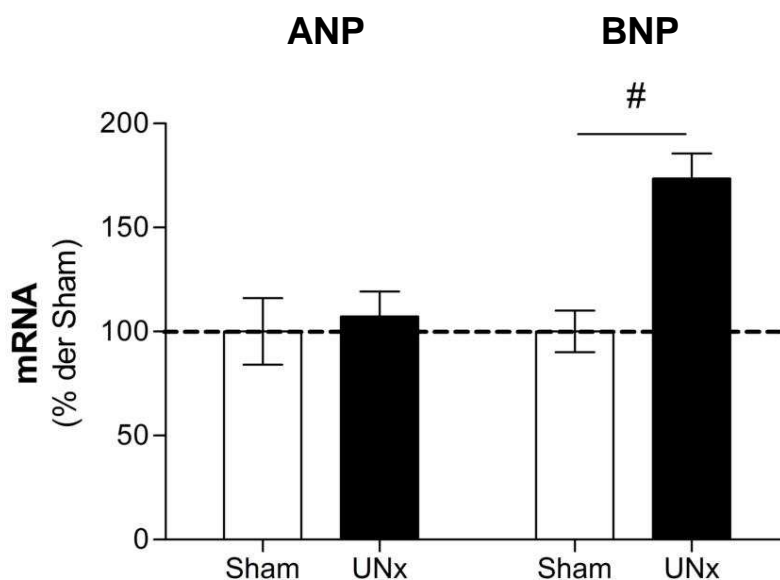


Abbildung 3.4: Die kardiale ANP und BNP mRNA Expression von UNx- und Sham-Mäusen (pro Gruppe n=13). Die Genexpression wurde mithilfe der quantitativen PCR gemessen und auf 2 µg RNA bezogen. Die Werte werden als prozentuale Abweichung zu den „zum Schein“-operierten Mäusen (100 %) angegeben.

p < 0,01 vs. Sham

Die natriuretischen Peptide ANP und BNP entfalten ihre physiologische Wirkung über den natriuretischen Peptidrezeptor-A (NPR-A/GC-A). Außerdem wird ihre Aktivität durch den als Clearance-Rezeptor fungierenden natriuretischen Peptidrezeptor-C (NPR-C) reguliert, indem er sowohl ANP als auch BNP bindet und aus dem Plasma eliminiert. Beide Rezeptoren sind in der Niere hoch exprimiert. Die Genexpression

beider Rezeptoren wurde nachfolgend in der rechten hypertrophierenden Niere der UNx-Mäuse und der rechten Kontrollniere der Sham-Tiere bestimmt. Sowohl NPR-A als auch NPR-C scheinen infolge einer Uninephrektomie reguliert zu werden (Abbildung 3.5). 72 Stunden nach der einseitigen Nierenentnahme war die mRNA Synthese des NPR-A um 22 %, die des NPR-C um 21 % in der verbleibenden gegenüber der Kontrollniere vermindert.

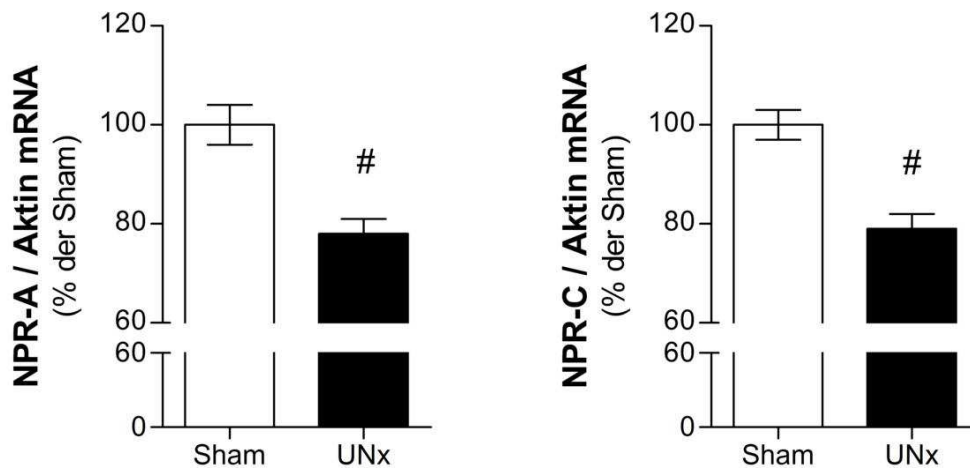


Abbildung 3.5: Die renale NPR-A und NPR-C mRNA Expression von UNx- und Sham-Mäusen (pro Gruppe n=13). Die Genexpression wurde mithilfe der quantitativen PCR gemessen und auf die mRNA des Housekeeping Gens Aktin bezogen. Die Werte werden als prozentuale Abweichung zu den „zum Schein“-operierten Mäusen (100 %) angegeben.

p < 0,01 vs. Sham

3.1.3.2 Proteinanalyse

Aufgrund der Resultate der quantitativen PCR, die eine deutlich geringere NPR-A Genexpression in der hypertrophierenden Niere gegenüber der Kontrollniere aufwies, wurde die Expression dieser auch auf Proteinebene mittels Western Immunoblotting bestimmt. Dazu wurden die verbleibenden Nieren von uninephrektomierten und die Kontrollnieren von „zum Schein“-operierten Mäusen 72 Stunden nach dem operativen Eingriff untersucht. Pro Niere wurden 50 µg Gesamtprotein eingesetzt. Wie in Abbildung 3.6 dargestellt ist, zeigte sich allerdings kein Unterschied in der Menge an GC-A (130 kDa) zwischen den UNx- und den Sham-Mäusen.

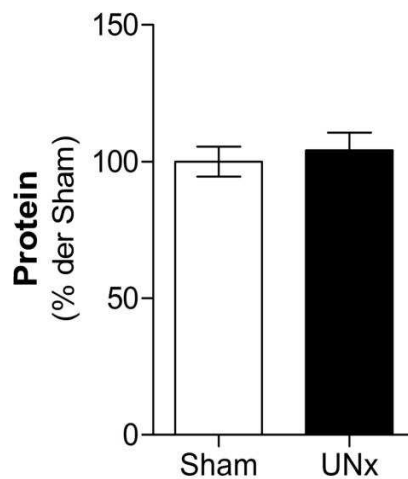
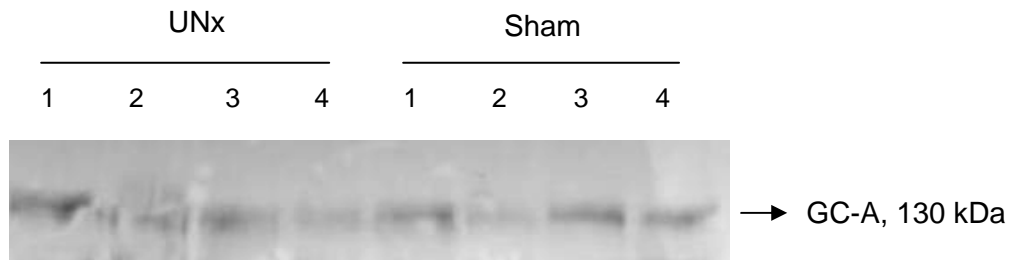


Abbildung 3.6: Western Immunoblotting zur Bestimmung der renalen GC-A Proteinmenge. Zur Bestimmung des GC-A Proteins in der verbleibenden Niere von UNx-Mäusen und in der Kontrollniere von Sham-Mäusen wurde pro Niere 50 µg Gesamtprotein eingesetzt.

3.2 Die kompensatorische renale Hypertrophie bei Guanylatzyklase-A Knockoutmäusen

Aus den vorherigen Untersuchungen ergaben sich Hinweise darauf, dass das B-Typ natriuretische Peptid an der kompensatorischen renalen Hypertrophie beteiligt sein könnte. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden in den folgenden Experimenten Mäuse mit genetischer Deletion des natriuretischen Peptidrezeptors-A (Guanylatzyklase-A Knockoutmäuse), den gemeinsamen Rezeptor von ANP und BNP, erforscht. Guanylatzyklase-A Knockoutmäuse (GC-A $-/-$) sowie ihre Wildtypgeschwister (GC-A $+/+$) wurden zunächst hinsichtlich ihres Phänotyps charakterisiert und im Weiteren die Entwicklung der kompensatorischen renalen Hypertrophie, ausgelöst durch eine Uninephrektomie, untersucht.

3.2.1 Der Phänotyp der GC-A Knockoutmäuse im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistern

Wie bereits in der Literatur beschrieben ist, wiesen auch die in dieser Arbeit untersuchten GC-A Knockoutmäuse verglichen mit ihren Wildtypgeschwistern einen erhöhten systolischen Blutdruck auf. Ansonsten waren keine Unterschiede in der Herzfrequenz und der vor Uninephrektomie (= pre UNx) bestimmten glomerulären Filtrationsrate zu beobachten (Tabelle 3.1).

	GFR μl/min/100gKG	systolischer Blutdruck in mmHg	Herzfrequenz in 1/min
GC-A +/+	1350 ± 75 n=20	118 ± 3 n=6	665 ± 5 n=6
GC-A -/-	1325 ± 73 n=20	139 ± 5 [#] n=6	656 ± 3 n=6

Tabelle 3.1: Klinische Parameter der GC-A Knockoutmäuse und ihren Wildtypgeschwistern.

p < 0,01 vs. Wildtyp

Neben der Hypertonie zeigten die GC-A Knockoutmäuse auch eine Hypertrophie des Herzens. Das Gewicht aller anderen untersuchten Organe war jedoch bei beiden Genotypen gleich. Auch entsprach das Gewicht der linken Kontrollniere, das zur Bestimmung des kompensatorischen Nierenwachstums herangezogen wurde, dem der Wildtypen (Tabelle 3.2).

	Körper in g	Niere in mg	Herz in mg	Milz in mg	Leber in g	Gehirn in mg
GC-A +/+	26,5 ± 0,6	162 ± 5	148 ± 5	104 ± 6	1,35 ± 0,1	420 ± 5
GC-A -/-	27,6 ± 0,7	162 ± 5	185 ± 9 [#]	103 ± 5	1,27 ± 0,1	427 ± 6

Tabelle 3.2: Körper- und Organgewichte der GC-A Knockoutmäuse (n=15) und ihren Wildtypgeschwistern (n=15).

p < 0,01 vs. Wildtyp

3.2.2 Die funktionelle Anpassung der verbleibenden Niere bei GC-A Knockoutmäusen

Da die kompensatorische renale Hypertrophie neben Zunahme des Nierengewichtes mit einer Steigerung der Nierenfunktion einhergeht, wurden die GC-A Knockoutmäuse zunächst auf Ebene der funktionellen Adaption infolge einer unilateralen Nephrektomie untersucht. Die glomeruläre Filtrationsrate als wichtiger Parameter der Nierenfunktion wurde vor Operation, 3, 17 und 42 Tage nach Uninephrektomie gemessen, um den Entwicklungsverlauf der Funktionsanpassung zu charakterisieren.

Die GFR nach Uninephrektomie wurde auf den Ausgangswert vor Uninephrektomie (pro Niere = 0,5) bezogen und in Abbildung 3.7 dargestellt.

Bei den Wildtypmäusen erfolgte die kompensatorische Funktionsanpassung hauptsächlich in den ersten Tagen nach Uninephrektomie. Schon nach 3 Tagen nahm die GFR der verbleibenden Niere um 38 % zu, so dass nach der einseitigen Nierenentnahme eine Filtrationsleistung von 69 % erhalten blieb. Nach 18 Tagen wurde zwar die GFR der verbleibenden Niere um weitere 17 % auf 81 % des Ausgangswertes gesteigert, allerdings war diese Steigerung verglichen mit der Zunahme innerhalb der ersten 3 Tage wesentlich geringer. In dieser Phase war die Funktionsadaption fast vollständig abgeschlossen, da 42 Tage nach UNx die verbleibende Niere ihre Filtration nur um weitere 2,5 % erhöhte. Bei den Wildtypmäusen ist somit eine rasche funktionelle Anpassung der verbleibenden Niere infolge einer einseitigen Nierenentnahme gegeben.

Im Gegensatz dazu war diese frühe Funktionsanpassung der verbleibenden Niere bei den GC-A Knockoutmäusen deutlich abgeschwächt. Es ergab sich ein hoch signifikanter Unterschied zu den Wildtypmäusen. Nur ein leicht tendenzieller Anstieg der GFR war 3 Tage nach UNx festzustellen (GFR post/pre $0,56 \pm 0,03$ / $p < 0,01$ vs. WT). Zu späteren Zeitpunkten ergab sich bei den GC-A Knockoutmäusen zwar auch eine Erhöhung der GFR, allerdings lag diese weiterhin unter den Kontrollwerten der Wildtypen (Unterschied war nicht signifikant). Nach 18 Tagen entsprach die Steigerung der GFR auf 71 % des Ausgangswertes in etwa der GFR, die bei den Wildtypmäusen schon 3 Tage nach UNx erreicht wurde. Nach 42 Tagen konnte kein Unterschied mehr in der Funktionsadaption der verbleibenden Niere zwischen Knockout- und Wildtypmäusen beobachtet werden.

Dieser Versuch zeigte schließlich, dass die initiale funktionelle Anpassung der verbleibenden Niere infolge des Verlustes von funktionsfähigem Nierengewebe bei den Mäusen mit Deletion des Rezeptors für die natriuretischen Peptide aufgehoben ist.

Die glomeruläre Filtrationsrate

post / pre UNx pro Niere

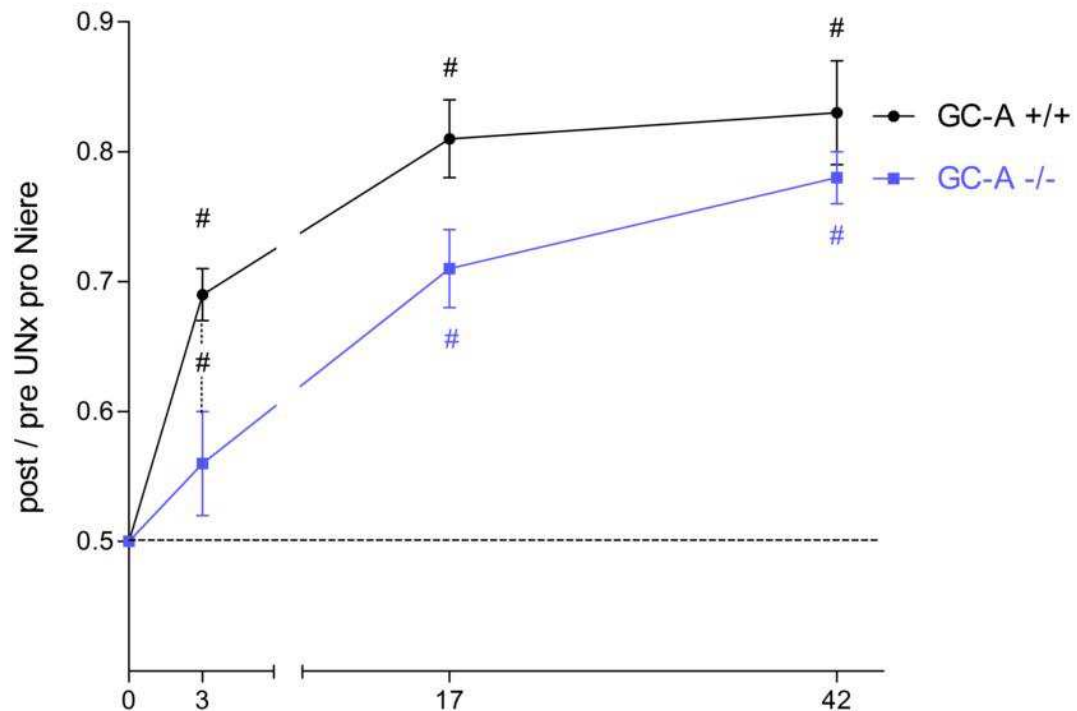
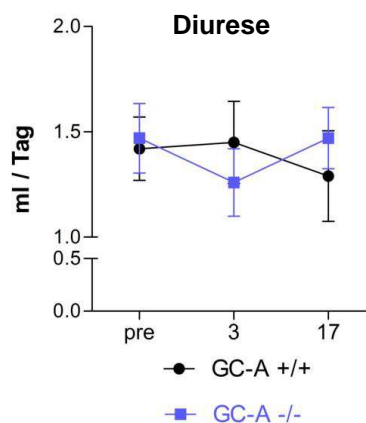


Abbildung 3.7: Die Entwicklung der funktionellen Anpassung nach Uninephrektomie bei GC-A Knockout- und Wildtypmäusen. Die GFR wurde vor (je n=20), 3 (je n=20), 17 (je n=16) und 42 (je n=8) Tage nach Uninephrektomie im wachen Zustand mittels der FITC-Sinistrin-Clearance-Methode gemessen. Abgebildet ist das Verhältnis post / pre GFR pro Niere.

p < 0,01 vs. Kontrolle vor UNx

Die Analyse der Urin- und Elektrolytausscheidung ergab allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen vor, drei und 17 Tage nach Uninephrektomie (Abbildung 3.8).



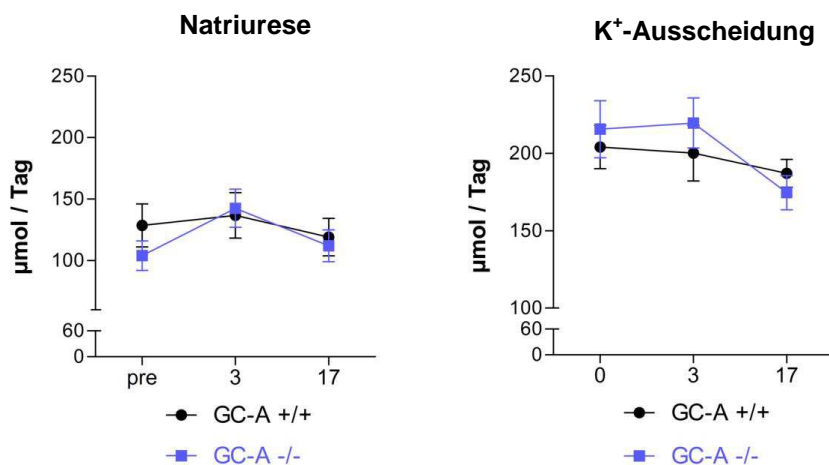


Abbildung 3.8: Diurese, Natriurese und Kaliumausscheidung von GC-A Knockoutmäusen und ihren Wildtypgeschwistern vor, 3 und 17 Tage nach Uninephrektomie (pro Gruppe n=8).

3.2.3 Das kompensatorische Nierenwachstum bei GC-A Knockoutmäusen

An die Funktionsmessung schlossen sich morphologische Untersuchungen an. Auch die Bestimmung des Nierengewichtes zeigte, dass neben der initialen Funktionsanpassung auch das frühe kompensatorische Nierenwachstum bei den Guanylatzyklase-A Knockoutmäusen infolge einer unilateralen Nephrektomie aufgehoben war (Abbildung 3.9). Während es bei Wildtypmäusen schon nach vier Tagen zu einer deutlichen Zunahme des Gewichtes der hypertrophierenden Niere (Ratio rechte/linke Niere $1,18 \pm 0,01$) kam, war diese enorme Gewichtszunahme bei GC-A Knockoutmäusen nicht gegeben (Ratio rechte/linke Niere $1,04 \pm 0,02$ / $p \leq 0,01$). Erst nach 18 Tagen wurde ein kompensatorisches Wachstum der verbleibenden Niere ermittelt, welches in etwa dem der Wildtypmäuse entsprach. Das Gewicht der hypertrophierenden Niere nahm gegenüber dem Ausgangsgewichtes bei den GC-A Knockoutmäusen um 28 %, bei den Wildtypmäusen um 33 % zu. Die Studie des Nierenwachstums nach 42 Tagen zeigte, dass das kompensatorische Nierenwachstum der Mäuse nach 18 Tagen abgeschlossen war. Weder bei den GC-A Knockoutmäusen noch bei den Wildtypen wurde das Gewicht der verbleibenden Niere weiter erhöht.

Feuchtgewicht

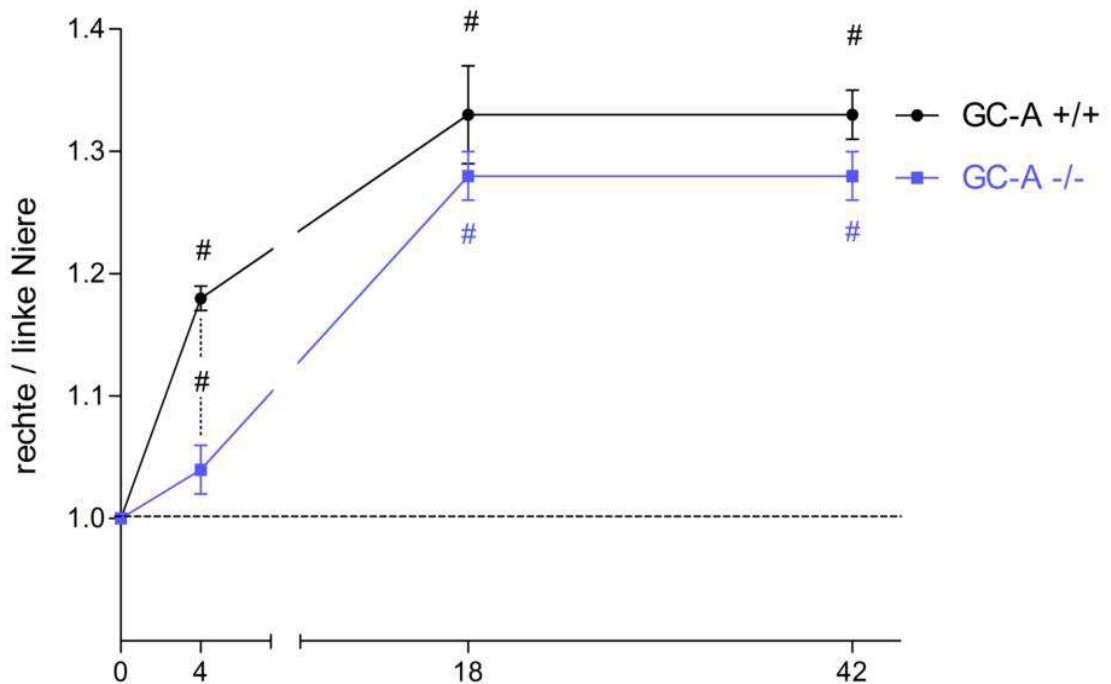


Abbildung 3.9: Feuchtgewicht der verbleibenden rechten Niere in Bezug auf die linke Kontrollniere von GC-A Knockoutmäusen und von ihren Wildtypgeschwistern 4 (je n=16), 18 (je n=10) oder 42 (je n=8) Tage nach Uninephrektomie.

$p < 0,01$ vs. linke Kontrollniere

Um auszuschließen, dass die Zunahme des Nierengewichtes allein auf Einlagerung interstitieller Flüssigkeit beruhte oder durch eine Hyperplasie bedingt war, wurden zusätzlich das Trockengewicht und das Protein/DNA Verhältnis ermittelt. Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurden die entnommenen linken Kontrollnieren und die verbleibenden Nieren für 72 Stunden bei 65 °C getrocknet und anschließend gewogen. Des Weiteren wurde der Proteingehalt beider Nieren bestimmt und auf die DNA-Konzentration bezogen, was als Maß für die Hypertrophie gilt. Sowohl das Trockengewicht (Abbildung 3.10, links) als auch das Protein/DNA Verhältnis (rechts) der rechten Niere in Bezug auf die linke Kontrollniere änderten sich gleichsinnig zum Feuchtgewicht. Während bei den Wildtypmäusen eine deutliche Hypertrophie zu sehen war, trat bei den GC-A Knockoutmäusen kein signifikantes kompensatorisches Nierenwachstum nach 4 Tagen ein.

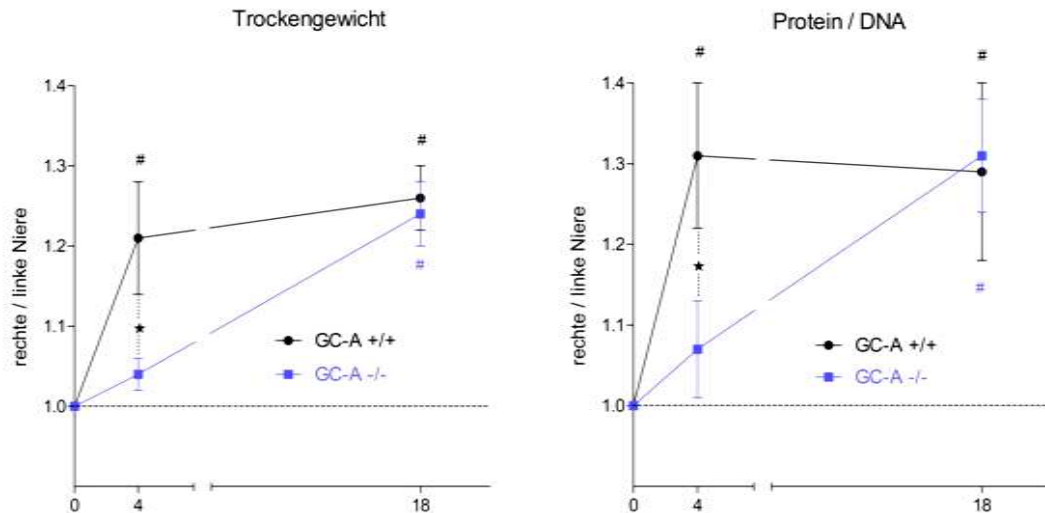


Abbildung 3.10: Trockengewicht (links) und Protein/DNA Ratio (rechts) der verbleibenden rechten Niere in Bezug auf die linke Kontrollniere von GC-A Knockoutmäusen und von ihren Wildtypgeschwistern vor, 4 (je n=8) oder 18 (je n=8) Tage nach UNx.

p < 0,01 vs. linke Kontrollniere

* p < 0,05 vs. Wildtyp

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl das Wachstum als auch die funktionelle Adaption der verbleibenden Niere bei Wildtypmäusen größtenteils in den ersten Tagen nach Verlust von Nierengewebe eintritt. Bei den GC-A Knockoutmäusen waren diese frühen kompensatorischen Veränderungen jedoch aufgehoben. Somit kann eine Beteiligung der GC-A, dem Rezeptor für die natriuretischen Peptide, an der initialen Entwicklung der kompensatorischen renalen Hypertrophie angenommen werden.

3.2.4 Bestimmung der Zellfläche von proximalen Tubuli nach Uninephrektomie

Diese Einschätzung wurde durch weitere Versuche an GC-A Knockoutmäusen gestützt. Da das kompensatorische Nierenwachstum vor allem auf einer Hypertrophie der proximalen Tubuli beruht, wurden diese bezüglich ihrer Zellgröße sowohl von Wildtyp- als auch von GC-A Knockoutmäusen 3 Tage nach Uninephrektomie analysiert. Dazu wurde Megalin, ein selektiv im Bürstensaum des proximalen Tubulus vorkommendes Protein, zur Markierung dieses Tubulusabschnittes immunhistochemisch gefärbt. Ebenso wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 markiert, um die Zellzahl pro proximalen Tubulus bestimmen zu können. Mithilfe der „AxioVision Software“ von Zeiss konnte durch Umrunden der basolateralen und der

luminalen Membran die Gesamtfläche, welche geteilt durch die Anzahl der Zellkerne die Fläche pro Zelle ergab, ermittelt werden (Abbildung 3.11). Dazu wurden 50 kortexnahe und 50 medullanahe proximale Tubuli von je 6 Mäusen pro Gruppe ausgewertet.

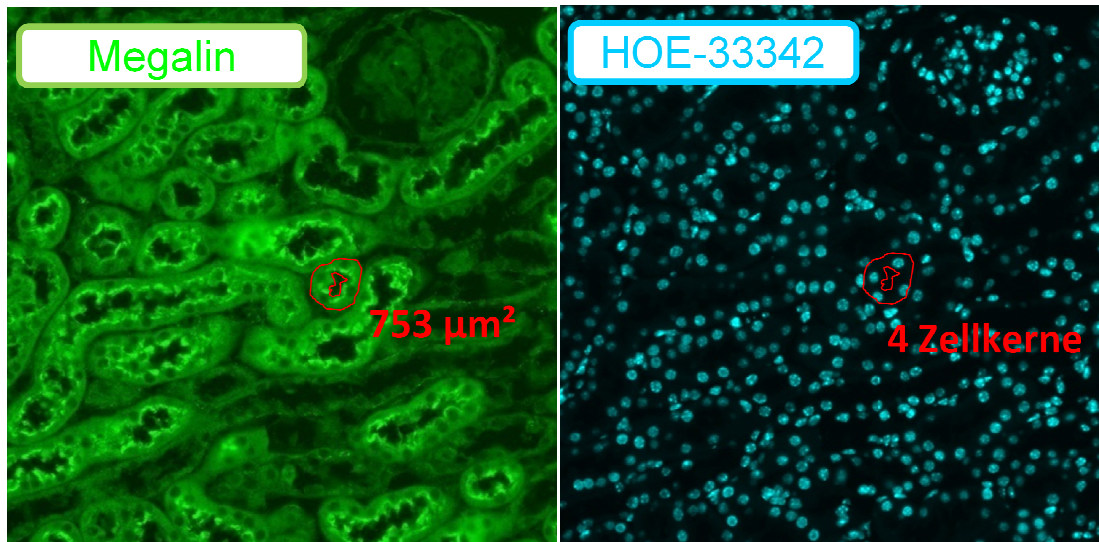


Abbildung 3.11: Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von Megalin und Hoechst 33342 in Nierenschnitten.

Dargestellt in Abbildung 3.12 wiesen sowohl Zellen der kortexnahen (links) als auch der medullanahen (rechts) proximalen Tubuli der uninephrektomierten Wildtypmäuse eine Hypertrophie im Vergleich zu den „zum Schein“-operierten Tieren auf. Dabei war eine größere Flächenzunahme im Bereich des Kortex zu beobachten. Die Zellvergrößerung von 17 % der proximalen Tubuli entsprach auch in etwa der Zunahme des Gesamtgewichtes der verbleibenden Niere. Dies bestätigt, dass das kompensatorische Nierenwachstum vor allem auf einer Hypertrophie der proximalen Tubuli beruht. Im Gegensatz dazu zeigten sich analog zum Gesamtnierengewicht keine Größenunterschiede der proximalen Tubuluszellen zwischen den uninephrektomierten GC-A Knockoutmäusen und den Kontrolltieren.

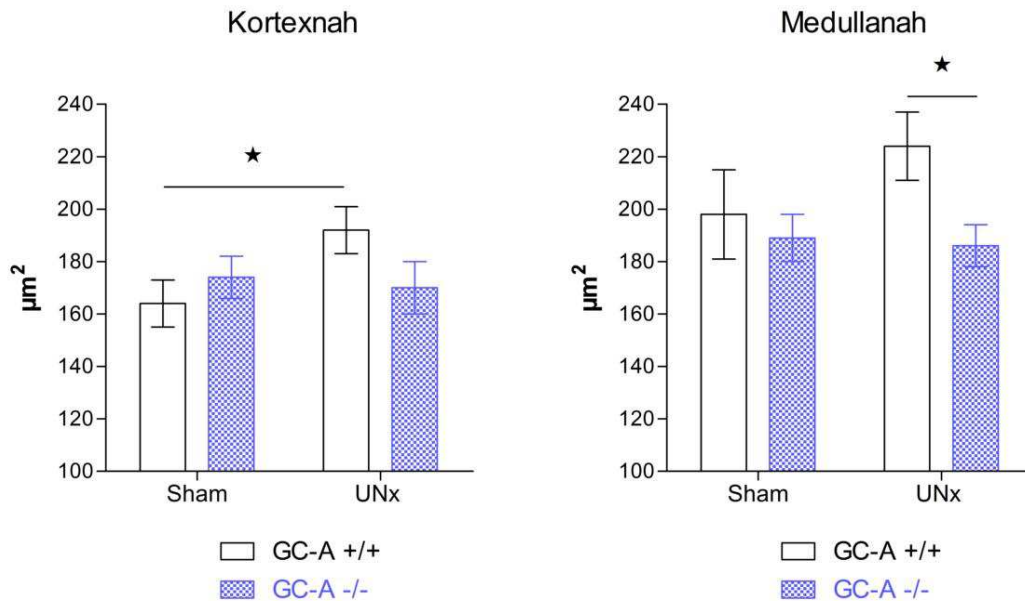


Abbildung 3.12: Die Fläche der proximalen Tubuluszellen von uninephrektomierten und „zum Schein“-operierten GC-A Knockout- und Wildtypmäusen 3 Tage nach Uninephrektomie (pro Gruppe n=6).

* $p < 0,05$

Somit konnte die Erkenntnis, dass in den ersten Tagen nach Verlust von Nierengewebe bei den Mäusen mit Deletion der GC-A keine kompensatorische renale Hypertrophie eintritt, durch diesen Versuch weiter belegt werden. Der GC-A kann also eine Rolle bei der initialen Entwicklung dieses Phänomens zugeschrieben werden.

3.3 Die kompensatorische renale Hypertrophie bei ANP Knockoutmäusen

Neben den GC-A Knockoutmäusen wurden auch Mäuse, in denen das Gen für ANP deletiert ist (ANP -/-) hinsichtlich ihrer Entwicklung des kompensatorischen Nierenwachstums und der renalen Funktionsanpassung infolge einer einseitigen Nierenentnahme untersucht. Wie die GC-A sind auch die ANP Knockoutmäuse hypertensiv und weisen ein erhöhtes Herzgewicht gegenüber ihrer Wildtypgeschwister auf (Tabelle 3.3 und 3.4). Durch diesen Versuch sollte zum Einen ein möglicher Einfluss des erhöhten Blutdruckes und der Hypertrophie des Herzens auf die kompensatorische renale Hypertrophie ausgeschlossen werden. Zum Anderen konnte die Beteiligung des ANPs überprüft werden.

Auch in diesem Mausstamm zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der GFR, die vor der Uninephrektomie gemessen worden war (pre UNx), und der linken Kontrollniere zwischen den beiden Genotypen (Tabelle 3.3 und 3.4). Zudem waren neben dem Nierengewicht auch das Körper-, das Milz-, das Leber- und das Gehirngewicht gleich.

	GFR µl/min/100gKG	systolischer Blutdruck in mmHg	Herzfrequenz in 1/min
ANP +/+	1089 ± 107	117 ± 5	655 ± 61
ANP -/-	1204 ± 81	139 ± 6 [#]	639 ± 71

Tabelle 3.3: Klinische Parameter der ANP Knockoutmäuse (n=10) und ihren Wildtypgeschwistern (n=10).

p < 0,01 vs. Wildtyp

	Körper in g	Niere in mg	Herz in mg	Milz in mg	Leber in g	Gehirn in mg
ANP +/+	27,5 ± 0,7	146 ± 4	139 ± 5	93,8 ± 7	1,24 ± 0,04	433 ± 15
ANP -/-	26,2 ± 0,6	146 ± 4	159 ± 5 [#]	89,1 ± 6	1,17 ± 0,05	437 ± 16

Tabelle 3.4: Körper- und Organgewichte der ANP Knockoutmäuse (n=10) und ihren Wildtypgeschwistern (n=10).

p < 0,01 vs. Wildtyp

Die unilaterale Nephrektomie zeigte, dass die verbleibende Niere von ANP Knockoutmäusen den Gewebs- und Funktionsverlust in gleichem Maße wie ihre Wildtypgeschwister adaptierte. Bei beiden Genotypen wurde drei Tage nach Entnahme einer Niere ein deutliches Wachstum der kontralateralen Niere ausgelöst (Abbildung 3.13).

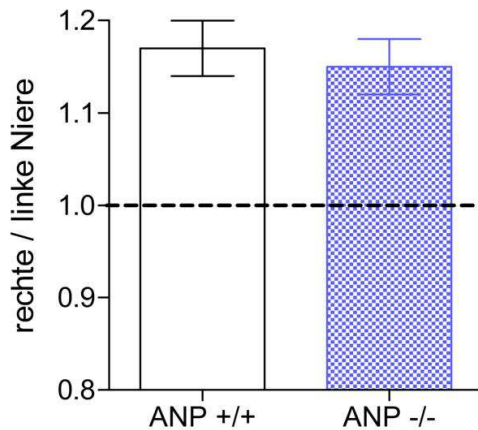


Abbildung 3.13:

Das Gewicht der verbleibenden rechten Niere wurde 3 Tage nach UNx bestimmt und auf die entnommene linke Niere bezogen. Die Gewichtszunahme der verbleibenden Niere der ANP Knockout- und der Wildtypmäuse ist dargestellt.

(pro Gruppe n=10)

Zudem war kein signifikanter Unterschied in der kompensatorischen Funktionssteigerung der verbleibenden Niere zwischen den Genotypen zu sehen. Neben der erwarteten Steigerung der Filtrationsrate bei den uninephrektomierten Wildtypmäusen wurde auch eine deutlich erhöhte GFR bei den uninephrektomierten ANP Knockoutmäusen ermittelt (Abbildung 3.14).

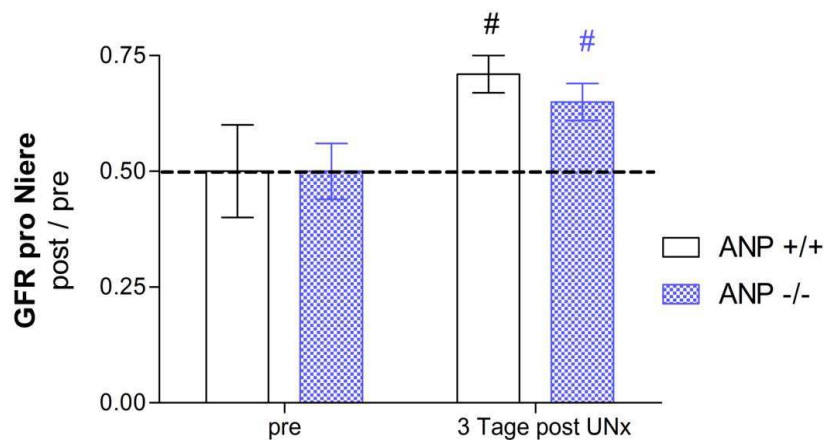


Abbildung 3.14: Die GFR wurde vor und 3 Tage nach UNx im wachen Zustand mittels der FITC-Sinistrin-Clearance-Methode gemessen. Abgebildet ist das Verhältnis post/pre GFR pro Niere (pro Gruppe n=10).

p < 0,01 vs. Kontrolle pre UNx

Diese Ergebnisse sprechen gegen einen Einfluss der kardialen Hypertrophie und des erhöhten systemischen Blutdruckes auf die kompensatorische renale Hypertrophie. Die retardierte Entwicklung dieser bei den GC-A Knockoutmäusen ist somit auf den Guanylatzyklase-A Rezeptor zurückzuführen. Außerdem kann eine Beteiligung des ANPs ausgeschlossen werden.

3.4 Die Wirkung des B-Typ natriuretischen Peptids auf die Funktion und das Wachstum der Nieren

Da eine Beteiligung von BNP an der Entstehung der kompensatorischen renalen Hypertrophie angenommen werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob eine Applikation synthetischen BNPs sowohl ein Nierenwachstum als auch eine Funktionssteigerung der Niere *in vivo* induzieren kann. Dazu wurde Wildtypmäusen BNP kontinuierlich über einen Zeitraum von 3 Tagen mittels einer osmotischen Minipumpe verabreicht. Die verwendete Konzentration von 2 ng/h pro g Körpergewicht führte zu einer Plasmakonzentration von 140 ± 17 pmol/l, die auch infolge einer unilateralen Nephrektomie im Plasma zu finden war. Die Kontrollgruppe erhielt auf gleiche Weise 0,9 % NaCl. Tatsächlich konnte durch die chronische BNP-Infusion eine Funktionssteigerung der Niere induziert werden. Dies zeigten Messungen der GFR vor und nach 3-tägiger BNP-Infusion. Die GFR, welche vor Behandlung im Durchschnitt bei $13,7 \pm 0,6$ $\mu\text{l}/\text{min pro g KG}$ lag, nahm bei allen untersuchten Mäusen durch BNP zu. Im Mittel wurde die GFR um 16 % auf 16 ± 1 $\mu\text{l}/\text{min pro g KG}$ gesteigert (Abbildung 3.15).

Die glomeruläre Filtrationsrate

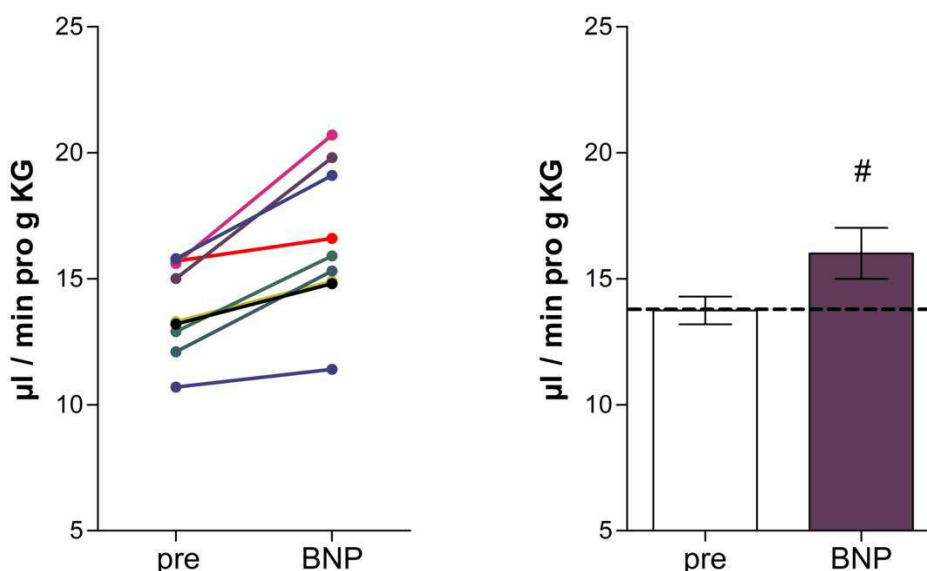


Abbildung 3.15: Die GFR wurde vor und 3 Tage nach BNP-Applikation (2 ng/h pro g KG) im wachen Zustand mittels der FITC-Sinistrin-Clearance-Methode gemessen.

Links: Darstellung der GFR in $\mu\text{l}/\text{min pro g KG}$ der einzelnen Mäuse.

Rechts: Darstellung des Mittelwertes der GFR in $\mu\text{l}/\text{min pro g KG}$ aller untersuchten Mäuse (n=9). # p < 0,01 vs. Kontrolle vor BNP-Applikation

Zudem wurde durch BNP-Applikation in nur 3 Tagen ein Nierenwachstum initiiert. Sowohl das Feucht- als auch das Trockengewicht der Nieren im Bezug zum Gehirngewicht nahmen in den mit BNP behandelten um etwa 10 % gegenüber den mit NaCl behandelten Versuchstieren zu.

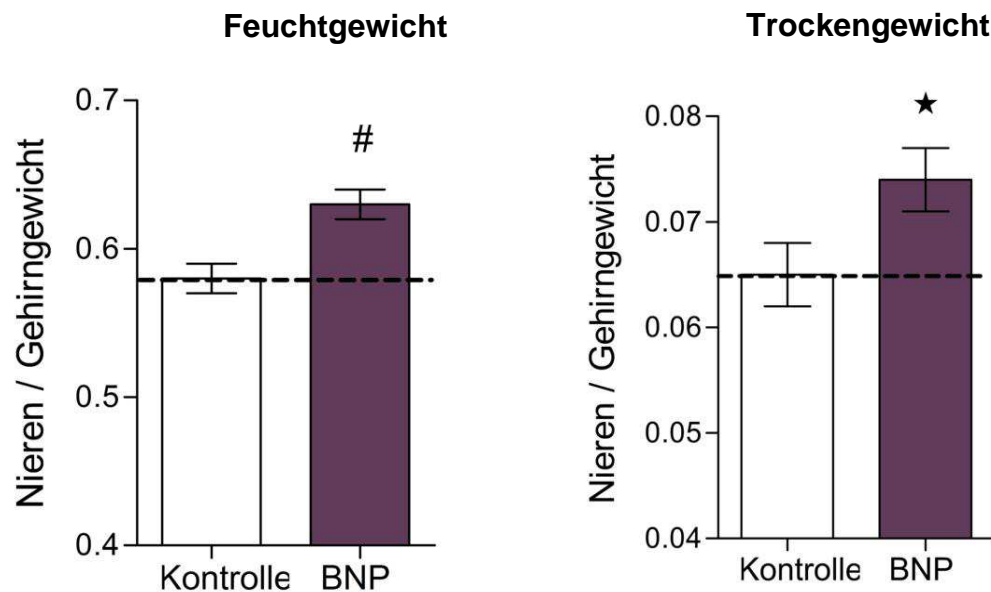


Abbildung 3.16: Feuchtwicht (links) und Trockengewicht (rechts) der Nieren in Bezug auf das Gehirngewicht der für 3 Tage mit BNP (2 ng / h pro g KG) behandelten Wildtypmäusen (n=9).

p < 0,01 vs. Kontrolle

* p < 0,05 vs. Kontrolle

Diese Daten bestätigen eine Bedeutung des BNPs an der Regulation des Nierenwachstums und der Funktion. Ob die gesteigerte Nierenfunktion durch eine direkte Wirkung des BNPs auf die Niere zurückzuführen ist, wurde im folgenden Experiment untersucht.

3.5 Die Wirkung des BNPs auf die Nierenfunktion am Modell der „isoliert perfundierten Niere“

Die Wirkung des BNPs auf die Niere ohne Einfluss durch systemische Faktoren wurde mithilfe des Modells der „isoliert perfundierten Niere“ untersucht. Dieses erlaubt eine Perfusion der Niere mit einem definierten Perfusionspuffer und einem konstanten Druck, der einen wesentlichen Kontrollmechanismus der GFR darstellt. Im Gegensatz zu *in vivo*-Experimenten kann dementsprechend in der isoliert perfundierten Niere die Regulation der Nierenfunktion unter definitivem Ausschluss systemischer Regulationsmechanismen untersucht werden.

Wie in Abbildung 3.17 dargestellt ist, wurde der Perfusatfluss durch die Niere der Wildtypmäuse abhängig von der BNP Konzentration stetig gesteigert. Diese Dosis-Wirkungskurve war bei den GC-A Knockoutmäusen nicht gegeben.

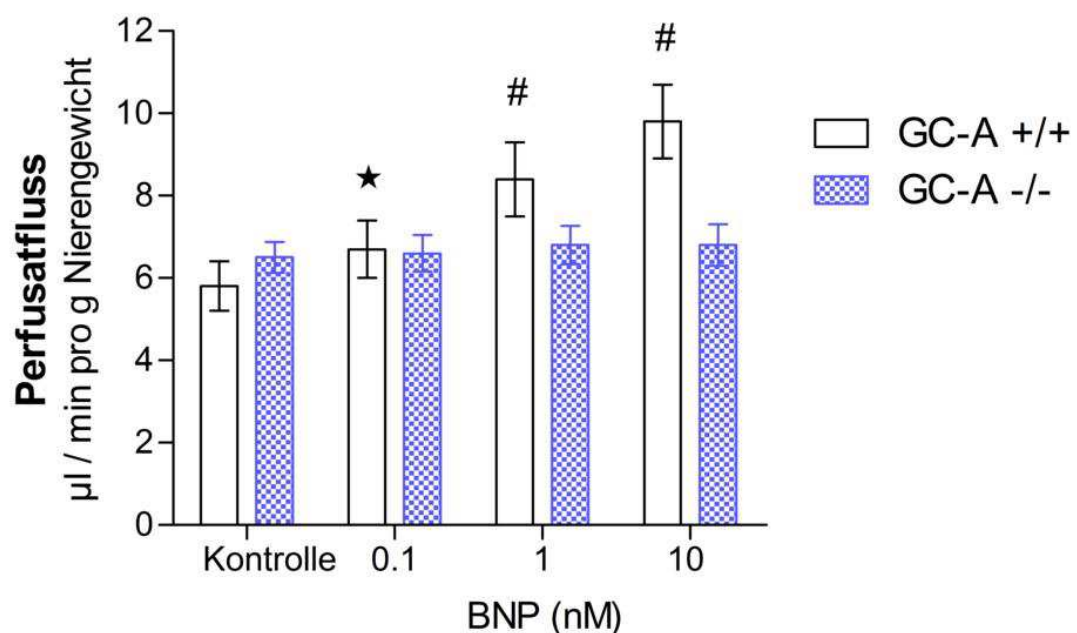


Abbildung 3.17: Der Perfusatfluss in der isoliert perfundierten Niere von Wildtypen (n=6) und GC-A Knockoutmäusen (n=2) in Abhängigkeit von BNP.

*p < 0,05 vs. Kontrolle

p < 0,01 vs. Kontrolle

Neben der Steigerung des Perfusatflusses wurde auch die GFR der Wildtypmäuse, welche unter Kontrollbedingungen bei etwa 330 $\mu\text{l}/\text{min}$ pro g Nierengewicht lag, abhängig von der BNP Konzentration erhöht. Eine Zugabe von 0,1 nM BNP zum Perfusionsmedium führte zu einer moderaten Stimulation der Nierenfunktion, wohingegen eine BNP Konzentration von 1 oder 10 nM die glomeruläre Filtrationsrate der isolierten Niere verdoppelte (Abbildung 3.18). Bei der untersuchten GC-A Knockoutmaus war durch BNP-Applikation keine Steigerung der GFR gegeben.

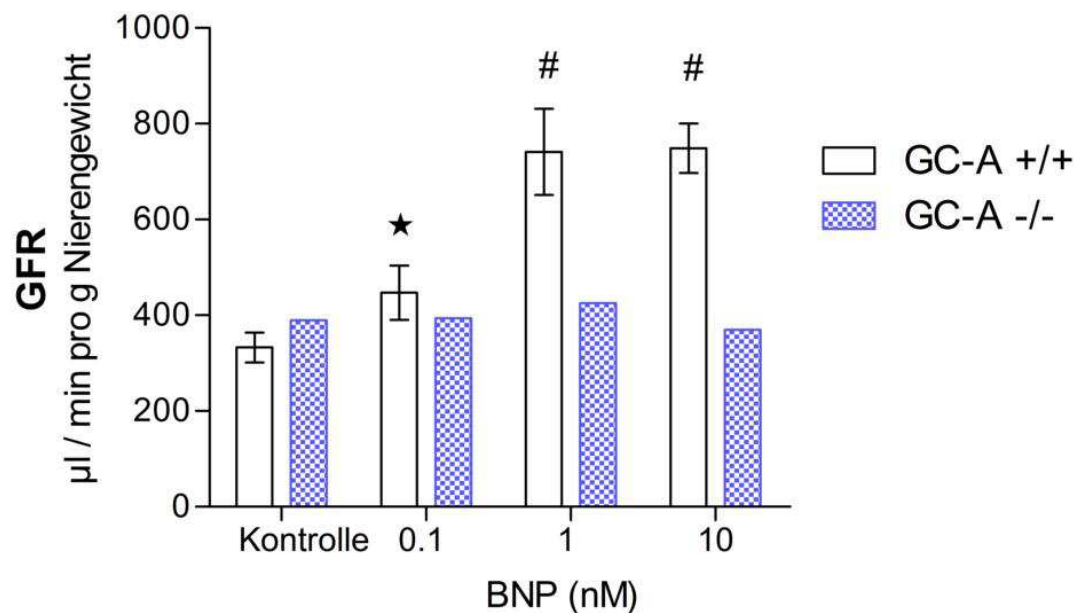


Abbildung 3.18: Die GFR der isoliert perfundierten Niere von Wildtypen (n=6) und einer GC-A Knockoutmaus in Abhängigkeit von BNP.

*p < 0,05 vs. Kontrolle

p < 0,01 vs. Kontrolle

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich der stimulierende Effekt von BNP auf die Nierenfunktion aus einer direkten renalen, nicht aus systemischen Wirkungen von BNP ergibt. Der Versuch an der isoliert perfundierten Niere von GC-A Knockoutmäusen bestätigte zudem, dass BNP seine Wirkung auf die Nierenfunktion über Aktivierung der GC-A entfaltet. Weder der Perfusatfluss noch die GFR konnte ohne die Guanylatzyklase-A durch BNP gesteigert werden.

3.6 In Vitro – Untersuchungen

Die bisher dargestellten *in vivo*- Versuche belegen eine Beteiligung des BNP/GC-A Systems an der initialen Entwicklung der kompensatorischen renalen Hypertrophie infolge einer unilateralen Nephrektomie. Es gibt klare Hinweise dafür, dass das B-Typ natriuretische Peptid durch Induktion einer Hyperfiltration das Wachstum der verbleibenden Niere auslösen könnte. Gemäß der „workload“-Hypothese löst der erhöhte tubuläre Fluss, welcher sich durch die gesteigerte GFR ergibt, die Hypertrophie des proximalen Tubulus aus. Um diese Hypothese zu untersuchen, entwickelte ich ein *in vitro* - Flussmodell, das eine Imitation der Flusssteigerung erlaubt.

3.6.1 Charakterisierung der verwendeten Zellmodelle

Für die *in vitro* - Flusseexperimente wurde eine porcine proximale Tubuluszelllinie, den sogenannten LLC PK₁ Zellen verwendet. Zudem wurden primäre proximale Tubuluszellen aus der Maus isoliert (PTC). Diese wurden ergänzend zu der LLC PK₁ Zelllinie untersucht, um den gewonnenen Erkenntnissen mehr Aussagekraft beimessen zu können. Zunächst galt zu klären, ob beide Zellmodelle für diese Versuche geeignet und generell in der Lage sind, zu hypertrophieren. Zunächst wurde ein Augenmerk auf das primäre Zilium der Nierenepithelzellen gerichtet. Dieses besitzt sensorische Funktion und dient als Flusssensor [132]. Beim primären Zilium handelt es sich um eine haarförmige Ausstülpung der apikalen Membran, dessen Achsenskelett aus neun Mikrotubuluspaaren aus α - und β -Tubulin besteht. Durch immunhistochemische Fluoreszenzfärbung des α -Tubulins konnte dieses sowohl in den primär aus der Maus isolierten (Abbildung 3.19) als auch in den LLC PK₁ Zellen (Abbildung 3.20) detektiert werden.

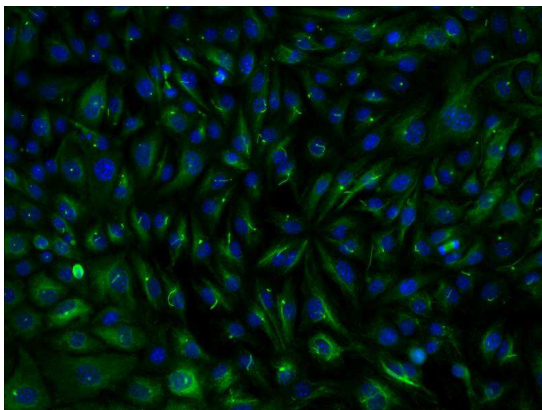


Abbildung 3.19: Immunfärbung von α -Tubulin und Hoechst 33342 in primären proximalen Tubuluszellen.

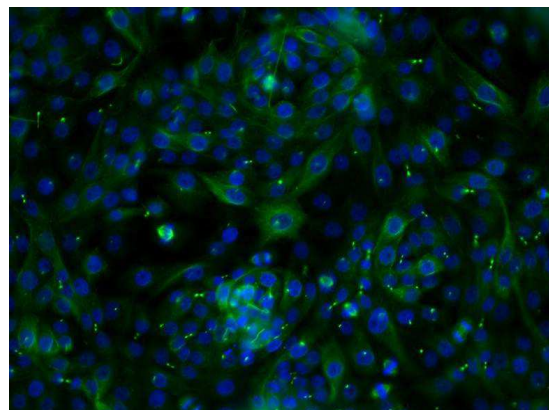


Abbildung 3.20: Immunfärbung von α -Tubulin und Hoechst 33342 in LLC PK₁ Zellen.

Zur weiteren Charakterisierung des Modells wurden LLC PK₁ (Abbildung 3.22) mit 100 nM EGF oder 100 pM TGF β für 20 Stunden inkubiert und anschließend ihr Proteingehalt sowie ihre Konzentration an DNA bestimmt. Es ist bekannt, dass TGF β durch Induktion eines Zellzyklusarrestes in der späten G₁ Phase eine zelluläre Hypertrophie vermittelt. EGF dagegen stimuliert eine Proliferation der Zellen, was in diesem Versuch als Negativkontrolle diente.

Dargestellt in Abbildung 3.21 konnte TGF β auch in diesem Zellmodell eine Hypertrophie und EGF eine Hyperplasie auslösen. Die mit TGF β inkubierten Zellen steigerten ihre Proteinsynthese anstatt zu proliferieren. Die Proteinkonzentration in Bezug auf die DNA war somit gegenüber den Kontrollzellen deutlich erhöht. Die Zellen, welche mit EGF inkubiert worden waren, wiesen einen signifikanten Anstieg sowohl der Protein- als auch der DNA-Konzentration verglichen mit der Kontrolle auf. Das Protein/DNA Verhältnis blieb demnach gleich den Kontrollzellen.

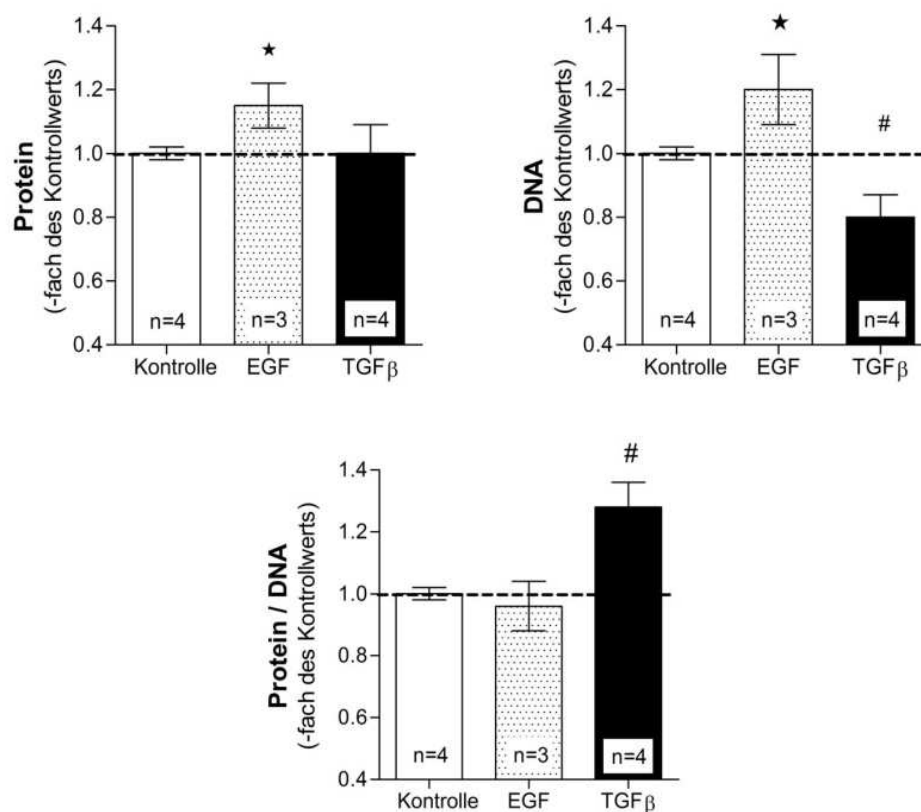


Abbildung 3.21: Protein- und DNA-Konzentration der LLC PK₁ Zellen nach Inkubation mit EGF (100 nM) und TGF β (100 pM).

*p < 0,05 vs. Kontrolle

p < 0,01 vs. Kontrolle

Neben den LLC PK₁ konnte auch in den primären proximalen Tubuluszellen eine Hypertrophie durch TGF β und eine Hyperplasie durch EGF induziert werden (ohne Abbildung).

Da eine Möglichkeit der verwendeten Zellmodelle zur Hypertrophie bestand, wurden diese zur Untersuchung der „workload“-Hypothese herangezogen.

3.6.2 Superfusion von proximalen Tubuluszellen

Das entwickelte *in vitro* - Flusssystem ermöglichte eine Superfusion der proximalen Tubuluszellen mit unterschiedlichen im physiologischen Bereich liegenden Flussgeschwindigkeiten [133]. Für die Superfusionsversuche wurde Serum- und Hormon-freies Medium verwendet. Dabei ergab sich tatsächlich eine Fluss-abhängige Zunahme des Protein/DNA Verhältnisses, das Maß für die Hypertrophie, der LLC PK₁ Zellen und der primär isolierten murinen proximalen Tubuluszellen (Abbildung 3.22). Beide Zellmodelle verhielten sich gleichsinnig. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,25 mm/s nahm das Protein/DNA Verhältnis der LLC PK₁ Zellen um 7 %, der primären proximalen Tubuluszellen um 10 % gegenüber der statisch inkubierten Zellen zu. Bei Erhöhung des Flusses auf eine Geschwindigkeit von 0,5 mm/s war auch ein Anstieg der Protein/DNA Ratio beider Zellmodelle zu beobachten. Die LLC PK₁ und die primär isolierten proximalen Tubuluszellen steigerten ihren Proteingehalt im Bezug auf die DNA-Konzentration um weitere 29 % bzw. 28 %. Bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 1 mm/s wurde ein Maximum erreicht, welches eine Zunahme der Zellhypertrophie um 50 % ausmacht. Nach weiterer Steigerung des Flusses auf 2 mm/s hypertrophierten beide Zelltypen zwar, jedoch verringerte sich der Anstieg gegenüber des Maximalwertes. Der Fluss induzierte lediglich eine Zunahme des Protein/DNA Gehaltes der LLC PK₁ Zellen um 36 %, der primären Zellen um 29 % im Bezug auf die statischen Kontrollzellen.

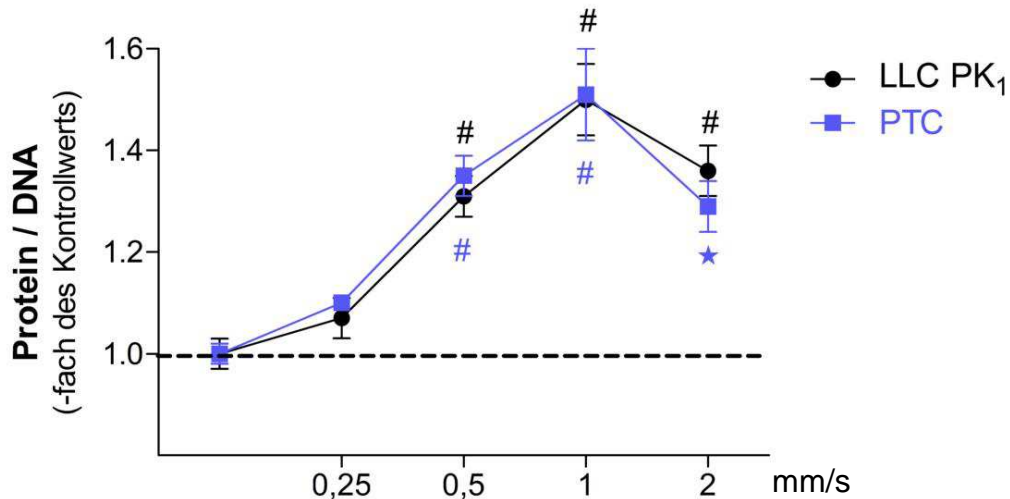


Abbildung 3.22: Superfusion der LLC PK₁ (n=3) und der primären proximalen Tubuluszellen (PTC, n=3) für 20 Stunden führte zu einer Fluss-abhängigen Zunahme des Protein/DNA Verhältnisses.

*p < 0,05 vs. statischen Kontrollzellen

p < 0,01 vs. statischen Kontrollzellen

Um eine Fluss-abhängige Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen zu verifizieren, wurde neben dem Protein/DNA Gehalt auch das Volumen und die Fläche der Zellen bestimmt. Das Zellvolumen beider Zelltypen war ebenfalls abhängig von den unterschiedlichen Flussraten (Abbildung 3.23). Bei einer Geschwindigkeit von 0,25 mm/s erhöhte sich das Volumen der LLC PK₁ zunächst kaum, das der primär isolierten proximalen Tubuluszellen um 7 %. Gleich dem Protein/DNA Verhältnis ergab eine Steigerung des Flusses auf 0,5 und 1 mm/s auch eine Zunahme des Volumens um 5 % und 21 % der LLC PK₁ und um 8 % und 11 % der primären Zellen. Auch das Zellvolumen erreichte bei 1 mm/s eine maximale Zunahme. Eine weitere Flusssteigerung hatte eine verminderte Hypertrophie beider Zellmodelle verglichen mit dem erreichten Maximum an Volumenzunahme zur Folge.

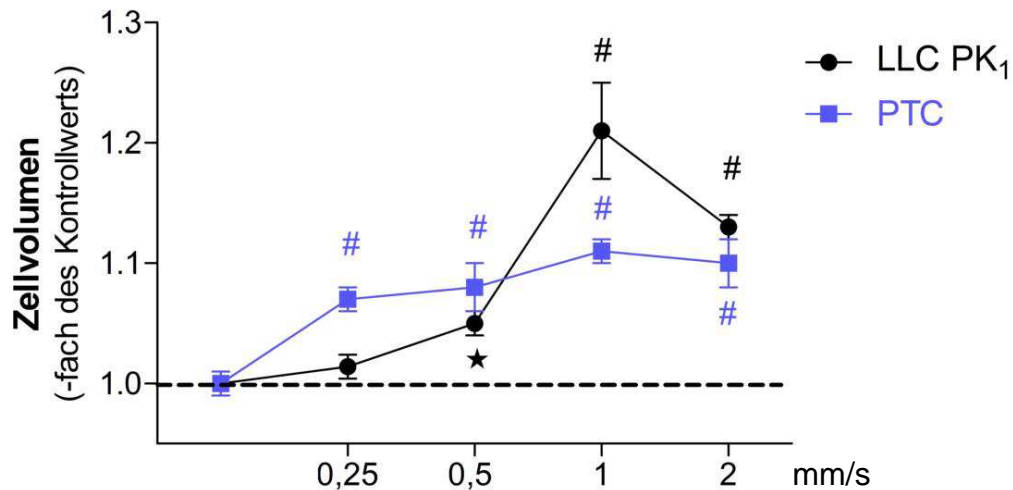


Abbildung 3.23: Superfusion der LLC PK₁ (n=3) und der primären proximalen Tubuluszellen (PTC, n=3) für 20 Stunden führte zu einer Fluss-abhängigen Zunahme des Zellvolumens.

*p < 0,05 vs. statischen Kontrollzellen

p < 0,01 vs. statischen Kontrollzellen

Des Weiteren wurden unter statischer Bedingung inkubierte und mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s superfundierte primär isolierte proximale Tubuluszellen mikroskopiert und ihre Fläche mithilfe der „AxioVision Software“ von Zeiss durch Umranden der Zellen bestimmt. Dabei wurden 20 Zellen pro Well, insgesamt 10 Wells pro Bedingung ausgewertet. Die PTCs unter statischer Bedingung wiesen eine Fläche von $614 \pm 15 \mu\text{m}^2$, die superfundierten Zellen eine Fläche von $730 \pm 41 \mu\text{m}^2$ auf. Somit ergab sich durch die Superfusion mit 1 mm/s, bei welcher sich das Maximum an Hypertrophie einstellte, eine Zellflächenvergrößerung um 19 % (Abbildung 3.24).

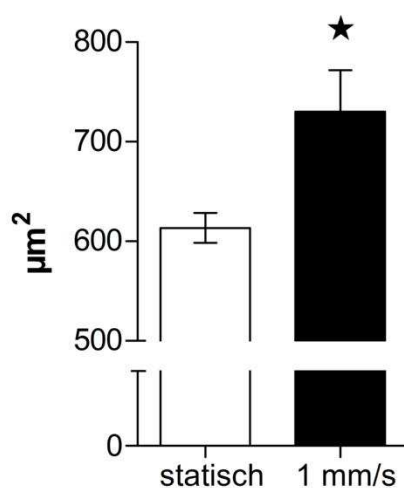


Abbildung 3.24:

Flächenzunahme der für 20 Stunden mit 1 mm/s superfundierten primären proximalen Tubuluszellen.

*p < 0,05 vs. statischen Kontrollzellen

Eine Abhängigkeit der Zellhypertrophie vom Fluss kann demnach angenommen werden.

3.6.2.1 Superfusion anderer Nierenzellen

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob eine Flussteigerung speziell auf proximale Tubuluszellen eine hypertrophierende Wirkung vermittelt. Dazu wurden M1 Zellen, einer aus dem Sammelrohr der Maus stammenden Zelllinie, und MDCK Zellen, einer caninen distalen Tubuluszelllinie, mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s superfundiert. Die Abbildung 3.25 zeigt, dass das Protein/DNA Verhältnis beider Zellmodelle zwar leicht tendenziell zunahm, allerdings war diese Zunahme deutlich vermindert gegenüber der proximalen Tubuluszellen, welche eine Hypertrophie von etwa 50 % bei einer Geschwindigkeit von 1 mm/s aufwiesen.

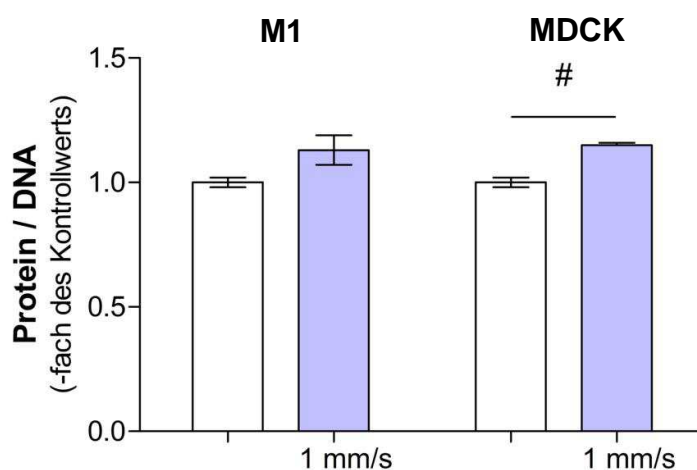


Abbildung 3.25: Superfusion der M1 (n=2) und der MDCK Zellen (n=2) für 20 Stunden mit 1 mm/s.

p < 0,01 vs. statischen Kontrollzellen

In den nachfolgenden Versuchen galt zu untersuchen, über welchen Fluss-abhängigen Mechanismus die Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen vermittelt wird. Dabei wurde die Geschwindigkeit von 1 mm/s gewählt, bei welcher sich ein Maximum an Hypertrophie einstellte.

3.6.2.2 Die Beteiligung verschiedener Transportproteine des proximalen Tubulus

Durch die Mehrbelastung, die sich aus der gesteigerten GFR ergibt, müsste das Substratangebot im proximalen Tubulus zunehmen. Ob dieser erhöhte Transport im Tubulus das Fluss-abhängige Wachstum der Zellen auslöst, wurde mittels Inkubation der proximalen Tubuluszellen mit Inhibitoren des Na⁺/Glucose-Kotransporters (Phloridzin) oder des Na⁺/H⁺-Austauschers (EIPA) während der Superfusion untersucht.

Zunächst wurde der Na⁺/Glucose-Kotransporter SGLT1 mit Phloridzin (1mM) während des Flusses blockiert, wobei sich eine stark verminderte Hypertrophie der Zellen gegenüber den unter Kontrollbedingungen superfundierten Zellen ergab (Abbildung 3.26). Die Superfusion mit Phloridzin im Superfusionsmedium induzierte lediglich eine tendenzielle Zunahme des Protein/DNA Verhältnisses der LLC PK₁ um 13 % (n.s.) und der primär isolierten murinen proximalen Tubuluszellen um 3 % (n.s.) im Vergleich zu den mit Phloridzin inkubierten statischen Zellen. Die Zellen, welche mit dem Kontrollmedium superfundiert worden waren, hypertrophierten deutlich. Von einer möglichen Beteiligung des Glucosetransportes an der Fluss-induzierten Zellhypertrophie kann somit ausgegangen werden

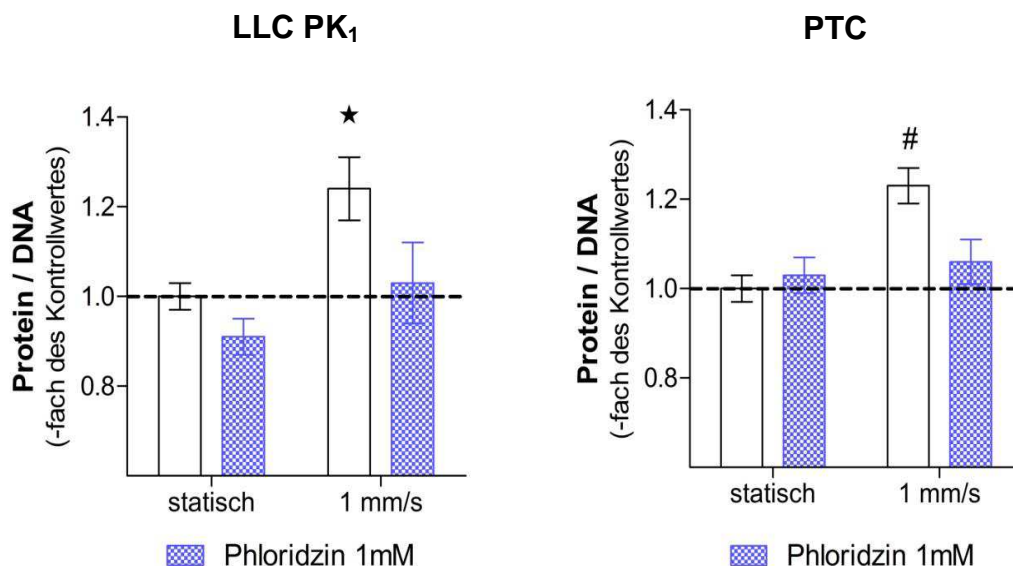


Abbildung 3.26: Protein/DNA Verhältnis nach Inkubation der LLC PK₁ (links, n=2) und der primären proximalen Tubuluszellen (rechts, n=4) mit Phloridzin (1mM) während der Superfusion

*p < 0,05 vs. statischen Kontrollzellen

p < 0,01 vs. statischen Kontrollzellen

Des Weiteren wurden LLC PK₁ Zellen mit EIPA während der Superfusion inkubiert, um die Rolle des Na⁺/H⁺-Antiporters NHE₃ zu überprüfen (Abbildung 3.27). Diese Untersuchung ergab keine Anhaltspunkte für eine Relevanz dieses Transporters bei der Superfusions-abhängigen Hypertrophie. Die durch Fluss induzierte Steigerung der Proteinkonzentration im Bezug zur DNA wurde durch Inkubation mit EIPA nicht vermindert.

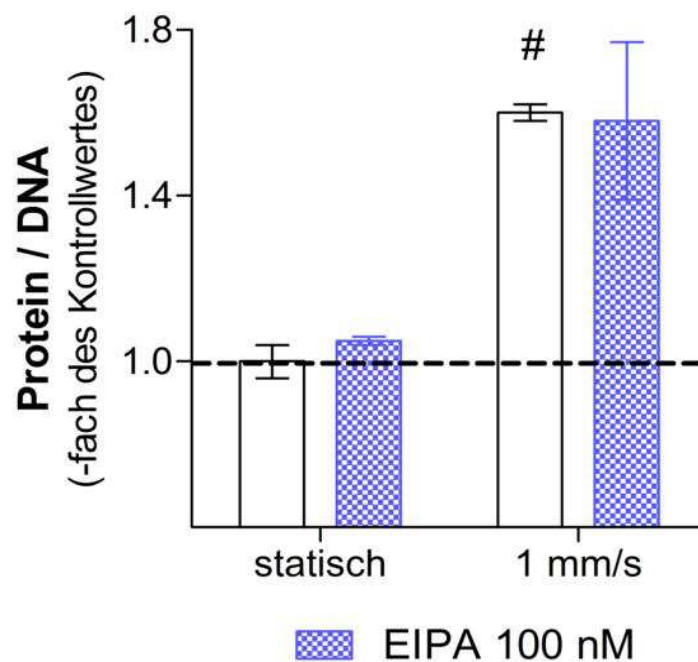


Abbildung 3.27: Protein/DNA Verhältnis nach Inkubation der LLC PK₁ Zellen mit EIPA (100 nM) während der Superfusion (n=2).

p < 0,01 vs. statischen Kontrollzellen

Die Beobachtungen zum Einfluss der Transporter SGLT1 und NHE₃ auf die durch Flusssteigerung vermittelte Hypertrophie proximaler Tubuluszellen sprechen für eine Beteiligung des SGLT1, aber gegen eine Rolle des NHE₃.

3.6.2.3 Der mTor Signalweg

Der mTor Signalweg, welcher die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die Proteinsynthese und das Zellwachstum vermittelt und dem eine Beteiligung an dem kompensatorischen Nierenwachstum nach Uninephrektomie zugeschrieben wird [61], ist nicht an der Fluss-induzierten Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen involviert. Dies zeigt die Inkubation der LLC PK₁ Zellen mit dem mTor Inhibitor Rapamycin (40 nM). Das Protein/DNA Verhältnis war zwar sowohl unter statischer Bedingung als auch unter Superfusion gegenüber den Kontrollzellen vermindert, dennoch konnte das Zellwachstum durch Erhöhung der Flussrate gesteigert werden (Abbildung 3.28). Der mTor Signalweg scheint generell eine Rolle bei der Hypertrophie zu spielen, allerdings ist dieser nicht an der Fluss-induzierten Hypertrophie beteiligt.

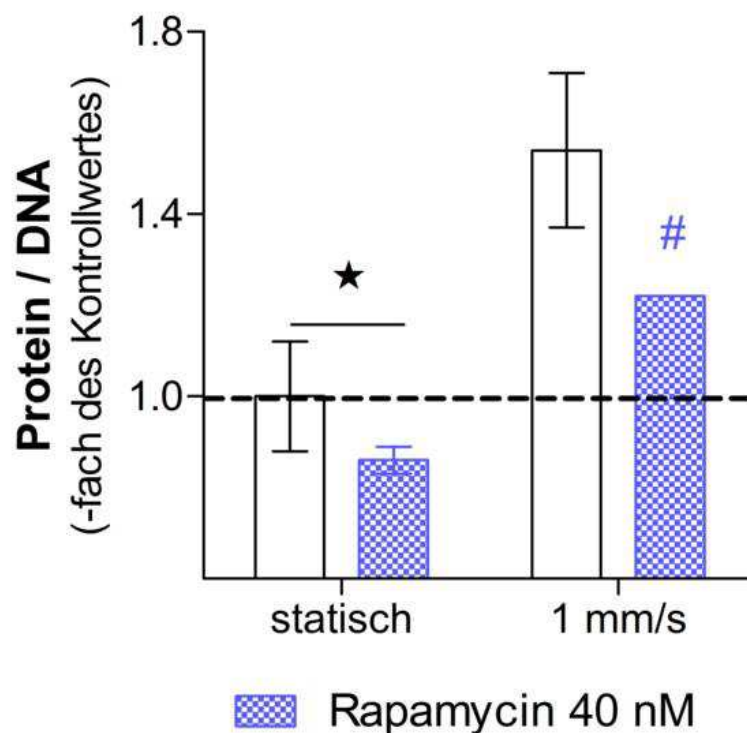


Abbildung 3.28: Protein/DNA Verhältnis nach Inkubation der LLC PK₁ Zellen mit Rapamycin (40 nM) während der Superfusion (n=2).

p < 0,01 vs. statischen mit Rapamycin inkubierten Zellen

*p < 0,05 vs. statischen Kontrollzellen

3.6.2.4 Die Rolle des Transforming Growth Factors β (TGF β)

Darüber hinaus konnte eine Beteiligung von TGF β , dessen hypertrophierende Wirkung auf proximale Tubuluszellen bekannt ist, an der Fluss-abhängigen Hypertrophie gezeigt werden. LLC PK $_1$ Zellen wurden während der Superfusion von 1 mm/s mit dem TGF β Rezeptor Inhibitor SB431542 (10 μ M) inkubiert. Während der Protein/DNA Gehalt der im Kontrollmedium superfundierten Zellen signifikant um 35 % gegenüber den statischen Zellen anstieg, wiesen die mit SB431542 superfundierten Zellen

lediglich eine Zunahme von 5 % verglichen mit den SB431542 behandelten statischen Zellen auf (Abbildung 3.29).

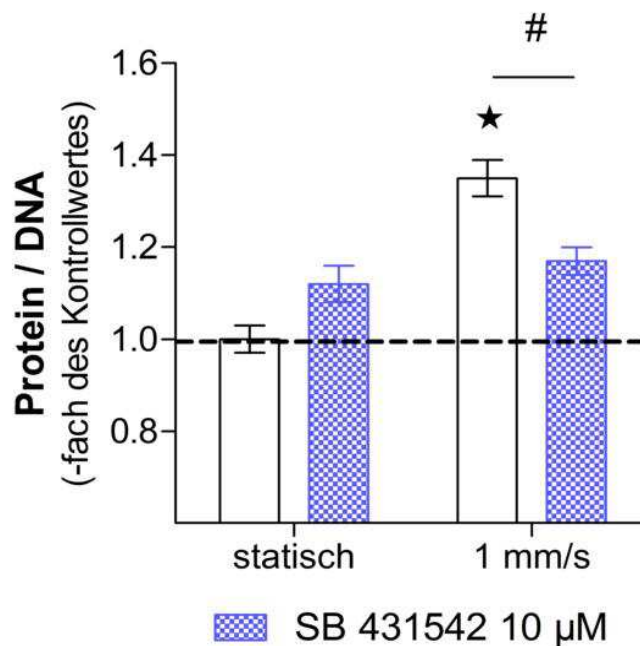


Abbildung 3.29: Protein/DNA Verhältnis nach Inkubation der LLC PK $_1$ Zellen mit SB 431542 (10 μ M) während der Superfusion (n=6).

*p < 0,05 vs. statischen Kontrollzellen

p < 0,01 vs. superfundierten Kontrollzellen

Zur Bestätigung dieser Daten wurde zudem das Zellvolumen nach Superfusion unter den gleichen experimentellen Bedingungen bestimmt (Abbildung 3.30). Gleichsinnig zum Protein/DNA Gehalt zeigte sich ein deutliches Fluss-induziertes Zellwachstum der Kontrollzellen (27 %), aber nur eine tendenzielle Zellvergrößerung der mit SB431542 inkubierten LLC PK $_1$ Zellen durch Superfusion mit 1 mm/s (11 %, n.s.).

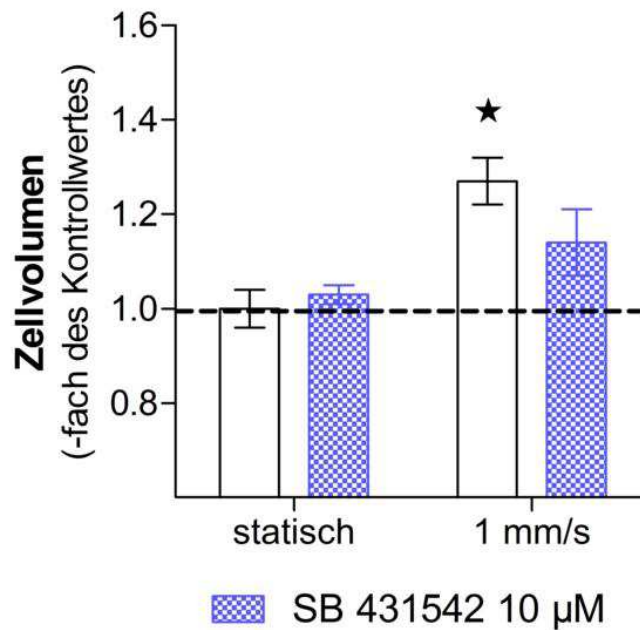


Abbildung 3.30: Zellvolumen nach Inkubation der LLC PK₁ Zellen mit SB 431542 (10 μM) während der Superfusion (n=2).

*p < 0,05 vs. statischen Kontrollzellen

3.6.2.5 Transfer des konditionierten Mediums

Angesichts der abgeschwächten Fluss-induzierten Hypertrophie durch Blockade des TGFβ Rezeptors sowie der Tatsache, dass kein TGFβ dem Serum- und Hormon-freien Medium zugegeben worden war, wurde geprüft, ob die Zellen während der Superfusion Faktoren sezernieren, die auto- oder parakrin stimulierend auf das Wachstum wirken. Dazu wurde das konditionierte Medium sowohl der superfundierten als auch der unter statischer Bedingung inkubierten LLC PK₁ Zellen auf neu ausgesäte Zellen übertragen. Tatsächlich hypertrophierten die Zellen, welche mit dem superfundierten Medium inkubiert worden waren. Das Protein/DNA Verhältnis dieser Zellen nahm gegenüber den im Medium der Kontrollzellen inkubierten Zellen signifikant um 23 % zu. Der Proteingehalt in Bezug zur DNA Konzentration unterschied sich nicht zwischen dem konditionierten Medium der statischen Zellen und den Kontrollzellen mit frischem Medium.

Wenn das konditionierte Medium vor Übertragung zur Denaturierung und somit zur Inaktivierung der Proteine gekocht worden war, konnte keine Hypertrophie der Zellen mehr ausgelöst werden. Das Protein/DNA Verhältnis der LLC PK₁ Zellen, die mit dem

gekochten Superfusionsmedium inkubiert worden waren, war gleich der Zellen mit dem gekochten konditionierten und dem gekochten Kontrollmedium (Abbildung 3.31).

Demnach scheinen die proximalen Tubuluszellen während der Superfusion ein oder auch mehrere Proteine, beispielsweise TGF β zu sezernieren, die eine hypertrophierende Wirkung entfalten.

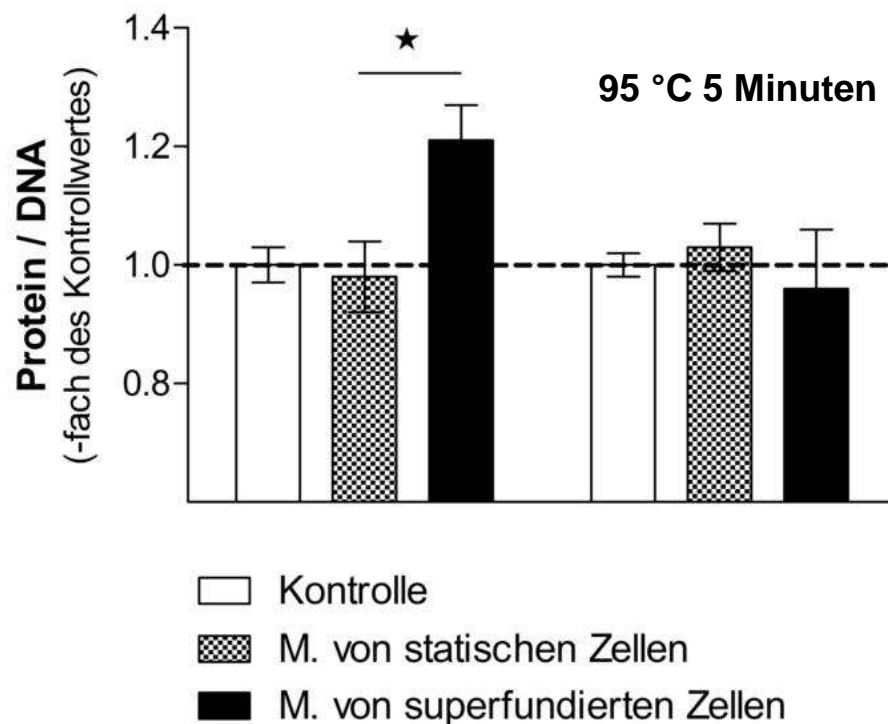


Abbildung 3.31: Protein/DNA Verhältnis nach Inkubation von LLC PK₁ mit konditioniertem Medium von statischen und superfundierten Medium (n=5).

*p < 0,05

3.6.3 Direkter Effekt natriuretischer Peptide auf die Hypertrophie des proximalen Tubulus

Auch stellte sich die Frage, ob die natriuretischen Peptide selbst als „Wachstumsfaktoren“ direkt an der Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen beteiligt sind. Dazu wurden frisch aus der Maus isolierte proximale Tubuli mit BNP in unterschiedlichen Konzentrationen für 20 Stunden inkubiert (Abbildung 3.32). Ab einer Konzentration von 1 nM ergab sich eine deutliche Dosis-Wirkungskurve. Die Inkubation der proximalen Tubuli mit der höchsten untersuchten Konzentration von 100 nM resultierte in eine Zunahme des Protein/DNA Verhältnisses um 19 % gegenüber der

Kontrolle. Zudem sollte eine Inkubation der proximalen Tubuli mit ANP klären, ob die direkte wachstumsfördernde Wirkung auf den proximalen Tubulus spezifisch für BNP ist. Dargestellt in Abbildung 3.33 zeigte sich auch durch Inkubation mit 100 nM ANP eine Zunahme des Proteingehaltes bezogen auf die DNA-Konzentration von 28 % gegenüber der Kontrollzelle. Die natriuretischen Peptide scheinen schließlich generell einen Hypertrophie-stimulierenden Effekt *in vitro* zu haben.

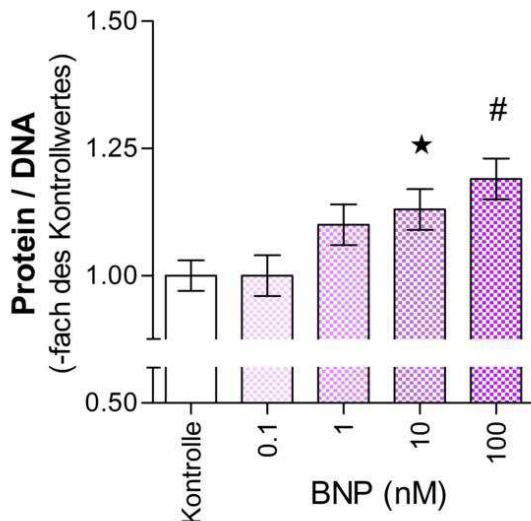


Abbildung 3.32: Protein/DNA Verhältnis nach Inkubation von frisch isolierten proximalen Tubuli aus der Maus (n=2) mit BNP.

p < 0,01

* p < 0,05

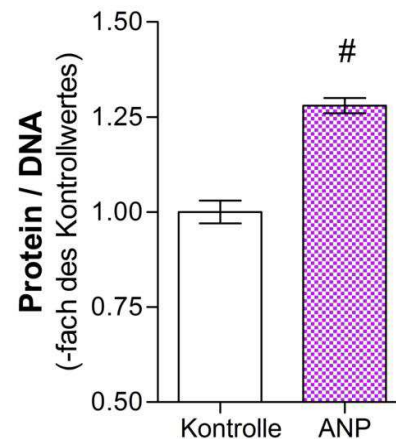


Abbildung 3.33: Protein/DNA Verhältnis nach Inkubation von frisch isolierten proximalen Tubuli aus der Maus (n=3) mit 100 nM ANP

p < 0,01

4. Diskussion

Das Phänomen der kompensatorischen renalen Hypertrophie infolge des Verlustes von Nierengewebe ist schon sehr lange bekannt. Durch welchen Signalweg jedoch dieser Verlust an das verbleibende Nierengewebe vermittelt und dessen Wachstum und Funktionssteigerung ausgelöst wird, ist noch weitgehend unbekannt. Da zahlreiche Studien belegen, dass die Funktionsanpassung zu einem früheren Zeitpunkt als das Wachstum der verbleibenden Niere eintritt [32, 35, 134], wurde die sogenannte „workload“-Hypothese aufgestellt. Diese postuliert die tubuläre Mehrbelastung, die sich aus der erhöhten glomerulären Filtrationsrate ergibt, als Auslöser der Hypertrophie des proximalen Tubulus. Durch welche Faktoren die glomeruläre Filtrationsrate nach Verlust von Nierengewebe gesteigert wird, ist jedoch bisweilen noch unbekannt. Allerdings ist seit den 60er Jahren unter anderem basierend auf Versuchen an parabiotischen Tieren die Existenz eines zirkulierenden Faktors beschrieben [62]. Die Identifizierung dieses zirkulierenden Faktors sowie die Untersuchung der „workload“-Hypothese waren Gegenstand dieser Arbeit.

Zunächst wurden Wildtypmäuse einseitig nephrektomiert, um eine kompensatorische Hypertrophie der verbleibenden Niere zu induzieren. Die Uninephrektomie stellt ein etabliertes Modell zur Untersuchung dieses Phänomens dar und ist zudem im Rahmen einer Nierenlebenspende oder einer Tumoroperation klinisch hoch relevant.

Die Uninephrektomie der Mäuse zeigte eine schnelle funktionelle Anpassung der verbleibenden Niere. Die Diurese und Natriurese verdoppelte sich schon nach 72 Stunden (Abbildung 3.1). Aufgrund dieser stark erhöhten Harn- und Salzausscheidung und der gesteigerten glomerulären Filtrationsrate, die bei einer kompensatorischen renalen Hypertrophie gegeben ist [41, 135], wurde eine Beteiligung der natriuretischen Peptide in Betracht gezogen. Zu den natriuretischen Peptiden zählen unter anderem das atriale (ANP) und das B-Typ natriuretische Peptid (BNP), welche hauptsächlich in den Myozyten des Herzens synthetisiert werden. ANP und BNP gelten als wichtige Regulatoren der Nierenfunktion. Sie fördern die Diurese und Natriurese und steigern die GFR vorwiegend über Dilatation der afferenten und/oder Kontraktion der efferenten Arteriole [108, 109]. Durch die stimulierende Wirkung auf die Harn- und Salzausscheidung und ihres vasodilatorischen Effekts sind die natriuretischen Peptide auch wesentlich an der Regulation des systemischen Blutdruckes beteiligt. In der Literatur sind wenige, und zudem widersprüchliche, Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen ANP und der kompensatorischen renalen Hypertrophie zu finden. Valentin und Kollegen zeigten, dass die ANP Konzentration 120 Minuten nach

Uninephrektomie im Plasma von Ratten ansteigt und dass die gesteigerte Diurese und Natriurese infolge der Uninephrektomie auf die erhöhte Plasmakonzentration von ANP zurückzuführen ist [136]. Die ANP Synthese und Freisetzung wurde dazu durch Entfernen des rechtsatrialen Appendix gehemmt (APX). Unmittelbar nach Uninephrektomie der Ratten zeigten sich bei den Kontrolltieren eine deutliche Zunahme der Diurese und Natriurese sowie der cGMP Konzentration im Urin und der ANP Plasmakonzentration. Bei den APX-Tieren blieben diese Effekte vollkommen aus. Logan und Michael beschrieben dagegen drei Jahre später eine Hemmung des kompensatorischen Nierenwachstums bei Ratten durch ANP [137]. Sie infundierten den Ratten 48 Stunden nach Uninephrektomie ANP in einer Konzentration von 0,2 µg/250 g KG pro Minute für insgesamt zwei Stunden. Dabei zeigte sich, dass durch die ANP Infusion die Zunahme des Protein/DNA und des RNA/DNA Verhältnisses der verbleibenden Nieren 18 Stunden nach Uninephrektomie gegenüber den Kontrolltieren vermindert war. Darüber hinaus wurden durch Zellkulturstudien ein hypertrophierender Effekt von ANP auf primäre proximale Tubuluszellen von Kaninchen beschrieben [138]. Ein Bezug zu BNP ist bisweilen in der Literatur nicht gegeben. Jedoch wird dem BNP eine antiproliferative Wirkung insbesondere auf kardiale Fibroblasten zugeschrieben [5, 139].

Unsere Untersuchungen an uninephrektomierten Mäusen legen tatsächlich eine Beteiligung des B-Typ natriuretischen Peptids an der kompensatorischen renalen Hypertrophie nahe. Sowohl die Konzentration im Plasma (Abbildung 3.2) als auch die Genexpression von BNP im Herzen (Abbildung 3.4), das als Hauptsyntheseorgan gilt, war in den uninephrektomierten gegenüber den „zum Schein“-operierten Mäusen nach 72 Stunden deutlich erhöht. Dagegen hatte die einseitige Nephrektomie weder die Synthese noch die Plasmakonzentration von ANP beeinflusst. Dieser Befund wurde mittlerweile auch durch eine Kooperationsstudie mit der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Regensburg (Dr. S. Buchner und Prof. Dr. A. Luchner) unterstützt (Ergebnisse noch nicht veröffentlicht). Nierenspender wiesen infolge der einseitigen Nierenentnahme erhöhte Spiegel des NT-proBNPs im Plasma auf. NT-proBNP ist neben BNP ein Spaltprodukt des proBNPs und wird aufgrund seiner großen Stabilität in der klinischen Routine als Maß für die BNP Bildung bestimmt. Nachdem die NT-proBNP Konzentration im Plasma unmittelbar nach Operation deutlich anstieg, fiel sie zwei Wochen postoperativ wieder ab. Ob ein Abfall der BNP Konzentration auch bei den uninephrektomierten Mäusen gegeben ist, wird gegenwärtig untersucht.

Im Widerspruch zur Literatur [2, 140, 141] steht allerdings unser Befund, dass die Kontrollmäuse eine doppelt so hohe BNP wie ANP Konzentration aufweisen. Beispielsweise ist beim Menschen die ANP Konzentration etwa um das 10-fache höher

als die BNP Konzentration im Plasma [2]. Diese Diskrepanz könnte am ehesten durch die Instabilität des ANPs erklärt werden. Während BNP beim Menschen mit einer HWZ von etwa 20 Minuten relativ stabil ist, ist das ANP mit einer HWZ von nur 3 Minuten sehr instabil [2]. Beide Peptide werden über zwei Mechanismen abgebaut. Zum Einen über Bindung an den membranständigen natriuretischen Peptidrezeptor-C (NPR-C), welcher als Clearance-Rezeptor fungiert und durch Internalisierung ANP und BNP dem lysosomalen Abbau zuführt. Zum Anderen über die Aktivität der neutralen Endopeptidase 24.11 (NEP). ANP hat verglichen mit BNP eine höhere Affinität zum NPR-C und wird zudem schneller von der NEP hydrolysiert [2, 90, 93, 94].

ANP und BNP entfalten ihre physiologische Funktion über Aktivierung der Guanylatzyklase-A. Die Bindung von ANP und BNP an den natriuretischen Peptidrezeptor-A führt zu einer Konformationsänderung der extrazellulären Domäne, wodurch die intrazelluläre Guanylatzyklase aktiviert und zur Bildung des Second Messengers cGMP aus GTP veranlasst wird. cGMP überträgt die Effekte der natriuretischen Peptide über Bindung an die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) auf die Zielgene [2, 77]. Die Aktivität der natriuretischen Peptide korreliert somit mit der intrazellulären Bildung von cGMP. Dementsprechend steht die Studie von Schlondorff und Weber in Übereinstimmung mit der erhöhten Plasmakonzentration von BNP in den untersuchten uninephrektomierten Mäusen. Bei Ratten stieg die cGMP Konzentration im Kortex der hypertrophierenden Niere nach einer Stunde stark an und blieb bis 72 Stunden nach Uninephrektomie um das 3-Fache erhöht [142]. Allerdings stimuliert neben den natriuretischen Peptiden auch NO die Synthese von cGMP. NO bewirkt über Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase die Bildung von cGMP und hat vor allem vasodilatorische Effekte [143-145]. Sigmon und Kollegen beschrieben im Jahr 2004 eine Rolle des NOs auch bei der kompensatorischen renalen Hypertrophie. Sie zeigten, dass die Zunahme des Nierengewichtes und des renalen Blutflusses zwei und sieben Tage nach Uninephrektomie von Ratten durch Hemmung der NO-Synthese durch L-NAME vermindert war [146]. Demnach lässt sich die erhöhte cGMP Konzentration in der hypertrophierenden Niere nicht zwingend auf die Aktivität der natriuretischen Peptide zurückführen.

Des Weiteren war in den eigenen Versuchen an Mäusen eine Regulation der Genexpression der Rezeptoren für die natriuretischen Peptide infolge der einseitigen Nierenentnahme zu beobachten (Abbildung 3.5). Die mRNA Abundanz des als Clearance-Rezeptor fungierenden NPR-C war in der hypertrophierenden Niere um 21 % gegenüber der Kontrollniere von „zum Schein“-operierten Tieren vermindert. Dieses Ergebnis spricht wiederum für eine erhöhte BNP Plasmakonzentration, da eine verminderte NPR-C Expression eine geringere BNP Degradation zur Folge hat. Jedoch

war in der hypertrophierenden Niere auch eine Abnahme der mRNA der GC-A, die die Wirkung von BNP vermittelt, von 22 % messbar. Ein Western Immunoblot bestätigte die Abnahme der renale GC-A Expression nicht. Auf Proteinebene gab es keinen Unterschied in der GC-A Menge zwischen den hypertrophierenden und den Kontrollnieren. (Abbildung 3.6). Allerdings ist die Abnahme von 22 % auf mRNA Ebene schwer durch einen Western Immunoblot detektierbar. Die Abnahme der GC-A Synthese könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass der Rezeptor durch eine länger anhaltende Exposition des Liganden degradiert oder seine Synthese gehemmt wird. Studien zeigten, dass die GC-A mRNA und die Rezeptoranzahl durch Stimulation mit ANP über einen längeren Zeitraum abnehmen [147, 148].

In weiterführenden Versuchen wurde die Beteiligung der natriuretischen Peptide an der kompensatorischen renalen Hypertrophie durch Experimente an Mäusen mit genetischer Deletion der GC-A überprüft. Dazu wurden Wildtypmäuse und GC-A Knockoutmäuse bezüglich ihrer funktionellen Anpassung und ihres kompensatorischen Nierenwachstums, ausgelöst durch eine Uninephrektomie, untersucht (Abbildung 3.7 - 3.10). Die Ausgangswerte waren bei beiden Genotypen gleich. Es zeigten sich keine Unterschiede in der glomerulären Filtrationsrate vor dem operativen Eingriff und im Gewicht der Kontrollniere (Tabelle 3.1 und 3.2). Bei den Wildtypmäusen kam es bereits 3-4 Tage nach Uninephrektomie zu einer starken Zunahme der glomerulären Filtrationsrate und des Nierengewichtes, sowohl des Feucht- als auch des Trockengewichtes. Die Analyse zu späteren Zeitpunkten (nach 18 und 42 Tagen) zeigte zwar einen weiteren Anstieg, allerdings konnte die in den ersten Tagen festgestellte immense Funktions- und Gewichtserhöhung der verbleibenden Niere zu späteren Zeitpunkten auch in einem weitaus größeren Zeitraum nicht mehr erreicht werden. Diese Daten stehen im Einklang mit den aus der Literatur bekannten Ergebnissen. Zahlreiche Arbeiten zeigen, dass das größte Maß an kompensatorischer renaler Hypertrophie in den ersten Tagen nach Verlust von Nierengewebe entsteht [35, 56, 149]. Eine Studie von Argiles und Kollegen bestätigten die rasche Anpassungsfähigkeit der verbleibenden Niere auch beim Menschen. 20 Nierenspender wiesen 2 Tage nach Operation eine deutliche Funktionssteigerung der kontralateralen Niere von 26 % auf, die sich bis zum untersuchten Zeitraum von 12 Tagen nicht weiter erhöhte [135]. Im Gegensatz zu den Wildtypmäusen waren diese rasche Funktionsanpassung und das deutlich ausgeprägte kompensatorische Nierenwachstum bei den GC-A Knockoutmäusen nahezu aufgehoben. Die GFR sowie das Feucht- und das Trockengewicht der verbleibenden Niere waren 3-4 Tage nach Uninephrektomie allenfalls tendenziell erhöht. Auch die Bestimmung des Protein/DNA Verhältnisses bestätigte dieses Ergebnis (Abbildung 3.10). Das Protein/DNA Verhältnis

gilt als Maß für die Hypertrophie, da sich die Gewichtszunahme allein durch Zellvergrößerung anstatt einer Zellvermehrung (Hyperplasie) ergibt. Während die DNA-Konzentration nahezu konstant bleibt, ergibt sich durch eine vermehrte Proteinsynthese und einen verminderten Proteinabbau ein erhöhter Proteingehalt im Gewebe [32]. Während es bei den Wildtypmäusen zu einer eindeutigen Zunahme des Protein/DNA Verhältnisses in der hypertrophierenden Niere kam, zeigte sich bei den GC-A Knockoutmäusen keine Hypertrophie der verbleibenden Niere 4 Tage nach Uninephrektomie.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Beteiligung der GC-A an der initialen Entwicklung der kompensatorischen renalen Hypertrophie weiter belegt. Da das kompensatorische Nierenwachstum vor allem auf einer Hypertrophie der proximalen Tubuli beruht, was auch aus den eigenen Befunden hervorgeht, wurden diese hinsichtlich ihrer Zellfläche untersucht (Abbildung 3.12). In der Tat wurde kein Unterschied in der Zellfläche zwischen den für 3 Tagen uninephrektomierten und den „zum Schein“-operierten GC-A Knockoutmäusen ermittelt. Dem gegenüber ergab sich bei den Wildtypmäusen eine deutliche Flächenzunahme der proximalen Tubuluszellen infolge einer Uninephrektomie.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl die funktionelle Anpassung als auch das Wachstum der verbleibenden Niere infolge einer Uninephrektomie in der frühen Phase bei den GC-A Knockoutmäusen nahezu aufgehoben ist. Die GC-A als gemeinsamer Rezeptor der natriuretischen Peptide ANP und BNP ist somit wesentlich an der Induktion der kompensatorischen renalen Hypertrophie beteiligt.

Jedoch war die kompensatorische renale Hypertrophie bei den GC-A Knockoutmäusen nicht dauerhaft gehemmt. In späteren Phasen entwickelte sich ein kompensatorisches Wachstum und auch die glomeruläre Filtrationsrate wurde gesteigert, jedoch war diese weiterhin geringer als bei den Wildtypmäusen. Die Entwicklung der kompensatorischen renalen Hypertrophie scheint demnach neben dem GC-A Signalweg noch auf einen weiteren Mechanismus zu beruhen. Es könnte generell zwei unterschiedliche Entwicklungsphasen geben: Eine erste schnelle und eine zweite längerfristige Anpassung der verbleibenden Niere nach Verlust von Nierengewebe. Die schnelle Adaption scheint über Aktivierung der GC-A vermittelt zu werden. Dieser Mechanismus könnte auch bei der kurzzeitigen reversiblen Anpassung der Niere von Bedeutung sein, beispielsweise bei einer Schwangerschaft oder bei verschiedenen Diäten, wie durch eine erhöhte Proteinaufnahme oder einer Kalium-Depletion. Der Signalweg, der die kompensatorische renale Hypertrophie in der späten Phase auslöst, ist unklar. In der Literatur sind mittlerweile verschiedene intrarenale Hormone und Prozesse identifiziert, beispielsweise beschrieben Chen und Kollegen eine Beteiligung des mTor

Signalweges. Mäuse mit Deletion der Proteinkinase S6K1, dem Target von mTor, wiesen ein deutlich gehemmttes kompensatorisches Nierenwachstum gegenüber den Wildtypmäusen sieben Tage nach Uninephrektomie auf [10]. Auch wird der GH/IGF1 Achse eine zentrale Bedeutung zugeschrieben [36].

Neben der Hypothese, dass es zwei unterschiedliche Signalwege gibt, die das Wachstum und die Funktionssteigerung der verbleibenden Niere infolge von Nierengewebsverlust induzieren, könnte auch die verzögerte Entwicklung bei den GC-A Knockoutmäusen durch physiologische Gegebenheiten bedingt sein. So sind GC-A Knockoutmäuse hypertensiv und weisen ein erhöhtes Herzgewicht auf. Es wäre also denkbar, dass dies indirekt die Entstehung der kompensatorischen renalen Hypertrophie beeinflusst. Jedoch konnte dies durch ein Kontrollmodell widerlegt werden. ANP Knockoutmäuse, die die gleichen phänotypischen Unterschiede bezüglich Blutdruck und Herzgewicht zu ihren Wildtypgeschwistern aufweisen wie die GC-A Knockoutmäuse (Tabelle 3.3 und 3.4), wurden hinsichtlich ihrer schnellen Anpassungsfähigkeit der verbleibenden Niere infolge einer Uninephrektomie untersucht. Neben den Wildtypmäusen zeigte sich auch bei den ANP Knockoutmäusen 3 Tage nach Uninephrektomie ein deutliches kompensatorisches Wachstum (Abbildung 3.13) und eine Zunahme der GFR (Abbildung 3.14). Die ANP Knockoutmäuse kompensierten trotz ihres höheren Blutdruckes und ihres schweren Herzens den Gewebs- und Funktionsverlust in gleichem Maße wie die Wildtypmäuse. Neben dem Einfluss der Hypertonie und der kardialen Hypertrophie konnte durch dieses Experiment auch eine Beteiligung von ANP an dem kompensatorischen renalen Wachstum ausgeschlossen werden. Demnach scheint die GC-A durch Bindung von BNP aktiviert zu werden und die kompensatorische renale Hypertrophie infolge des Nierenverlustes zu induzieren.

Da nun dem BNP eine zentrale Rolle bei der kompensatorischen renalen Hypertrophie zugeschrieben werden konnte, war von großem Interesse, ob BNP eventuell therapeutisch zur Steigerung der Nierenfunktion und des -wachstums eingesetzt werden könnte. Dazu wurde Mäusen synthetisches BNP in einer Konzentration infundiert, die zu einer Plasmakonzentration von 140 ± 17 pmol/l führt, die auch infolge einer unilateralen Nephrektomie in der Zirkulation zu finden ist. Tatsächlich stimulierte BNP sowohl die glomeruläre Filtration (Abbildung 3.15) als auch das Nierenwachstum (Abbildung 3.16). Durch die chronische BNP-Infusion konnte schon nach 3 Tagen eine Steigerung der GFR um 16 % gegenüber dem Kontrollwert vor Infusion erreicht werden. Dementsprechend löste die 3-tägige BNP-Applikation auch ein Nierenwachstum aus. Die mit BNP behandelten Mäuse wiesen ein um 10 % höheres Nierengewicht auf als Mäuse, die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt

worden waren. Diese Gewichtszunahme beruhte nicht auf Einlagerung von interstitieller Flüssigkeit, da auch das Trockengewicht der mit BNP behandelten Tiere gegenüber den Kontrolltieren gleichsinnig zum Feuchtgewicht zunahm. Durch diesen Versuch wird deutlich, dass BNP ein wichtiger Regulator der Nierenfunktion und des Nierenwachstums, zumindest bei Mäusen, darstellt. Weiterhin galt zu prüfen, ob die gesteigerte Nierenfunktion durch BNP auf einer direkten renalen Wirkung beruht. Diese Untersuchung wurde an der „isoliert perfundierten Niere“ durchgeführt, da sich an diesem Modell der Effekt von BNP auf die GFR ohne systemische Wirkungen von BNP (z.B. Blutdruckabfall) untersuchen lässt. Dieses Modell erlaubt eine Perfusion der Niere mit definiertem Perfusionsmedium und einem konstanten Druck und schließt somit systemische Faktoren aus. Auch in diesem Modell zeigte BNP eindeutige stimulierende Effekte auf die Nierenfunktion. Der renale Perfusatfluss (Abbildung 3.17) sowie die glomeruläre Filtration (Abbildung 3.18) nahmen abhängig von der BNP Konzentration zu. Mit einer im physiologischen Bereich liegenden Konzentration von BNP war eine moderate Zunahme der GFR zu beobachten. Eine Konzentration von BNP in einem höheren Bereich, von 1 oder 10 nM, führte sogar zu einer Verdopplung der glomerulären Filtrationsrate. Diese enorme Funktionssteigerung wäre *in vivo* nicht möglich, da es durch negative Feedbackmechanismen zu einer Gegenregulation kommen würde, beispielsweise durch die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Allerdings zeigt sich durch diesen Versuch an der „isoliert perfundierten Niere“, dass BNP die Nierenfunktion durch einen direkten Effekt auf die Niere stimuliert. Im Zuge dieses Experimentes konnte auch gezeigt werden, dass dieser direkte Effekt auf die Aktivität der Guanylatzyklase-A zurückzuführen ist, da BNP in der isolierten Niere von GC-A Knockoutmäusen weder den renalen Perfusatfluss noch die glomeruläre Filtrationsrate beeinflusste.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten *in vivo*- und *ex vivo*-Daten einen wesentlichen Beitrag zur Identifizierung des initialen Mechanismus, der zur kompensatorischen renalen Hypertrophie führt, leisten konnten. BNP scheint über Aktivierung der Guanylatzyklase-A eine Hyperfiltration in der verbleibenden Niere infolge einer einseitigen Nierenentnahme zu induzieren. Jedoch konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden, über welchen Mechanismus die BNP Synthese und Sekretion angeregt wird. Doch neben der Synthese und Sekretion wird die BNP Aktivität auch über seinen Abbau bestimmt. Der Clearance-Rezeptor NPR-C und die NEP, über welche die natriuretischen Peptide degradiert werden, sind in der Niere hoch exprimiert [90-92] und in der Literatur finden sich zudem mehrere Hinweise, dass die natriuretischen Peptide vorwiegend über die Niere ausgeschieden werden. So weisen Patienten, die an einer chronischen

Niereninsuffizienz leiden, stark erhöhte Plasmaspiegel auf [124, 150]. Durch den Verlust einer Niere infolge der unilateralen Nephrektomie müsste also der Abbau der natriuretischen Peptide deutlich vermindert sein, wodurch sich die Konzentration im Plasma erhöht. Neben der erhöhten Plasmakonzentration wurde jedoch auch eine gesteigerte Synthese von BNP in den Herzen der für 72 Stunden uninephrektomierten Mäusen gegenüber den Kontrolltieren ermittelt. Es wäre denkbar, dass der initiale Anstieg der BNP Konzentration im Plasma über seinen verminderten Abbau unmittelbar nach Uninephrektomie vermittelt wird und die Konzentration durch Stimulation seiner Synthese im Plasma erhöht bleibt. Zur Klärung des Signalweges, über den BNP im Plasma ansteigt, sind weitere Versuche notwendig.

Auch bleibt unklar, über welchen Mechanismus BNP die Steigerung der glomerulären Filtrationsrate induziert. Die aus der Literatur bekannten Daten zeigen einen Einfluss der natriuretischen Peptide auf die GFR über Veränderung der renalen Hämodynamik, allerdings könnte auch eine Wirkung auf die Podozyten, in denen die Guanylatzyklase-A reichlich exprimiert ist [151-154], möglich sein. Durch Versuche an Podozyten-spezifischen GC-A Knockoutmäusen, die gegenwärtig von unserer Arbeitsgruppe generiert werden, kann diese offene Frage beantwortet werden.

In Anbetracht der gesteigerten glomerulären Filtration durch BNP infolge eines Nierengewebsverlustes wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die „workload“-Hypothese genauer untersucht. Diese postuliert die Mehrbeladung des proximalen Tubulus, die sich aus der Hyperfiltration ergibt, als Auslöser des kompensatorischen Nierenwachstums. Dazu wurde ein *in vitro*-Flusssystem entwickelt, welches eine Superfusion proximaler Tubuluszellen mit verschiedenen Flussgeschwindigkeiten gewährleistet. Für die Flussexperimente wurde die immortalisierte proximale Tubuluszelllinie LLC PK₁, die porcinen Ursprungs ist, verwendet. Zudem wurden aus der Maus primäre proximale Tubuluszellen isoliert, an welchen die aus den LLC PK₁ Zellen gewonnenen Ergebnisse verifiziert werden sollten. Beide Zellmodelle bildeten ein primäres Zilium aus (Abbildung 19, 20), das als Flusssensor im Tubulussystem bekannt ist [132] und zeigten eine Möglichkeit zur Hypertrophie (Abbildung 3.21). Tatsächlich führte eine 20-stündige Superfusion in einem Serum- und Hormon-freien Medium zu einer Fluss-abhängigen Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen. Das Protein/DNA Verhältnis sowohl der LLC PK₁ als auch der primären proximalen Tubuluszellen nahm abhängig von der Flussrate zu (Abbildung 3.22). Die eingesetzten Flussgeschwindigkeiten von 0,25 – 2 mm/s liegen im physiologischen Bereich, wie Peti-Pederdi und Kollegen durch Studien mittels der Multiphotonenmikroskopie zeigen konnten [133]. Eine Hypertrophie ist gekennzeichnet durch die relative Zunahme von Protein gegenüber einer konstanten DNA-Konzentration. Jedoch könnte durch die

mechanische Reizung, die bei einer Superfusion gegeben ist, die Bildung extrazellulärer Matrix angeregt werden [155], was das Ergebnis verfälschen würde. Aus diesem Grund wurde neben dem Protein/DNA Verhältnis auch das Zellvolumen bestimmt, wodurch die Fluss-abhängige Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen belegt wurde. Auch das Zellvolumen der LLC PK₁ und der primären proximalen Tubuluszellen ließ sich durch eine höhere Flussrate steigern (Abbildung 3.23), allerdings nahm dieses prozentual weniger zu als das Protein/DNA Verhältnis. Dies könnte durch eine zusätzliche Bildung extrazellulärer Matrix erklärt werden. Jedoch zeigten beide Messungen ein gleichsinniges Ergebnis. Sowohl das Protein/DNA Verhältnis als auch das Zellvolumen erreichte bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 mm/s einen Maximalwert. Eine weitere Erhöhung der Flussrate auf 2 mm/s hatte gegenüber dem Maximum einen geringeren Anstieg zur Folge. 2 mm/s liegen wahrscheinlich schon außerhalb des physiologischen Geschwindigkeitsbereiches. Das Maximum an Zellvolumen bei 1 mm/s war bei den primären Zellen nicht so stark ausgebildet wie bei der LLC PK₁ Zelllinie. Diese Tatsache könnte dadurch bedingt sein, dass eine Primärzellkultur keine 100 %ige Reinheit im Gegensatz zu einer immortalisierten Zelllinie aufweist. Da die Hypertrophie charakteristisch für proximale Tubuluszellen (Abbildung 3.25) ist, kann angenommen werden, dass ein höheres Maß an Homogenität von proximalen Tubuluszellen zu einem größeren Zellvolumen geführt hätte. Außerdem waren die Messung des Protein/DNA Verhältnisses und die Bestimmung des Zellvolumens voneinander unabhängige Versuche.

Der Nachweis des erhöhten Flusses als Auslöser des Zellwachstums wurde durch den Befund, dass auch die Zellfläche der primären Zellen durch Superfusion mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s gegenüber den statischen Zellen zunahm, weiter gestützt (Abbildung 3.24). Des Weiteren wurde durch Superfusion von distalen Tubuluszellen (MDCK) und Sammelrohrzellen (M1) deutlich, dass diese enorme Fluss-abhängige Hypertrophie charakteristisch für proximale Tubuluszellen ist. Der Protein/DNA Gehalt beider Zelltypen nahm zwar durch die 20-stündige Superfusion mit 1 mm/s leicht zu, allerdings wurde nicht annähernd das Maß an Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen erreicht (Abbildung 3.25).

Eine Abhängigkeit der Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen vom Fluss kann somit zumindest *in vitro* angenommen werden.

Neben dem Beleg, dass ein gesteigerter tubulärer Fluss eine Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen auslöst, war nun der Signalweg, der die Hypertrophie vermittelt, von Interesse. Durch die Flusssteigerung, die sich aus einer Hyperfiltration ergibt, kommt es zur Mehrbeladung und somit zur Steigerung des Substratangebotes im proximalen Tubulus. Betrachtet man das unter dem Aspekt der kompensatorischen

Hypertrophie, könnte vor allem der Glucosetransport und die Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE_3), die unmittelbar nach Verlust von Nierengewebe stimuliert werden, involviert sein [35, 156, 157]. Tatsächlich scheint der $\text{Na}^+/\text{Glucose}$ Kotransporter SGLT1 an der Fluss-induzierten Hypertrophie beteiligt zu sein. Wurde dieser mit Phloridzin inhibiert, war keine Zunahme des Protein/DNA Verhältnisses der LLC PK_1 und der primären Zellen durch Superfusion mit 1 mm/s zu beobachten (Abbildung 3.26). Unter statischer Bedingung hatte die Blockade des SGLT1 dagegen keinen Effekt auf den Proteingehalt pro Zelle. Im Gegensatz zum Glucosetransport scheint der NHE_3 keine Bedeutung bei der Fluss-induzierten Hypertrophie zu haben. Die Hemmung des NHE_3 durch EIPA während der Superfusion hatte keine verminderte Protein/DNA Zunahme gegenüber der unter Kontrollbedingungen superfundierten Zellen zur Folge (Abbildung 3.27).

Durch die intensive Forschung sind mittlerweile viele intrarenale Mechanismen, die an der kompensatorischen renalen Hypertrophie beteiligt sind, identifiziert. So weiß man, dass eine Aktivitätssteigerung des mTor Signalweges gegeben ist. Auch konnte durch Applikation des mTor Inhibitors Rapamycin sowie durch genetische Deletion der S6K1, dem Target von mTor, das kompensatorische Nierenwachstum bei Mäusen deutlich vermindert werden [10, 61]. Meine Versuche belegten die Rolle des mTor Signalweges beim Zellwachstum *in vitro*, allerdings kann diesem keine Bedeutung bei der Fluss-induzierten Hypertrophie zugeschrieben werden (Abbildung 3.28). Inkubation der proximalen Tubuluszellen mit Rapamycin unter statischer Bedingung resultierte in einer Abnahme des Protein/DNA Gehaltes. Trotzdem waren die Zellen unter Rapamycin Einfluss noch in der Lage zu hypertrophieren. Demnach scheint die Fluss-induzierte Hypertrophie im proximalen Tubulus nicht durch den mTor Signalweg vermittelt zu werden.

Es ist bekannt, dass TGF β eine Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen durch Induktion eines Zellzyklusarrestes in der späten G_1 -Phase induziert [45]. Basierend auf dieser beschriebenen hypertrophierenden Wirkung wurde die Rolle von TGF β als möglicher Vermittler der Fluss-induzierten Hypertrophie am proximalen Tubulus überprüft. Tatsächlich war die Fluss-induzierte Zunahme sowohl des Protein/DNA Verhältnisses (Abbildung 3.29) als auch des Zellvolumens (Abbildung 3.30) der LLC PK_1 durch Inhibition des TGF β Rezeptors mit SB431542 deutlich vermindert. Da dem Hormon- und Serum-freien Medium kein TGF β zugesetzt worden war, müssten die Zellen demnach selbst TGF β oder auch andere wachstumsfördernde Faktoren sezernieren. Diese Hypothese bewahrheitete sich in einem nächsten Versuch. Neu ausgesäte Zellen waren für 20 Stunden mit dem konditionierten Medium der statischen und der superfundierten Zellen inkubiert worden, wobei sich eine Hypertrophie der

Zellen, die im Superfusionsmedium inkubiert worden waren, ergab. War jedoch das konditionierte Medium vor dem Transfer zur Denaturierung der Proteine gekocht worden, war dieser stimulierende Effekt auf das Zellwachstum nicht mehr gegeben (Abbildung 3.31).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen durch Flusssteigerung induzierbar ist. Dabei sezernieren sie Proteine, möglicherweise TGF β , die auto- oder parakrin wachstumsfördernd wirken. Zudem scheint dabei auch der vermehrte Glucosetransport im proximalen Tubulus relevant zu sein. Diese Daten bestätigen die untersuchte „workload“-Hypothese zumindest *in vitro*. Demnach scheint die Hypertrophie des proximalen Tubulus durch Steigerung des tubulären Flusses, der sich durch die erhöhte Filtration der verbleibenden Niere infolge der Uninephrektomie ergibt, induziert zu werden.

In vitro war den natriuretischen Peptiden auch ein direkter Effekt auf die Hypertrophie des proximalen Tubulus nachzuweisen. Inkubation von frisch aus der Maus isolierten proximalen Tubuli mit BNP für 20 Stunden führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme des Protein/DNA Verhältnisses. Ebenso induzierte ANP eine Hypertrophie der proximalen Tubuli. In Übereinstimmung mit der Literatur scheinen die natriuretischen Peptide generell einen Einfluss auf das Zellwachstum zu haben. Dem ANP wird eine antiproliferative / hypertrophierende Wirkung auf eine Vielzahl von Zellen, unter anderem Endothelial-, Mesangial- und auch proximalen Tubuluszellen von Kaninchen zugeschrieben [138, 151]. Durch Studien an ANP Knockoutmäusen konnte jedoch eine hypertrophierende Wirkung von ANP *in vivo* ausgeschlossen werden. Ob BNP neben dem indirekten auch einen direkten hypertrophierenden Effekt auf den proximalen Tubulus *in vivo* ausübt, bleibt bisweilen unklar.

Abschließend kann festgehalten werden, dass das Ziel, zur Identifizierung des initialen Mechanismus der kompensatorischen renalen Hypertrophie einen wesentlichen Beitrag zu leisten, in dieser Arbeit erreicht wurde.

5. Zusammenfassung

Das Phänomen der kompensatorischen renalen Hypertrophie beschreibt das Wachstum und die Funktionssteigerung der verbleibenden Niere nach Verlust von funktionsfähigem Nierengewebe. Obwohl bereits zahlreiche intrarenale Hormone und Signalwege bei der kompensatorischen renalen Hypertrophie beschrieben sind, blieb die Frage nach dem initialen Mechanismus, der der verbleibenden Niere den Gewebs- und Funktionsverlust vermittelt, bislang offen. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen *in vivo*-, *ex vivo*- und *in vitro*- Daten können einen wesentlichen Beitrag zur Identifizierung dieses Mechanismus leisten.

Durch Studien an Mäusen mit genetischer Deletion der Guanylatzyklase-A, den gemeinsamen Rezeptor für die natriuretischen Peptide ANP und BNP, zeigte sich eine Beteiligung des GC-A Signalweges an der initialen Entwicklung der kompensatorischen renalen Hypertrophie. Bei den Wildtypmäusen kam es schon 3-4 Tage nach einer einseitigen Nephrektomie zu einer enormen Funktionssteigerung und einem deutlichen Wachstum der verbleibenden Niere. Im Gegensatz dazu waren diese rasche Funktionsanpassung und das deutlich ausgeprägte kompensatorische Nierenwachstum bei den GC-A Knockoutmäusen nahezu aufgehoben.

Darüber hinaus wurden Wildtypmäuse hinsichtlich ihrer Plasmakonzentration und ihrer Synthese der natriuretischen Peptide untersucht. Während ANP infolge der einseitigen Nephrektomie nicht reguliert wurde, zeigte sich sowohl eine deutlich erhöhte Plasmakonzentration als auch eine gesteigerte Synthese von BNP bei den uninephrektomierten Mäusen im Vergleich zu den „zum Schein“-operierten Kontrollmäusen. Eine Beteiligung des ANPs an der kompensatorischen renalen Hypertrophie konnte zudem durch Versuche an ANP Knockoutmäusen ausgeschlossen werden. ANP Knockoutmäuse kompensierten den Gewebs- und Funktionsverlust infolge einer Uninephrektomie in gleichem Maße wie ihre Wildtypgeschwister. Demnach scheint die Guanylatzyklase-A von BNP aktiviert zu werden und die kompensatorische renale Hypertrophie auszulösen.

Des Weiteren führte auch eine kontinuierliche Infusion von BNP bei Mäusen zu einer Steigerung der Nierenfunktion und zum Wachstum der Nieren. Somit konnte in dieser Arbeit nicht nur zur Aufklärung der Regulation des Nierenwachstums beigetragen werden, sondern auch möglicherweise ein therapeutischer Ansatz zur Verbesserung der Nierenfunktion gefunden werden.

Die populäre „workload“-Hypothese, welche die Mehrbelastung im proximalen Tubulus als Konsequenz der Hyperfiltration als Auslöser des tubulären Wachstums postuliert, bestätigte sich in den *in vitro* - Experimenten. Eine Flusssteigerung löste durch Sekretion wachstumsförderender Proteine, möglicherweise TGF β , eine Hypertrophie von proximalen Tubuluszellen aus. Dabei scheint auch der Na⁺/Glucose Kotransporter SGLT1 eine Rolle zu spielen.

Durch diese Arbeit konnte somit eine Grundlage geschaffen werden, um den initialen Mechanismus, der die kompensatorische renale Hypertrophie induziert, zu identifizieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Brenner, B.M., et al., *Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide*. *Physiol Rev*, 1990. **70**(3): p. 665-99.
2. Potter, L.R., S. Abbey-Hosch, and D.M. Dickey, *Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions*. *Endocr Rev*, 2006. **27**(1): p. 47-72.
3. Sengenès, C., et al., *Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes*. *FASEB J*, 2000. **14**(10): p. 1345-51.
4. Kishimoto, I., K. Rossi, and D.L. Garbers, *A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(5): p. 2703-6.
5. Tamura, N., et al., *Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(8): p. 4239-44.
6. Schreier, B., et al., *The heart communicates with the endothelium through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of intravascular volume in response to volume expansion*. *Endocrinology*, 2008. **149**(8): p. 4193-9.
7. Hamad, A.M., et al., *Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. **285**(5): p. L973-83.
8. Morton, M.J., et al., *Human podocytes possess a stretch-sensitive, Ca²⁺-activated K⁺ channel: potential implications for the control of glomerular filtration*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(12): p. 2981-7.
9. Salmon, A.H., et al., *Evidence for restriction of fluid and solute movement across the glomerular capillary wall by the subpodocyte space*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **293**(6): p. F1777-86.
10. Chen, J.K., et al., *S6 Kinase 1 Knockout Inhibits Uninephrectomy- or Diabetes-induced Renal Hypertrophy*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009.
11. Cingel-Ristic, V., A. Flyvbjerg, and S.L. Drop, *The physiological and pathophysiological roles of the GH/IGF-axis in the kidney: lessons from experimental rodent models*. *Growth Horm IGF Res*, 2004. **14**(6): p. 418-30.
12. Satriano, J. and V. Vallon, *Primary kidney growth and its consequences at the onset of diabetes mellitus*. *Amino Acids*, 2006. **31**(1): p. 1-9.
13. Seyer-Hansen, K., *Renal hypertrophy in experimental diabetes: a comparison to compensatory hypertrophy*. *Diabetologia*, 1978. **14**(5): p. 325-8.
14. Cheng, J., et al., *Temporal analysis of signaling pathways activated in a murine model of two-kidney, one-clip hypertension*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009. **297**(4): p. F1055-68.
15. Hammerman, M.R., *The renal growth hormone/insulin-like growth factor I axis*. *Am J Kidney Dis*, 1991. **17**(6): p. 644-6.
16. Lytton, B., et al., *The effects of ischemic injury on compensatory renal growth*. *J Urol*, 1968. **100**(2): p. 128-32.
17. Segaul, R.M., B. Lytton, and M. Schiff, Jr., *Functional aspects of compensatory renal growth after ischemic injury*. *Invest Urol*, 1972. **10**(3): p. 235-8.
18. Tucci, S., Jr., et al., *Compensatory renal growth and mitochondrial function: the influence of warm ischemia and reperfusion*. *Acta Cir Bras*, 2008. **23 Suppl 1**: p. 31-5; discussion 35.
19. Schweda, F., et al., *Upregulation of macula densa cyclooxygenase-2 expression is not dependent on glomerular filtration*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **287**(1): p. F95-101.

20. Hauser, P., et al., *Transcriptional response in the unaffected kidney after contralateral hydronephrosis or nephrectomy*. *Kidney Int*, 2005. **68**(6): p. 2497-507.
21. Olesen, S. and P.O. Madsen, *Compensatory renal hypertrophy. II. During contralateral hydronephrosis. An experimental study in dogs*. *Urol Res*, 1975. **3**(4): p. 177-82.
22. Mullin, E.M., R.A. Bonar, and D.F. Paulson, *Effect of transient hydronephrosis on subsequent compensatory renal growth*. *Invest Urol*, 1975. **13**(2): p. 121-4.
23. Dicker, S.E. and D.G. Shirley, *Compensatory hypertrophy of the contralateral kidney after unilateral ureteral ligation*. *J Physiol*, 1972. **220**(1): p. 199-210.
24. Zelman, S.J., T.V. Zenser, and B.B. Davis, *Renal growth in response to unilateral ureteral obstruction*. *Kidney Int*, 1983. **23**(4): p. 594-8.
25. Claesson, I., et al., *Compensatory kidney growth in children with urinary tract infection and unilateral renal scarring: an epidemiologic study*. *Kidney Int*, 1981. **20**(6): p. 759-64.
26. Tsuboi, N., et al., *Changes in the glomerular density and size in serial renal biopsies during the progression of IgA nephropathy*. *Nephrol Dial Transplant*, 2009. **24**(3): p. 892-9.
27. Wilton, P., et al., *Renal compensatory hypertrophy in children with unilateral renal disease*. *Acta Paediatr Scand*, 1980. **69**(1): p. 83-8.
28. Davison, J.M., *Kidney function in pregnant women*. *Am J Kidney Dis*, 1987. **9**(4): p. 248-52.
29. Wolf, G., *Regulating factors of renal tubular hypertrophy*. *Clin Investig*, 1993. **71**(10): p. 867-70.
30. Hammond, K.A. and D.N. Janes, *The effects of increased protein intake on kidney size and function*. *J Exp Biol*, 1998. **201**(Pt 13): p. 2081-90.
31. van Neck, J.W., et al., *High-protein induced renal enlargement is growth hormone independent*. *Kidney Int*, 2002. **62**(4): p. 1187-95.
32. Fine, L.G. and J. Norman, *Cellular events in renal hypertrophy*. *Annu Rev Physiol*, 1989. **51**: p. 19-32.
33. Peterson, L.N., et al., *Potassium depletion enhances renal compensatory hypertrophy in the nephrectomized rat*. *Miner Electrolyte Metab*, 1987. **13**(1): p. 57-62.
34. Tovar, A., et al., *An evaluation of the role of polyamines in different models of kidney hypertrophy in mice*. *Kidney Int*, 1995. **48**(3): p. 731-7.
35. Hostetter, T.H., *Progression of renal disease and renal hypertrophy*. *Annu Rev Physiol*, 1995. **57**: p. 263-78.
36. Flyvbjerg, A., et al., *Compensatory renal growth in uninephrectomized adult mice is growth hormone dependent*. *Kidney Int*, 1999. **56**(6): p. 2048-54.
37. Preisig, P., *What makes cells grow larger and how do they do it? Renal hypertrophy revisited*. *Exp Nephrol*, 1999. **7**(4): p. 273-83.
38. Kaufman, J.M., et al., *Compensatory adaptation of structure and function following progressive renal ablation*. *Kidney Int*, 1974. **6**(1): p. 10-7.
39. Hayslett, J.P., *Functional adaptation to reduction in renal mass*. *Physiol Rev*, 1979. **59**(1): p. 137-64.
40. Salehmoghaddam, S., et al., *Hypertrophy of basolateral Na-K pump activity in the proximal tubule of the remnant kidney*. *Lab Invest*, 1985. **53**(4): p. 443-52.
41. Hayslett, J.P., M. Kashgarian, and F.H. Epstein, *Functional correlates of compensatory renal hypertrophy*. *J Clin Invest*, 1968. **47**(4): p. 774-99.
42. Clemens, K.K., et al., *Psychosocial health of living kidney donors: a systematic review*. *Am J Transplant*, 2006. **6**(12): p. 2965-77.
43. Fournier, C., et al., *Very long-term follow-up of living kidney donors*. *Transpl Int*. **25**(4): p. 385-90.
44. Vlaovic, P.D., et al., *Psychosocial impact of renal donation*. *Can J Urol*, 1999. **6**(5): p. 859-864.

45. Liu, B. and P. Preisig, *TGF-beta1-mediated hypertrophy involves inhibiting pRB phosphorylation by blocking activation of cyclin E kinase*. Am J Physiol, 1999. **277**(2 Pt 2): p. F186-94.
46. Liu, B. and P.A. Preisig, *Compensatory renal hypertrophy is mediated by a cell cycle-dependent mechanism*. Kidney Int, 2002. **62**(5): p. 1650-8.
47. Sinuani, I., et al., *Mesangial cells initiate compensatory renal tubular hypertrophy via IL-10-induced TGF-beta secretion: effect of the immunomodulator AS101 on this process*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(2): p. F384-94.
48. Franch, H.A., et al., *Involvement of pRB family in TGF beta-dependent epithelial cell hypertrophy*. J Cell Biol, 1995. **129**(1): p. 245-54.
49. Park, S.K., et al., *Temporal expressions of cyclins and cyclin dependent kinases during renal development and compensatory growth*. Kidney Int, 1997. **51**(3): p. 762-9.
50. Sinuani, I., et al., *The cyclin kinase inhibitor p57kip2 regulates TGF-{beta}-induced compensatory tubular hypertrophy: effect of the immunomodulator AS101*. Nephrol Dial Transplant, 2009.
51. Terada, Y., et al., *Cell cycle inhibitors (p27Kip1 and p21CIP1) cause hypertrophy in LLC-PK1 cells*. Kidney Int, 1999. **56**(2): p. 494-501.
52. Wolf, G., *Molecular mechanisms of renal hypertrophy: role of p27Kip1*. Kidney Int, 1999. **56**(4): p. 1262-5.
53. Haramati, A., M.D. Lumpkin, and S.E. Mulroney, *Early increase in pulsatile growth hormone release after unilateral nephrectomy in adult rats*. Am J Physiol, 1994. **266**(4 Pt 2): p. F628-32.
54. Haylor, J.L., et al., *IGF-I inhibitors reduce compensatory hyperfiltration in the isolated rat kidney following unilateral nephrectomy*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(1): p. 87-92.
55. Hutson, J.M., et al., *Compensatory renal growth in the mouse. II. The effect of growth hormone deficiency*. Pediatr Res, 1981. **15**(10): p. 1375-80.
56. Landau, D., et al., *A marked deficiency in circulating and renal IGF-I peptide does not inhibit compensatory renal enlargement in uninephrectomized mice*. Growth Horm IGF Res. **21**(5): p. 279-84.
57. Miller, S.B., et al., *Increased distal nephron EGF content and altered distribution of peptide in compensatory renal hypertrophy*. Am J Physiol, 1992. **262**(6 Pt 2): p. F1032-8.
58. Fine, L.G., M.R. Hammerman, and H.E. Abboud, *Evolving role of growth factors in the renal response to acute and chronic disease*. J Am Soc Nephrol, 1992. **2**(7): p. 1163-70.
59. Joannidis, M., et al., *Regional expression of hepatocyte growth factor/c-met in experimental renal hypertrophy and hyperplasia*. Am J Physiol, 1994. **267**(2 Pt 2): p. F231-6.
60. Ishibashi, K., et al., *Expressions of receptor gene for hepatocyte growth factor in kidney after unilateral nephrectomy and renal injury*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **187**(3): p. 1454-9.
61. Chen, J.K., et al., *Role of mammalian target of rapamycin signaling in compensatory renal hypertrophy*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(5): p. 1384-91.
62. Kurnick, N.B. and P.A. Lindsay, *Compensatory renal hypertrophy in parabiotic mice*. Lab Invest, 1968. **19**(1): p. 45-8.
63. Wesson, L.G., *Compensatory growth and other growth responses of the kidney*. Nephron, 1989. **51**(2): p. 149-84.
64. Dicker, S.E. and C.A. Morris, *Presence of renotrophic factor in plasma of unilaterally nephrectomized rats*. J Physiol, 1980. **299**: p. 13-27.
65. Harris, R.H., M.K. Hise, and C.F. Best, *Renotrophic factors in urine*. Kidney Int, 1983. **23**(4): p. 616-23.
66. Dicker, S.E., A.L. Greenbaum, and C.A. Morris, *Compensatory renal hypertrophy in hypophysectomized rats*. J Physiol, 1977. **273**(1): p. 241-53.

67. Gettes, D.R., J.E. Faber, and N.B. Velandia, *Renal innervation is not required for compensatory renal growth in the rat*. J Auton Nerv Syst, 1986. **16**(2): p. 101-8.
68. de Bold, A.J., et al., *A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats*. Life Sci, 1981. **28**(1): p. 89-94.
69. Santos-Araujo, C., et al., *Local modulation of the natriuretic peptide system in the rat remnant kidney*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(6): p. 1774-82.
70. Flynn, T.G., M.L. de Bold, and A.J. de Bold, *The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties*. Biochem Biophys Res Commun, 1983. **117**(3): p. 859-65.
71. Takei, Y., *Does the natriuretic peptide system exist throughout the animal and plant kingdom?* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2001. **129**(2-3): p. 559-73.
72. McGrath, M.F. and A.J. de Bold, *Determinants of natriuretic peptide gene expression*. Peptides, 2005. **26**(6): p. 933-43.
73. Kojima, M., et al., *Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for rat brain natriuretic peptide*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **159**(3): p. 1420-6.
74. Ogawa, Y., et al., *Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene*. J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 1911-21.
75. Seilhamer, J.J., et al., *Human and canine gene homologs of porcine brain natriuretic peptide*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **165**(2): p. 650-8.
76. Nakao, K., et al., *The natriuretic peptide family*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 1996. **5**(1): p. 4-11.
77. Schlossmann, J., R. Feil, and F. Hofmann, *Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 1279-89.
78. Beavo, J.A., *Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms*. Physiol Rev, 1995. **75**(4): p. 725-48.
79. Ogawa, T., et al., *Evidence for load-dependent and load-independent determinants of cardiac natriuretic peptide production*. Circulation, 1996. **93**(11): p. 2059-67.
80. Bruneau, B.G. and A.J. de Bold, *Selective changes in natriuretic peptide and early response gene expression in isolated rat atria following stimulation by stretch or endothelin-1*. Cardiovasc Res, 1994. **28**(10): p. 1519-25.
81. Schiebinger, R.J. and C.E. Gomez-Sanchez, *Endothelin: a potent stimulus of atrial natriuretic peptide secretion by superfused rat atria and its dependency on calcium*. Endocrinology, 1990. **127**(1): p. 119-25.
82. Hanford, D.S., et al., *Brain natriuretic peptide is induced by alpha 1-adrenergic agonists as a primary response gene in cultured rat cardiac myocytes*. J Biol Chem, 1994. **269**(42): p. 26227-33.
83. Schiebinger, R.J., M.Z. Baker, and J. Linden, *Effect of adrenergic and muscarinic cholinergic agonists on atrial natriuretic peptide secretion by isolated rat atria. Potential role of the autonomic nervous system in modulating atrial natriuretic peptide secretion*. J Clin Invest, 1987. **80**(6): p. 1687-91.
84. Matsubara, H., et al., *Effects of steroid and thyroid hormones on synthesis of atrial natriuretic peptide by cultured atrial myocytes of rat*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **145**(1): p. 336-43.
85. Wiese, S., et al., *Gene expression of brain natriuretic peptide in isolated atrial and ventricular human myocardium: influence of angiotensin II and diastolic fiber length*. Circulation, 2000. **102**(25): p. 3074-9.
86. Focaccio, A., et al., *Angiotensin II directly stimulates release of atrial natriuretic factor in isolated rabbit hearts*. Circulation, 1993. **87**(1): p. 192-8.

87. Van der Bent, V., et al., *[Ca²⁺]_i and protein kinase C in vasopressin-induced prostacyclin and ANP release in rat cardiomyocytes*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(2 Pt 2): p. H597-605.
88. de Bold, A.J., *Cardiac natriuretic peptides gene expression and secretion in inflammation*. *J Investig Med*, 2009. **57**(1): p. 29-32.
89. Ma, K.K., T. Ogawa, and A.J. de Bold, *Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by pro-inflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP kinase*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **36**(4): p. 505-13.
90. Matsukawa, N., et al., *The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(13): p. 7403-8.
91. Kanazawa, M., et al., *Localization and characterization of neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11), the degradative enzyme for atrial natriuretic peptide, in rat kidney using a radioiodinated neutral metalloendopeptidase inhibitor*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992. **261**(3): p. 1231-7.
92. Kanazawa, M. and C.I. Johnston, *Distribution and inhibition of neutral metalloendopeptidase (NEP) (EC 3.4.24.11), the major degradative enzyme for atrial natriuretic peptide, in the rat kidney*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1991. **18**(6): p. 449-53.
93. Kenny, A.J., A. Bourne, and J. Ingram, *Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11*. *Biochem J*, 1993. **291** (Pt 1): p. 83-8.
94. Suga, S., et al., *Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide*. *Endocrinology*, 1992. **130**(1): p. 229-39.
95. John, S.W., et al., *Blood pressure and fluid-electrolyte balance in mice with reduced or absent ANP*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(1 Pt 2): p. R109-14.
96. Lopez, M.J., D.L. Garbers, and M. Kuhn, *The guanylyl cyclase-deficient mouse defines differential pathways of natriuretic peptide signaling*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(37): p. 23064-8.
97. Lopez, M.J., et al., *Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide*. *Nature*, 1995. **378**(6552): p. 65-8.
98. Oliver, P.M., et al., *Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(26): p. 14730-5.
99. Oliver, P.M., et al., *Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(5): p. 2547-51.
100. Steinhilper, M.E., K.L. Cochrane, and L.J. Field, *Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes*. *Hypertension*, 1990. **16**(3): p. 301-7.
101. Suda, M., et al., *Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(5): p. 2337-42.
102. Fifer, M.A., et al., *Hemodynamic and renal effects of atrial natriuretic peptide in congestive heart failure*. *Am J Cardiol*, 1990. **65**(3): p. 211-6.
103. Cody, R.J., et al., *Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion*. *J Clin Invest*, 1986. **78**(5): p. 1362-74.
104. Jensen, K.T., J. Carstens, and E.B. Pedersen, *Effect of BNP on renal hemodynamics, tubular function and vasoactive hormones in humans*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(1 Pt 2): p. F63-72.
105. La Villa, G., et al., *Cardiovascular and renal effects of low dose brain natriuretic peptide infusion in man*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994. **78**(5): p. 1166-71.

106. Morita, H., et al., *Effects of brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide infusion on urine flow and jejunal absorption in anesthetized dogs*. Jpn J Physiol, 1992. **42**(2): p. 349-53.
107. Nishida, Y., et al., *Effects of brain natriuretic peptide on hemodynamics and renal function in dogs*. Jpn J Physiol, 1990. **40**(4): p. 531-40.
108. Marin-Grez, M., J.T. Fleming, and M. Steinhausen, *Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney*. Nature, 1986. **324**(6096): p. 473-6.
109. Lazzeri, C., et al., *Systemic hemodynamics and renal function during brain natriuretic peptide infusion in patients with essential hypertension*. Am J Hypertens, 1995. **8**(8): p. 799-807.
110. Light, D.B., J.D. Corbin, and B.A. Stanton, *Dual ion-channel regulation by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase*. Nature, 1990. **344**(6264): p. 336-9.
111. Harris, P.J., D. Thomas, and T.O. Morgan, *Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption*. Nature, 1987. **326**(6114): p. 697-8.
112. Espiner, E.A., et al., *Natriuretic hormones*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1995. **24**(3): p. 481-509.
113. Kudo, T. and A. Baird, *Inhibition of aldosterone production in the adrenal glomerulosa by atrial natriuretic factor*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 756-7.
114. Shi, S.J., et al., *Genetic disruption of atrial natriuretic peptide receptor-A alters renin and angiotensin II levels*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **281**(4): p. F665-73.
115. Weder, A.B., et al., *Antihypertensive and hypotensive effects of atrial natriuretic factor in men*. Hypertension, 1987. **10**(6): p. 582-9.
116. Sward, K., et al., *Recombinant human atrial natriuretic peptide in ischemic acute renal failure: a randomized placebo-controlled trial*. Crit Care Med, 2004. **32**(6): p. 1310-5.
117. de Denus, S., C. Pharand, and D.R. Williamson, *Brain natriuretic peptide in the management of heart failure: the versatile neurohormone*. Chest, 2004. **125**(2): p. 652-68.
118. Fonarow, G.C., *Nesiritide: practical guide to its safe and effective use*. Rev Cardiovasc Med, 2001. **2 Suppl 2**: p. S32-5.
119. Fonarow, G.C., *B-type natriuretic peptide: spectrum of application. Nesiritide (recombinant BNP) for heart failure*. Heart Fail Rev, 2003. **8**(4): p. 321-5.
120. Burnett, J.C., Jr., et al., *Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human*. Science, 1986. **231**(4742): p. 1145-7.
121. Chen, H.H. and J.C. Burnett, Jr., *The natriuretic peptides in heart failure: diagnostic and therapeutic potentials*. Proc Assoc Am Physicians, 1999. **111**(5): p. 406-16.
122. Richards, A.M., et al., *Clinical applications of B-type natriuretic peptides*. Trends Endocrinol Metab, 2004. **15**(4): p. 170-4.
123. Yandle, T., et al., *Exponential increase in clinical use of plasma brain natriuretic peptide (BNP) assays*. N Z Med J, 2004. **117**(1197): p. U956.
124. Mark, P.B., et al., *Diagnostic potential of circulating natriuretic peptides in chronic kidney disease*. Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(2): p. 402-10.
125. Qi, Z., et al., *Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(3): p. F590-6.
126. Buclin, T., et al., *Estimation of glomerular filtration rate by sinistrin clearance using various approaches*. Ren Fail, 1998. **20**(2): p. 267-76.
127. Pill, J., et al., *Pharmacological profile and toxicity of fluorescein-labelled sinistrin, a novel marker for GFR measurements*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2006. **373**(3): p. 204-11.

128. Pill, J., et al., *Fluorescein-labeled sinistrin as marker of glomerular filtration rate*. Eur J Med Chem, 2005. **40**(10): p. 1056-61.
129. Qi, Z. and M.D. Breyer, *Measurement of glomerular filtration rate in conscious mice*. Methods Mol Biol, 2009. **466**: p. 61-72.
130. Krege, J.H., et al., *A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice*. Hypertension, 1995. **25**(5): p. 1111-5.
131. Schweda, F., et al., *Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 adenosine receptor knockout mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **284**(4): p. F770-7.
132. Praetorius, H.A. and K.R. Spring, *The renal cell primary cilium functions as a flow sensor*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003. **12**(5): p. 517-20.
133. Kang, J.J., et al., *Quantitative imaging of basic functions in renal (patho)physiology*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(2): p. F495-502.
134. Potter, D.E., et al., *Early responses of glomerular filtration rate to unilateral nephrectomy*. Kidney Int, 1974. **5**(2): p. 131-6.
135. Argiles, A., et al., *Acute adaptive changes to unilateral nephrectomy in humans*. Kidney Int, 1987. **32**(5): p. 714-20.
136. Valentin, J.P., et al., *Role of atrial peptide in the acute natriuretic response to uninephrectomy*. Am J Physiol, 1990. **258**(4 Pt 2): p. F1054-60.
137. Logan, J.L. and U.F. Michael, *Atrial natriuretic peptide suppresses compensatory renal growth in rats*. J Am Soc Nephrol, 1994. **4**(12): p. 2016-22.
138. Garcia-Ocana, A., C. Penaranda, and P. Esbrit, *Comparison of antiproliferative effects of atrial natriuretic peptide and transforming growth factor beta on rabbit kidney proximal tubule cells*. Life Sci, 1996. **58**(3): p. 251-8.
139. Cao, L. and D.G. Gardner, *Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts*. Hypertension, 1995. **25**(2): p. 227-34.
140. Gunning, M.E. and B.M. Brenner, *Natriuretic peptides and the kidney: current concepts*. Kidney Int Suppl, 1992. **38**: p. S127-33.
141. Kuhn, M., *Molecular physiology of natriuretic peptide signalling*. Basic Res Cardiol, 2004. **99**(2): p. 76-82.
142. Schlondorff, D. and H. Weber, *Cyclic nucleotide metabolism in compensatory renal hypertrophy and neonatal kidney growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(2): p. 524-8.
143. Ignarro, L.J., *Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication*. Hypertension, 1990. **16**(5): p. 477-83.
144. Mashimo, H. and R.K. Goyal, *Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice*. Am J Physiol, 1999. **277**(4 Pt 1): p. G745-50.
145. Poux, J.M., et al., *[Control of vascular tone by the endothelium: the coupling active vasodilation in the kidney to renin secretion]*. Diabete Metab, 1992. **18**(2 Pt 2): p. 145-60.
146. Sigmon, D.H., et al., *Role of nitric oxide in the renal hemodynamic response to unilateral nephrectomy*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(6): p. 1413-20.
147. Flora, D.R. and L.R. Potter, *Prolonged atrial natriuretic peptide exposure stimulates guanylyl cyclase-a degradation*. Endocrinology. **151**(6): p. 2769-76.
148. Cao, L., J. Wu, and D.G. Gardner, *Atrial natriuretic peptide suppresses the transcription of its guanylyl cyclase-linked receptor*. J Biol Chem, 1995. **270**(42): p. 24891-7.
149. *Symposium on compensatory renal growth*. Kidney Int, 1983. **23**(4): p. 569-646.
150. Passino, C., et al., *Clinical relevance of non-cardiac determinants of natriuretic peptide levels*. Clin Chem Lab Med, 2008. **46**(11): p. 1515-23.
151. Appel, R.G., *Growth-regulatory properties of atrial natriuretic factor*. Am J Physiol, 1992. **262**(6 Pt 2): p. F911-8.
152. Golos, M., et al., *Effect of angiotensin II on ANP-dependent guanylyl cyclase activity in cultured mouse and rat podocytes*. Kidney Blood Press Res, 2002. **25**(5): p. 296-302.

153. Lewko, B. and J. Stepinski, *Cyclic GMP signaling in podocytes*. Microsc Res Tech, 2002. **57**(4): p. 232-5.
154. Mizukawa, K., et al., *Localization of receptors for atrial natriuretic polypeptide (ANP) in the glomerulus: in vitro electron microscopic autoradiographical investigation using ¹²⁵I-labeled ANP*. Regul Pept, 1988. **21**(1-2): p. 167-72.
155. Essig, M. and G. Friedlander, *Shear-stress-responsive signal transduction mechanisms in renal proximal tubule cells*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003. **12**(1): p. 31-4.
156. Fine, L.G., et al., *Stimulation of Na⁺/H⁺ antiport is an early event in hypertrophy of renal proximal tubular cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(6): p. 1736-40.
157. Fine, L.G. and T. Bradley, *Adaptation of proximal tubular structure and function: insights into compensatory renal hypertrophy*. Fed Proc, 1985. **44**(11): p. 2723-7.
158. John, S.W., et al., *Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension*. Science, 1995. **267**(5198): p. 679-81.

Klinke, Pape, Kurtz und Silbernagel: Lehrbuch der Physiologie, 6. Auflage

7. Anhang

7.1 Verwendete Materialien

7.1.1 Die Versuchstiere

Wildtyp Mäuse des Stammes C57BL/6 der Charles River GmbH sowie Guanylatzyklase-A Knockoutmäuse (GC-A -/-) und ihre Wildtypgeschwister (GC-A +/-) wurden für die *in vivo* Experimente verwendet. Die GC-A Knockoutmäuse wurden von Dr. D.L Garbers (HHMI, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas) generiert [97] und von Prof. M. Kuhn (Universität Würzburg) bereitgestellt.

Außerdem wurden Versuche an ANP Knockoutmäusen (ANP -/-) durchgeführt, die von John et al. im Jahr 1995 generiert worden waren [158].

7.1.2 Die Zellen

Primäre proximale Tubuluszellen (PTC) wurden aus C57Bl/6 Mäusen isoliert und in DMEM/F-12 Kulturmedium (Pan Biotech, P04-41250) zuzüglich 1 % FCS (Pan Biotech, 3302), 1 x Insulin / Transferrin / Selenium (Invitrogen), 50 nM Hydrocortison (Sigma), 5 nM T₃ (Sigma), 5 nM EGF (Sigma) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Außerdem wurde für die *in vitro*-Versuche die Zelllinie LLC PK₁, die von proximalen Tubuluszellen des Schweins abstammen (American Type Culture Collection), verwendet und in DMEM Kulturmedium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

M1(murine Sammelrohrzelllinie)- und MDCK-Zellen (kanine distale Tubuluszelllinie) wurden in DMEM/F-12 zuzüglich 5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin ebenfalls bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

7.1.3 Die Puffer und Lösungen

7.1.3.1 Isolierung proximaler Tubuluszellen

PBS, pH 7,4	138 mM NaCl 2,71 mM KCl 10,2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,77 mM KH ₂ PO ₄ H ₂ O ad 1 l, pH 7,4
HBSS, pH 7,4	5,4 mM KCl 0,3 mM Na ₂ HPO ₄ 0,4 mM KH ₂ PO ₄ 4,2 mM NaHCO ₃ 1,3 mM CaCl ₂ 0,5 mM MgCl ₂ 0,6 mM MgSO ₄ 137 mM NaCl 5,6 mM D-Glucose H ₂ O ad 1 l
Verdaulösung	5 ml HBSS 5 ml DMEM/F-12 10 mg Collagenase II (240 U / mg, Worthington) 25 mg BSA
Percoll – Lösung	45 % Percoll (GE Healthcare) 55 % 2 x PBS + 5 mM D-Glucose

7.1.3.2 Western Immunoblotting

Lysispuffer, pH 7,4	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA 0,2 mM PMSF 10 µg / ml Benzamidin 10 µg / ml Leupeptin H ₂ O ad 1 l
SDS-PAGE Laufpuffer	15,14 g Tris 72 g Glyzin 5 g SDS H ₂ O ad 5 l
Transferpuffer	25 mM Tris 0,2 M Glyzin 20 % Methanol p.a. H ₂ O ad 1 l
PBST	PBS 0,05 % Tween

7.1.3.3 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung

Beschichtungsmedium	97 ml F-12 1 ml Fibronectin 1 ml Kollagen 50 µl BSA 1 ml Penicillin/Streptomycin
PBS, pH 7,4	138 mM NaCl 2,71 mM KCl 10,2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,77 mM KH ₂ PO ₄ H ₂ O ad 1 l

Tris/EDTA, pH 8,5	1,2 g Tris 0,372 g EDTA H ₂ O ad 1 l
-------------------	---

7.1.4 Die Oligonukleotide

ANP forward ANP reverse	5` GGCTGCAACAGCTTCCGGTACCG `3 5 `GAGGGTGTTCCACCACGCCACAG `3
BNP forward BNP reverse	5`CTGAAGGTGCTGTCCCAGAT `3 5`GTTCTTTTGTGAGGCCTTGG `3
GC-A forward GC-A reverse	5`CTCAACATCACAGTAAATCACC `3 5`GGCTTTGCCCAAACACATCC `3
NPR-C forward NPR-C reverse	5`GGCTCAATGAGGAGGATTACGTG `3 5`CACAGAGAAGTCCCCATACCG `3

7.1.5 Internetdienste und Software

The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Microsoft Office 2007

GraphPad Prism 5

Endnote 9

AxioVision Software von Zeiss

7.2 Abkürzungen

°C	Grad Celcius
μ	Mikro
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
Da	Dalton
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s Medium
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EIPA	5-ethylisopropyl amiloride
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GC-A	Guanylatzyklase-A
GH	Growth Hormone
h	Stunde
HBSS	Hank`s Buffered Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1
k	Kilo
KG	Körpergewicht
L	Liter
m	Milli
m	Meter
M	Molar
min	Minute
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
mTor	Mammalian Target of Rapamycin

n	Anzahl
n	Nano
n.s.	Nicht signifikant
p	Piko
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PTC	Primäre proximale Tubuluszellen
rpm	Rounds per Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
TGF β	Transforming Growth Factor β

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung des glomerulären Filters	9
Abb. 1.2: Die in dieser Arbeit behandelten Transportprozesse des proximalen Tubulus	11
Abb. 1.3: Die Struktur des atrialen natriuretischen Peptids	16
Abb. 1.4: Die Struktur des humanen B-Typ natriuretischen Peptids	17
Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Aktivierung der GC-A	18
Abb. 1.6: Physiologische Wirkung der natriuretischen Peptide ANP und BNP	20
Abb. 2.1: Aufbau einer osmotischen Minipumpe	25
Abb. 2.2: Konzentrations-Zeitkurve der „Single-Shot Clearance-Methode“	27
Abb. 2.3: Darstellung des selbst entwickelten <i>in vitro</i> – Flusssystemes	33
Abb. 3.1: Diurese, Natriurese und Kaliumausscheidung von UNx- und Sham-Mäusen	36
Abb. 3.2: ANP und BNP Plasmakonzentration von UNx- und Sham-Mäusen	37
Abb. 3.3: Gewichtszunahme der verbleibenden Niere nach Uninephrektomie	38
Abb. 3.4: Die kardiale ANP und BNP mRNA Expression von UNx- und Sham-Mäusen	39
Abb. 3.5: Die renale NPR-A und NPR-C mRNA Expression von UNx- und Sham-Mäusen	40
Abb. 3.6: Western Immunoblotting zur Bestimmung der renalen GC-A Proteinmenge	41
Abb. 3.7: Die Entwicklung der funktionellen Anpassung nach Uninephrektomie bei GC-A Knockout- und Wildtypmäusen	44
Abb. 3.8: Diurese, Natriurese und Kaliumausscheidung von GC-A Knockout- und Wildtypmäusen nach Uninephrektomie	45
Abb. 3.9: Zunahme des Feuchtgewichtes der verbleibenden Niere von GC-A Knockout- und Wildtypmäusen nach UNx	46
Abb. 3.10: Zunahme des Trockengewichtes und der Protein/DNA Ratio der verbleibenden Niere von GC-A Knockout- und Wildtypmäusen nach UNx	47
Abb. 3.11: Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von Megalin und Hoechst 33342 in Nierenschnitten	48
Abb. 3.12: Die Fläche der proximalen Tubuluszellen von UNx- und Sham- GC-A Knockout- und Wildtypmäusen 3 Tage nach UNx	49
Abb. 3.13: Gewichtszunahme der verbleibenden Niere nach Uninephrektomie bei ANP Knockout- und Wildtypmäusen	51

Abb. 3.14: Die funktionelle Anpassung der verbleibenden Niere nach Uninephrektomie bei ANP Knockout- und Wildtypmäusen	51
Abb. 3.15: Die GFR nach Behandlung der Mäuse mit BNP	52
Abb. 3.16: Das Nierengewicht nach Behandlung der Mäuse mit BNP	53
Abb. 3.17: Der Perfusatfluss in der isoliert perfundierten Niere von Wildtypen und GC-A Knockoutmäusen in Abhängigkeit von BNP	54
Abb. 3.18: Der GFR der isoliert perfundierten Niere von Wildtypen und einer GC-A Knockoutmaus in Abhängigkeit von BNP	55
Abb. 3.19: Immunfärbung von α -Tubulin und Hoechst 33342 in primären proximalen Tubuluszellen	56
Abb. 3.20: Immunfärbung von α -Tubulin und Hoechst 33342 in LLC PK ₁ Zellen	56
Abb. 3.21: Protein- und DNA-Konzentration der LLC PK ₁ Zellen nach Inkubation mit EGF und TGF β	57
Abb. 3.22: Protein/DNA Ratio nach Superfusion von LLC PK ₁ und primären proximalen Tubuluszellen	59
Abb. 3.23: Zellvolumen nach Superfusion von LLC PK ₁ und primären proximalen Tubuluszellen	60
Abb. 3.24: Flächenzunahme nach Superfusion von primären proximalen Tubuluszellen	60
Abb. 3.25: Protein/DNA Verhältnis nach Superfusion der M1 und der MDCK Zellen	61
Abb. 3.26: Protein/DNA Verhältnis nach Inkubation der LLC PK ₁ und der primären proximalen Tubuluszellen mit Phloridzin während der Superfusion	62
Abb. 3.27: Protein/DNA Verhältnis nach Inkubation der LLC PK ₁ Zellen mit EIPA während der Superfusion	63
Abb. 3.28: Protein/DNA Verhältnis nach Inkubation der LLC PK ₁ Zellen mit Rapamycin während der Superfusion	64
Abb. 3.29: Protein/DNA Verhältnis nach Inkubation der LLC PK ₁ Zellen mit SB 431542 während der Superfusion	65
Abb. 3.30: Zellvolumen nach Inkubation der LLC PK ₁ Zellen mit SB 431542 während der Superfusion	66
Abb. 3.31: Protein/DNA Verhältnis nach Inkubation der LLC PK ₁ Zellen mit konditioniertem Medium von statischen und superfundierten Zellen	67
Abb. 3.32: Protein/DNA Verhältnis nach Inkubation von frisch isolierten proximalen Tubuli mit BNP	68
Abb. 3.32: Protein/DNA Verhältnis nach Inkubation von frisch isolierten proximalen Tubuli mit ANP	68

7.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei Prof. Frank Schweda bedanke ich mich, dass ich dieses hoch spannende Thema bearbeiten durfte. Vielen Dank für die sehr gute Betreuung, die fachliche Unterstützung und die nette Zusammenarbeit während der gesamten Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern des Lehrstuhls, die eine sehr angenehme Atmosphäre geschaffen haben und die mir stets bei Fragen weitergeholfen haben.

Danke an Katharina, Regine, Friedl und Robert für die Hilfsbereitschaft, die netten Gespräche zwischendurch und das tolle entspannte Arbeitsklima. Es war sehr schön, ein Teil dieser Arbeitsgruppe gewesen zu sein.

Bedanken möchte ich mich ganz besonders bei meinem Freund Tom, der mich immer unterstützt, an mich geglaubt und stets bei schlechter Laune aufgemuntert hat. Danke für alles, was du für mich getan hast.

Bei meinen Freunden bedanke ich mich ganz herzlichst für die emotionale Unterstützung. Schön, dass es euch gibt. Danke für eure Freundschaft!

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne die diese Arbeit und diese Ausbildung nicht zustande gekommen wären. Danke für eure Unterstützung, und dass ihr immer für mich da seid!