

Aus dem Institut für Nephrologie und Klinische Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Identifikation embryonaler Regulationsmechanismen der
Oligonephronie – Ontogenese des arteriellen Hypertonus und der
progressiven Niereninsuffizienz**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Lena Freese

aus Emmendingen

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. L. Rothermund
 2. Prof. Dr. med. H. Peters
 3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Beige

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Nephrogenese	6
1.2 Arterieller Hypertonus und Anzahl der Nephrone.....	8
1.3 Bekannte Faktoren der fetalen Programmierung der Oligonephronie	10
1.3.1 Proteinmangel in der Schwangerschaft	10
1.3.2 Chirurgische Reduktion der Nephronenanzahlen	11
1.3.3 Tierexperimentelle Hinweise	11
1.4 Genetische Faktoren.....	11
1.4.1 Das Renin-Angiotensin-System in der Nephrogenese	12
1.4.1.1 Untersuchte Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems	12
1.4.1.1.1 Angiotensin II-Rezeptoren Typ 1a und Typ 1b	13
1.4.1.1.2 Angiotensinogen.....	14
1.4.1.1.3 Angiotensin-Konversionsenzym und Angiotensin-Konversionsenzym 2	15
1.4.2 Das Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-System in der Nephrogenese.....	16
1.4.2.1 Untersuchte Komponenten des Osteopontin-CD44-Rezeptor- alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-Systems	17
1.4.2.1.1 Osteopontin	17
1.4.2.1.2 CD44-Rezeptor	18
1.4.2.1.3 alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor	20
1.5 Auswahl des Tiermodells	21
1.6 Zusammenfassung.....	27
2 Aufgabenstellung	29
3 Material und Methoden	30
3.1 Material	30
3.1.1 Geräte	30
3.1.2 Instrumente und Nahtmaterial	31
3.1.3 Futtermittel	31
3.1.4 Medikamente und Arzneimittel	31
3.1.5 Verbrauchsmaterial	31
3.1.6 Reagenzien	32
3.1.7 Kits	33
3.1.8 Oligonukleotide.....	33
3.1.9 Tierstämme	35
3.2 Methoden	36
3.2.1 Tierexperimentelle Untersuchungen.....	36
3.2.1.1 Haltung der Tiere	36
3.2.1.2 Organentnahme	36
3.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen.....	37
3.2.2.1 RNA-Isolierung.....	37
3.2.2.2 RNA-Qualitätskontrolle.....	38
3.2.2.3 Gelelektrophorese und optische Konzentrationmessung (Photometrie) ..	38

3.2.2.4 Reverse Transkription.....	39
3.2.2.5 Polymerasekettenreaktion	40
3.2.2.5.1 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion	40
3.2.2.5.1.1 Die Taqman-Polymerasekettenreaktion.....	40
3.2.2.5.1.2 SYBR Green	46
3.2.2.5.2 Auswertung der PCR-Ergebnisse.....	47
3.2.2.5.2.1 Quantifizierungsstrategie	47
3.2.2.6 <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	49
3.2.2.7 Statistische Analyse.....	50
4 Ergebnisse	51
4.1 Plazenta-, Nieren- und Körpergewichte	51
4.2 Nierengewichte, Urinvolumen, Kreatininclearance und Albuminurie	52
4.3 Expressionsanalyse des Renin–Angiotensin–Systems.....	54
4.3.1: Renale AT1a-mRNA–Expression	54
4.3.2: Renale AT1b-mRNA–Expression	55
4.3.3 Renale AT2-mRNA–Expression	56
4.3.4 Renale Angiotensinogen-mRNA–Expression	57
4.3.5 Renale Angiotensin-Konversionsenzym 2-mRNA–Expression.....	58
4.4 Expressionsanalyse des Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)- Integrinrezeptor-Systems	59
4.4.1 Renale Osteopontin-mRNA-Expression	59
4.4.2 Renale Osteopontin-Proteinbestimmung.....	60
4.4.3 Renale CD44–Rezeptor-mRNA–Expression	61
4.4.4 Renale mRNA-Expression der Integrinkette alpha(v)	62
5 Diskussion	64
5.1 Die Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems in der Nephrogenese	64
5.1.1 Vergleichende mRNA–Expressionsanalyse MWF/ Wistar: Stammunterschiede und zeitliche Dynamik.....	65
5.1.1.1 Angiotensin II-Rezeptor Typ 1a.....	65
5.1.1.2 Angiotensin II-Rezeptor Typ 1b.....	68
5.1.1.3 Angiotensin II-Rezeptor Typ 2.....	69
5.1.1.4 Angiotensinogen	72
5.1.1.5 Angiotensin-Konversionsenzym 2.....	73
5.2 Die Bedeutung des Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor- Systems in der Nephrogenese.....	73
5.2.1 Vergleichende mRNA–Expressionsanalyse MWF/ Wistar: Stammunterschiede und zeitliche Dynamik.....	74
5.2.1.1 Osteopontin.....	74
5.2.1.2 CD44 Rezeptor	77
5.2.1.3 Alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor	78
5.3 Die Bedeutung der Interaktion des Renin-Angiotensin-Systems, des Osteopontin- CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)–Integrinrezeptor-Systems und des <i>insulin-like growth factor</i> -Systems während der Nephrogenese.....	80
5.3.1 Die Interaktion des Renin-Angiotensin-Systems und des Osteopontin-CD44- Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-Systems	80
5.3.2 Die Interaktion des Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)- Integrinrezeptor-Systems und des <i>insulin-like growth factor</i> -Systems	81

5.3.3 Die Interaktion des Renin-Angiotensin-Systems, des Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-Systems und des <i>insulin-like growth factor</i> -Systems	82
6 Zusammenfassung	86
6.1 Ziel der Arbeit	86
6.2 Methoden	86
6.3 Ergebnisse	86
6.4 Schlussfolgerung	87
7 Literaturverzeichnis	88
8 Abkürzungsverzeichnis	100
9 Erklärung	101
10 Danksagung	102
11 Lebenslauf	103

1 Einleitung

Der Zusammenhang zwischen einer angeborenen oder postpartal erworbenen verminderten Gesamtanzahl der Nephrone in den Nieren des Menschen und dem späteren Auftreten eines arteriellen Hypertonus wird durch ein Fülle von Untersuchungen (epidemiologisch, human, tierexperimentell) unterstützt. Die zugrunde liegenden Ursachen können pränatal sowohl genetisch determiniert, als auch durch auf die embryonale Entwicklung wirkende Umgebungsfaktoren bedingt sein.

1.1 Nephrogenese

Die meisten parenchymal-epithelialen Organe entwickeln sich nach einem gemeinsamen Schema. Ein epitheliales Blatt oder epithelialer Tubus, die einem spezifischen Ursprungsgewebe entstammen, treten in den Prozess der Knospung und Induktion der Differenzierung im Nachbargewebe ein.

Die Entwicklung der Nieren vollzieht sich bei höheren Wirbeltieren aus drei fetalen Strukturen. Zuerst wird die Vorniere, *Pronephros*, angelegt, darauf folgt die Urnieren, *Mesonephros*, und als Letztes die Nachnieren, *Metanephros* (Abbildung (Abb.) 1). Alle drei Nierenanlagen gehen aus dem intermediären Mesoderm hervor, das die Nephrotome bildet. *Pronephros* und *Mesonephros* sind nur vorübergehende Bildungen, die für die Harnbildung bei höheren Wirbeltieren funktionell keine Bedeutung haben. Die Nachnieren oder *Metanephros* entwickelt sich zur bleibenden Niere.

Die Metanephrogenese (im folgenden Text als Nephrogenese bezeichnet) beginnt beim Menschen im Gestationsalter von etwa 5 Wochen und wird *in utero* um die 36. Woche abgeschlossen (Tabelle 1). Bei Ratten beginnt die Nephrogenese am 12. Embryonaltag (E12) und wird am 7.-13. Tag *post partum* beendet (D7-D13) [53] (Tabelle 1).

Tabelle 1: Gestationsdauer und Dauer der Nephrogenese in verschiedenen Spezies

Spezies	Gestationsdauer	Dauer der Nephrogenese
Maus	20 Tage	E11 bis D 5-7
Ratte	21 Tage	E12 bis D7-13
Schwein	16 Wochen	E20 bis D21-28
Mensch	38 Wochen	5 SSW bis 35-36 SSW

Abkürzungen: E, Embryonaltag; D, postnataler Tag; SSW, Schwangerschaftswoche (Tabelle modifiziert nach Guron [53])

Die Nachniere, *Metanephros*, geht, im Gegensatz zu anderen parenchymal-epithelialen Organen, aus zwei verschiedenen Ursprungsgeweben hervor, dem metanephrogenen mesenchymalen Blastem (MM) und dem Urnierengang (Wolff-Gang, mesonephritischer Gang), (Abb. 1). Aus dem MM Blastem entwickeln sich das Glomerulum, der proximale und der distale Tubulus und aus dem Urnierengang das Sammelrohrsystem, das Nierenbecken und der Ureter.

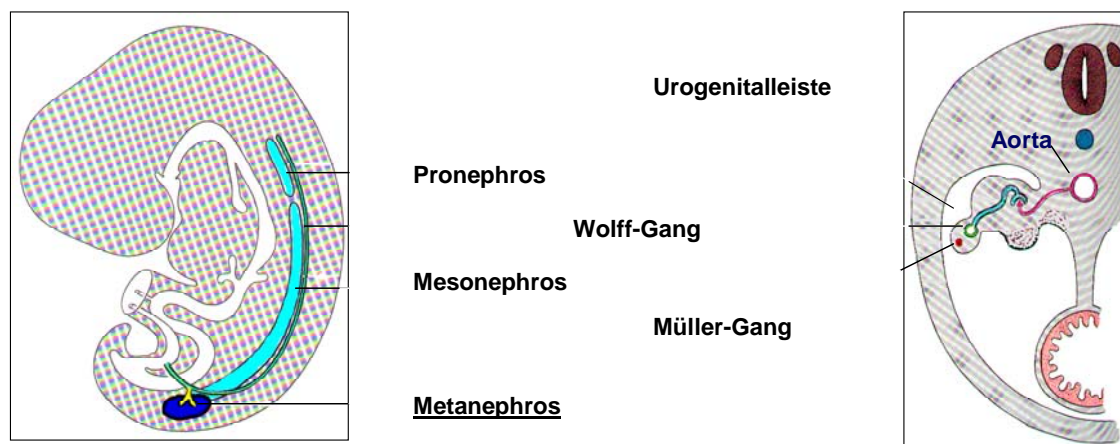


Abbildung 1: Nephrogenese-Übersicht

Pronephros, Vorniere; *Mesonephros*, Urniere; *Metanephros*, Nachniere.

Die renale Vaskularisierung erfolgt parallel zur Nephrogenese erstens über das Einwachsen prä-existenter extrarenaler Gefäße (Angiogenese) in die Bowman-Kapsel (Abb. 2) und zweitens durch *in-situ* Bildung neuer Gefäße aus endothelialen Vorläuferzellen im metanephritischen Mesenchym (Vaskulogenese)⁵⁰. Wachstum und Reifung der Niere setzen sich auch nach Abschluss der Nephrogenese postnatal fort. So wird zum Beispiel die vollständige Fähigkeit zur Urinkonzentration bei der Ratte erst im Alter von 6 Wochen und beim Menschen im Alter von 18 Monaten erreicht.

Die Organogenese ist das Ergebnis eines komplexen temporospatialen Zusammenspiels aus zellulärer Proliferation, Kommunikation, Induktion und Bewegung. Zellveränderungen werden von Änderungen der Gen-Expression begleitet, und der Grad der Zelldifferenzierung nimmt dabei ständig zu, oft als Reaktion auf spezifische induktive Signale benachbarter Zellen.

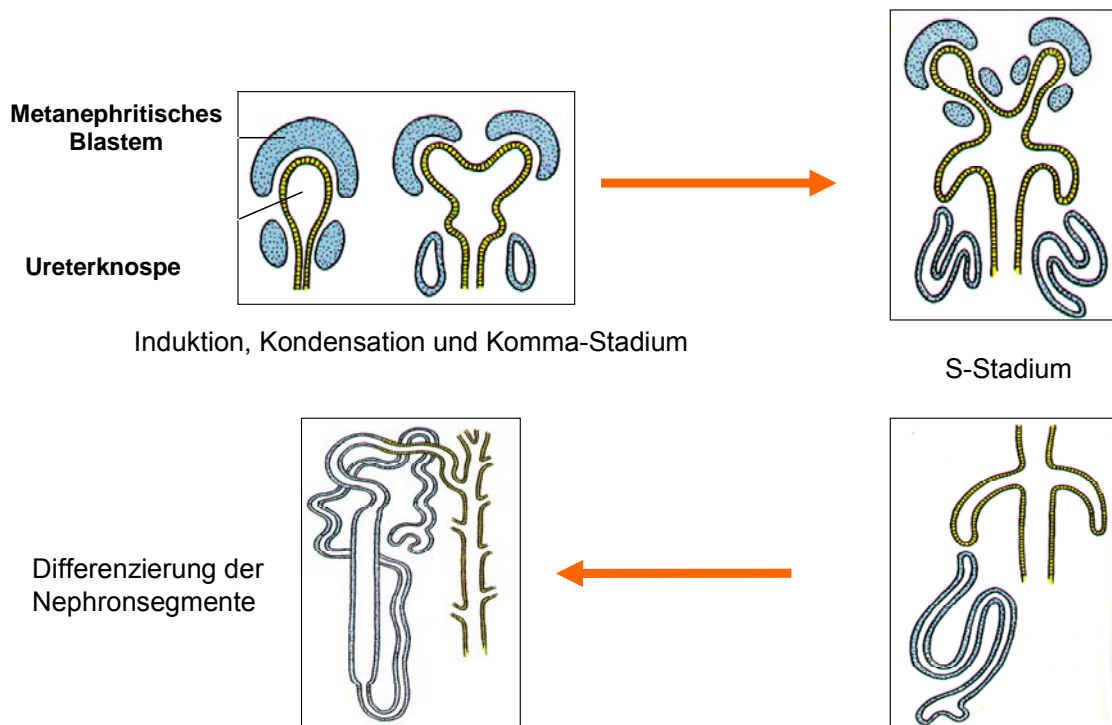


Abbildung 2: Mesenchymal-Epithelialer Übergang

1.2 Arterieller Hypertonus und Anzahl der Nephrone

Die Oligonephronie kann genetisch determiniert oder durch exogene Faktoren verursacht sein. Sie ist durch verschiedene aktuelle Studien als mögliche pathoanatomisch funktionelle Ursache eines Teils der essentiellen Hypertonie in den Vordergrund gerückt. Welche spezifischen Regulationsstörungen der fetalen Nephrogenese zu einer angeborenen Reduktion von Nephrone, mit zunehmendem Alter zu einem Hypertonus (HT) und schließlich einer progredienten Niereninsuffizienz führen können, ist bisher nur in Ansätzen bekannt.

Erstmals wurde 1988 von Brenner die Hypothese formuliert, dass eine umgekehrte Abhängigkeit zwischen der Anzahl der Nephrone und dem Risiko der Manifestation eines HT besteht¹⁶. Danach kann der Mangel an Nephrone zum Zeitpunkt der Geburt das spätere Auftreten eines HT verursachen. Die kongenitale Oligonephronie ist also möglicherweise ein entscheidender pathogenetischer Faktor der essentiellen Hypertonie im Erwachsenenalter.

Diese These wird unterstützt durch den tierexperimentellen Befund, dass bei Überkreuztransplantation von Nieren zwischen normotonen und hypertensiven Rattenstämmen der HT von der Spenderniere und nicht vom Empfängerorganismus abhängt^{10 20}. Analoge Befunde wurden auch an nierentransplantierten Patienten erhoben¹⁹.

Im Gegensatz zu anderen Spezies (Tabelle 1) ist die Bildung der Nephrone beim Menschen mit der Geburt abgeschlossen⁴². Interessant ist, dass die Anzahl der Nephrone in der Normalpopulation bei sonst unauffälligen Individuen erheblich schwankt und zwischen 300.000 und über 1.100.000, im Mittel bei 600.000 liegt⁷¹. Dies ist eine ungewöhnlich hohe Varianz im Vergleich zu anderen anthropometrischen Parametern in der Normalpopulation.

Nach Brenners Hypothese haben die Individuen am unteren Ende dieser Normalverteilung ein besonders hohes Risiko einen essentiellen HT zu entwickeln, wohingegen die Individuen am oberen Ende der Verteilung eine gewisse Resistenz gegen das Auftreten eines HT und einer Nierenschädigung aufweisen sollten¹⁷.

Zusammenfassend muß angemerkt werden, dass es schwierig ist die Hypothese Brenners am Menschen direkt zu evaluieren, da es augenblicklich noch keine nicht-invasive Methode zur spezifischen und sensitiven Bestimmung der Anzahl der Nephrone im lebenden Organismus gibt.

Insofern ist bemerkenswert, dass kürzlich die Verbindung zwischen einer niedrigen Anzahl an Nephronen und dem menschlichen primären Hyertonus bestätigt werden konnte. In einer Studie besaßen Patienten mit primärem Hypertonus 46% weniger Glomerula pro Niere als die Mitglieder der normotensiven Kontrollgruppe⁵³. Diese Befunde wurden in 2007 von Hoy bestätigt und ergänzt⁴⁷.

Die Nephrogenese beim Menschen ist mit den Wochen 32-34 abgeschlossen, und ein in der Nephrogenese begründetes glomeruläres Defizit persistiert lebenslang. Somit könnte eine erniedrigte Nephronenanzahl die pathophysiologische Erklärung für einen bestimmten Anteil des Auftretens des primären Hypertonus in der Bevölkerung liefern. Brenners Hypothese wird durch Beobachtungen Barkers unterstützt, die auf einen Zusammenhang zwischen einem niedrigen Geburtsgewicht und der Entwicklung eines Hypertonus und Herz-Kreislaufkrankungen im Erwachsenenalter hinweisen⁹. Ein niedriges Geburtsgewicht korreliert mit dem späteren Auftreten eines hohen diastolischen Blutdrucks und somit dem Auftreten von kardiovaskulären Krankheiten und dem durch diese Krankheiten hervorgerufenen Tod. Dieses Phänomen wird als

Fetale Programmierung bezeichnet. Beim Menschen korrelieren das Geburtsgewicht und die Nephronenanzahl direkt, sowie das glomeruläre Volumen und der Bluthochdruck indirekt^{49 64 47}.

Die bei Geburt vorhandene Anzahl an Nephronen scheint sowohl durch genetische Faktoren als auch durch externe intrauterine Bedingungen bestimmt zu werden. Ein niedriges Geburtsgewicht, bedingt durch eine intrauterine Reifungsstörung, geht mit einer Verminderung der Nephronenanzahl einher, auch dann, wenn das Kind zum Termin geboren wird^{107 64}. Niedriges Geburtsgewicht ist mit HT im Erwachsenenalter assoziiert⁹ und möglicherweise auch im Kindesalter⁵⁹. Ein direkter Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und salzsensitivem HT ist noch nicht belegt.

1.3 Bekannte Faktoren der fetalen Programmierung der Oligonephronie

2003 postulierte Wintour, dass Konzepte wie *life before birth* oder *first environment* wichtig bei der Determinierung des fortschreitenden Risikos für die Entwicklung kardiovaskulärer/metabolischer Krankheiten sind. Jegliche Faktoren, die während der aktiven Phase der Nephrogenese die Nephrogenese unterbrechen oder moderieren und die Nephronenanzahl vermindern, führen zu maladaptiven Veränderungen im späteren Leben, die die Nierenfunktion sowie den Beginn des adulten Hypertonus (HT) beeinflussen können¹⁰⁵.

1.3.1 Proteinmangel in der Schwangerschaft

Verschiedene Autoren haben beschrieben, dass trächtige Tiere unter einer Proteinmangeldiät Nachwuchs bekommen, der bei der Geburt relativ klein ist und im Erwachsenenalter einen Bluthochdruck entwickelt. Ungeachtet postpartaler Einflüsse persistiert der Bluthochdruck das ganze Leben lang^{65 57 78 107}. Umgekehrt soll der Nachwuchs proteinreich ernährter oder vor der Gestation einseitig nephrektomierter Muttertiere eine erhöhte Anzahl von Nephronen und eine relative Resistenz bezüglich des Auftretens einer Niereninsuffizienz nach nierenschädigenden Interventionen haben¹.

1.3.2 Chirurgische Reduktion der Nephronenzahlen

Vereinbar mit diesem Befund ist die Beobachtung, dass die chirurgische Reduktion der Nephronenzahl kurz nach der Geburt später zum adulten Hypertonus führt^{16 62 63}.

1.3.3 Tierexperimentelle Hinweise

Experimentell lässt sich eine Abnahme der Nephronenzahl durch Induktion einer uterinen Ischämie nach Gabe von Aminoglykosiden erzeugen, wobei schon eine geringe Abnahme der Nephronenzahl zur Glomerulosklerose im adulten Tier führt³³.

Weiter wurde im Tiermodell gezeigt, dass sowohl hohe Konzentrationen synthetischer oder natürlicher Glukokortikoide in bestimmten kritischen Perioden der embryonalen Nephrogenese als auch hohe Blutzuckerwerte zu einer Reduktion der Nephronenzahl führten^{26 105}.

1.4 Genetische Faktoren

Genetische Faktoren haben mit großer Wahrscheinlichkeit einen direkten Einfluss auf die Anzahl der Nephrone und die Nierengröße zum Zeitpunkt der Geburt. Sowohl der Hypertonus (HT), als auch eine verstärkte Retention von Natrium nach akuter Salzbelastung sind genetisch festgelegt^{47 25 35 49 110}. Die ersten Hinweise darauf, dass die Zahl der funktionell intakten Nephrone für die Wahrscheinlichkeit einer späteren Hypertonieentwicklung entscheidend ist, sind bereits vor mehreren Jahrzehnten erhoben worden. Epidemiologische Untersuchungen zeigten, dass einige ethnische Gruppen mit erhöhter Inzidenz für das Auftreten eines HT weniger Nephrone bzw. kleinere Nieren im Verhältnis zum Körpergewicht aufweisen. So findet man in Japan bei hoher Inzidenz für HT im Durchschnitt kleinere Nieren als in anderen Normalpopulationen⁹⁷. Auch bei Afro-Amerikanern sind die Nieren durchschnittlich kleiner als bei Kaukasiern, und es tritt häufiger ein salzsensitiver HT auf^{47 49 46 61}.

Ebenso sind verschiedene Rattenmodelle mit genetisch determiniertem HT und chronisch progredientem Nierenversagen durch eine angeborene verminderte Anzahl von Nephronen charakterisiert¹⁶ (Tabelle 2). Genaue pathologische

Regulationsmechanismen während der Nephrogenese, die schließlich zu einer Oligonephronie führen, sind noch wenig bekannt.

Eines der diesbezüglich untersuchten Systeme stellt das IGF-System dar. Es gibt Hinweise einer Vielzahl von Autoren und aus Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe, dass in der Nephrogenese das *insulin-like growth factor*-System (IGF-System) eine wichtige Rolle im physiologischen Ablauf einer ungestörten Nephrogenese spielen könnte.

In der vorliegenden Arbeit werden aufgrund ihrer bekannten Rollen in der Nephrogenese das Renin-Angiotensin-System (RAS) sowie das Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-System (OPN-CD44-Integrinrezeptor-System) anhand vergleichender Untersuchungen an zwei genetisch unterschiedlichen Rattenstämmen untersucht.

1.4.1 Das Renin-Angiotensin-System in der Nephrogenese

Die Beteiligung des Renin-Angiotensin-System (RAS) an der Nephrogenese wird bereits seit einigen Jahren angenommen ^{44 70 69 65 107 108 37}.

Dabei scheint das RAS während der Nephrogenese besonders an der Gefäßbildung beteiligt zu sein. So wird die Aktivität des RAS während der Nephrogenese in den Bogenarterien, den Interlobulargefäßen und in den afferenten Arterien der Glomerula beschrieben ^{100 37,69}. Eine geringere Expression des RAS während der Gefäßentwicklung führt zu abnormaler Gefäßbildung. Diese beeinträchtigt auch die Ausbildung der Glomerula. Eine verminderte Glomerulazahl ist die Folge. Dies kann im erwachsenen Leben zum Hypertonus und Endorganschäden führen ^{65 108 107 37 100}. Die experimentelle Unterdrückung des RAS z.B. mittels einer proteinarmen ^{57 101} oder einer salzreichen mütterlichen Diät oder der postnatalen Verabreichung von Angiotensin II (Ang II) -Typ 1 (AT1)-Rezeptorblockern während der Schwangerschaft unterstützen o.g. Beobachtungen einer gestörten Nephrogenese ^{100 107 72 68 66 105}.

1.4.1.1 Untersuchte Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems

In der Niere werden sowohl während der Nephrogenese als auch im vollfunktionsfähigen, ausgereiften Organ alle Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) stark exprimiert. ¹⁸

1.4.1.1.1 Angiotensin II-Rezeptoren Typ 1a und Typ 1b

Die zurzeit bekannten Angiotensin II–Rezeptoren lassen sich in zwei Subtypen, Angiotensin II-Rezeptor-Typ 1 (AT1) und Angiotensin II-Rezeptor-Typ 2 (AT2) unterteilen. Von dem Rezeptorsubtyp AT1 existieren zwei Isoformen: AT1a und AT1b. AT1- und AT2-Rezeptoren kommen beim Erwachsenen in vielen Geweben vor; hauptsächlich in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde und in glatten Muskelzellen der Blutgefäße. Wie oben bereits erwähnt gehören sie zu der Familie der Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren und sind an G-Proteine gekoppelt. Die Informationsweiterleitung läuft über den Phosphatidylinositzyklus ab. Somit folgt einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration eine Hemmung der Adenylatcyclase sowie indirekt durch Hemmung entsprechender Kaliumkanäle die Aktivierung eines spannungsregulierten Kalziumkanals.²³

Beim Menschen kodiert jeweils ein Gen für den AT1-Rezeptor und ein anderes für den AT2-Rezeptor. Demgegenüber kodieren bei der Ratte und der Maus zwei Gene für die beiden Isoformen des Rezeptorsubtyps AT1, AT1a und AT1b, und ein anderes für den Rezeptorsubtyp AT2. Die DNA-Sequenzen der Gene der beiden Isoformen des AT1-Rezeptors bei der Ratte sind zu 90% homolog. Die Proteinsequenz der beiden Isoformen ist sogar zu 95% homolog. Funktionell scheint kein Unterschied zwischen beiden Isoformen zu bestehen. Jedoch unterscheidet sich das Verhältnis ihrer quantitativen Expression in den jeweiligen Organen. In den meisten Fällen ist der dominierende Isotyp der AT1a-Rezeptor. In der Hirnanhangdrüse und in der Nebenniere überwiegt jedoch der AT1b-Rezeptor-Isotyp. Durch Beobachtungen und Experimente bei Ratten und Mäusen mit Deletionen der einzelnen und beider Gene der Isotypen AT1a und AT1b zeigte sich, dass der Ausfall eines der beiden Rezeptorisotypen durch die Funktion des verbliebenen Rezeptorisotyps anscheinend kompensiert werden kann. Nur wenn die Gene der beiden Isotypen gleichzeitig deletiert waren, stellten sich die gleichen pathologischen Veränderungen ein, die auch durch pharmakologische Rezeptorblockade durch Losartan hervorgerufen werden können³.

In vielen fetalen Geweben findet sich auch der Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 (AT2). Der AT2-Rezeptor ist zu 34% mit dem AT1-Rezeptor identisch und verfügt aufgrund seiner DNA- und Proteinsequenz ebenfalls über die Topologie eines Sieben-

Transmembrandomänen-Rezeptors mit der Fähigkeit zur Kopplung mit G-Proteinen ²³
85.

Interessanterweise wird der AT2-Rezeptor beim Erwachsenen im Areal von Hautverletzungen besonders stark exprimiert, so dass man von einer Rolle bei der Wundheilung ausgeht ⁹⁴.

Guron und Friberg heben von allen während der sich entwickelnden Nieren stark exprimierten Komponenten des RAS besonders Angiotensin II hervor. Die pharmakologische Blockierung des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 (AT1) mit den daraus resultierenden rezeptorvermittelten Effekte bei Tieren in der Nephrogenese führt zu den typisch spezifischen Abnormitäten wie papillärer Atrophie, abnormen Wandverdickungen der intrarenalen Arteriolen, tubulärer Atrophie kombiniert mit interstitiellem Wachstum und einer deutlichen Einschränkung der Urinkonzentrierungsfähigkeit. Ähnliche Veränderungen treten auch bei der Maus auf, wenn in gleicher Weise die Gene des RAS inaktiviert werden ^{37 38 106}.

Die Angiotensin II-Rezeptor Typ 1-Rezeptorblockade mit Losartan, einem AT1-Rezeptorblocker, während der postnatalen Tage 1-12, während deren die Nephrogenese bei Ratten fortschreitet, resultiert in einer geringeren Anzahl an Nephronen (reduziert bis zu 42%) und salzsensitivem Hypertonus im Erwachsenenalter. Postnatal gegebenes Losartan führt zu weniger, dickeren und kürzeren Arterien ^{100 105}.

1.4.1.1.2 Angiotensinogen

Angiotensinogen ist das Vorläuferpolypeptid einer Reihe von vasoaktiven Oligopeptiden, die durch sukzessive proteolytische Spaltungen durch die Endopeptidase Renin und die beiden Carboxypeptidasen, Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) und Angiotensin-Konversionsenzym 2 (ACE2), entstehen. Nahm man zunächst an, dass im erwachsenen Organismus Angiotensinogen vor allem in der Leber gebildet wird und erst durch den Blutkreislauf an den Ort der Aktivierung gelangte, hat man mittlerweile die Bildung von Angiotensinogen auch in mesangialen Zellen der Nieren nachgewiesen. Zumindest das systemische Angiotensinogen könnte seiner molekularen Größe entsprechend im Glomerulum primär filtriert werden. Dabei würde es im tubulären Teil des Glomerulums als Substrat für das vom (Pro)-Renin-Rezeptor ((P)RR) gebundene (Pro)-Renin dienen und zu Angiotensin I umgewandelt werden. Das mesangiale

Angiotensinogen in der Niere könnte dagegen im efferenten Schenkel und im tubulären Gefäßnetz aktiviert werden und seine lokale oder systemische Wirkung über die verschiedenen intravasalen Angiotensin II-Rezeptoren entfalten^{77 67}.

1.4.1.1.3 Angiotensin-Konversionsenzym und Angiotensin-Konversionsenzym 2

ACE

Das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) ist eine membranständige Ekto-Dipeptidylcarboxypeptidase, die das Decapeptid Angiotensin I in das physiologisch hochaktive vasokonstriktive, mitoseinduzierende und apoptosehemmende Angiotensin II umwandelt. Alternativ bildet es aus dem Angiotensin(1-9) das vasodilatorische, mitosehemmende und apoptoseinduzierende Angiotensin(1-7). ACE wird in der erwachsenen Rattenniere vorwiegend in den mesangialen Zellen des Glomerulums exprimiert. ACE kommt in drei Isoformen vor. Eine Isoform ist löslich⁹². ACE-Hemmung oder AT1-Rezeptorblockade während der Nephrogenese führt zu den oben genannten, ausgeprägten morphologischen Veränderungen der Nieren, die auch nach Beenden der Behandlung fortbestehen (Atrophie der Papillen, Erweiterung des Nierenbeckens, tubuläre Atrophie und Dilatation, weniger, dickere und kürzere Arteriolen, kleinere und weniger Glomerula)¹⁰⁰.

ACE2

Das Angiotensin-Konversionsenzym 2 (ACE2) ist eine membranständige Ekto-Monopeptidylcarboxypeptidase, die Angiotensin I in Angiotensin (1-9) und Angiotensin II in Angiotensin (1-7) umwandelt. In der Niere wird ACE2 in epithelialen Zellen des Glomerulum und in allen Segmenten des Tubulus exprimiert, mit Ausnahme des aufsteigenden Asts der Henle-Schleife, sowie in geringerem Maße in den mesangialen Zellen des Glomerulums. Die Expression ist in den epithelialen Zellen des proximalen Tubulus und der Sammelrohre des inneren Nierenmarks erhöht. Weiterhin wurde ACE2 sowohl in viszeralen und parietalen Epithelzellen des Glomerulums als auch in vaskulären glatten Muskelzellen und in endothelialen Zellen der interlobulären Nierenarterien gefunden^{41 92 86 21}. Zur Expression von ACE2 in der embryonalen Entwicklung der Rattenniere gibt es bisher noch keine veröffentlichten Ergebnisse. Jedoch fand man bei einer Untersuchung der ACE2-Expressionsniveaus in der Niere von spontan hypertensiven Ratten (SHR), dass in diesem Modell die mRNA-

Expressionsniveaus unmittelbar nach der Geburt zunächst erhöht waren, ehe sie im Verlauf der klinischen Ausprägung der postpartalen Hypertonie absanken und auf dem niedrigen Niveau verblieben⁹⁸.

1.4.2 Das Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-System in der Nephrogenese

Wachstumsfaktoren und ihre intra- und extrazelluläre Wirkung

Neben den Transkriptionsfaktoren haben Wachstumsfaktoren (GF) eine zentrale Bedeutung in der Nephrogenese. Sie vermitteln eine Stimulation der Mitose, Migration, Induktion, Differenzierung, Polarisierung, Proliferation und Apoptose. Die Interaktion der verschiedenen GF und ihrer Rezeptoren bei der Regulation der Organogenese wird in ihrer großen Komplexität bei weitem noch nicht verstanden.

Die am besten untersuchten GF der Nephrogenese sind der *insulin-like* GF (IGF)-I und -II, *hepatocyte* GF (HGF), *transforming* GF (TGF)- β und *basic fibro-blast* GF (FGF). Neben diesen beeinflussen auch andere GF die Organogenese der Niere⁸³.

In Zellkultur-Experimenten reagieren epitheliale embryonale Nierenzellen sehr unterschiedlich auf spezifische Wachstumsfaktoren (GF) und synergistische Effekte zwischen verschiedenen GF-Familien scheinen eine große Bedeutung zu haben⁴⁵. Noch nicht induziertes metanephritisches Mesenchym reagiert auf keinen der o.g. GF mit einer Tubulogenese¹⁰⁴.

Das hat zu dem Schluß geführt, dass nicht nur Interaktionen der verschiedenen GF, sondern auch Signale von extrazellulären Matrix (ECM)-Proteinen eine regulatorische Funktion in der Nephrogenese haben. Unter den ECM Proteinen ist die Laminin- und Integrin-Familie in ihren Interaktionen mit den GF am besten untersucht⁴⁵.

Mit der Induktion und dem Beginn des mesenchymal-epithelialen Übergangs (MET) setzt eine tiefgreifende Änderung des epithelialen Phänotyps ein. Die bis dahin ausgeprägten Kollagen I und II-Expressionsmuster sowie die *cell adhesion molecule* (CAM)-Expressionsmuster verschwinden zugunsten von epithel-spezifischen Molekülen aus der Laminin- und Integrin-Gruppe und Kollagen IV. Wird die Laminin- oder Integrin-Expression experimentell blockiert, so bleibt eine weitere Zelldifferenzierung aus²⁷. Osteopontin (OPN) ist ein bekannter Mediator entzündlicher Prozesse der renalen

ECM. Es enthält die Peptidsequenz Arginin-Glycin-Aspartat (RGD-Sequenz), die verschiedenen Integrinen als Bindungsstelle dient. OPN wird im *Metanephros* der Ratte exprimiert, und eine OPN-Integrin-Interaktion scheint für die Tubulogenese wichtig zu sein ⁸². Darüber hinaus hat OPN anti-apoptotische Wirkungen während der Kondensationsphase im metanephritischen Blastem ⁸². Während der Nephrogenese scheint die Bindung an den CD44-Rezeptor weiterhin von Bedeutung zu sein. Es ist bisher nicht untersucht, welche Bedeutung die Expression von ECM-Proteinen auf die Anzahl von gebildeten Nephronen hat.

Das bereits ausführlich beschriebene, während der Nephrogenese aktive, vor allem an der Glomerulogenese beteiligte Renin-Angiotensin-System (RAS) scheint während der komplexen molekularen Abläufe der Nephrogenese im Sinne einer Expressionsverstärkung Einfluss auf die mRNA-Expression des während der Nephrogenese vor allem an der Tubulogenese beteiligten Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-Systems zu haben. So induziert Angiotensin II die Osteopontin-mRNA-Expression. ¹⁰⁹

1.4.2.1 Untersuchte Komponenten des Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-Systems

1.4.2.1.1 Osteopontin

Als Teil dieser Familie kann Osteopontin (OPN) Bindungen mit multiplen Liganden eingehen, die für eine Vielzahl sowohl physiologischer als auch pathologischer Prozesse von herausragender Bedeutung sind. Alle Mitglieder der Familie können über ein RGD-Motiv mit mindestens einem Integrinrezeptor eine Verbindung eingehen. So bindet OPN je nach dem Grad der Phosphorylierung oder Glykosylierung an viele peptidische und mineralische Liganden, wie z.B. an das alpha(v)beta(3)-Integrin, an CD44, oder an Hyaluronsäure (HA). Die Interaktionen zwischen OPN und seinen Liganden, die intrazellulären sekundären Interaktionskaskaden und die Spezifität dieser Kaskaden, hinsichtlich ihrer Funktion, sind noch nicht gut erforscht. Während der Nephrogenese spielen die Bindungen mit den Integrinrezeptoren, insbesondere mit dem CD44 Rezeptor und Hyaluronsäure, eine Rolle.

Bei adulten Ratten konnte nach ischämischem Stress eine verstärkte OPN-mRNA-Expression in den Rattennieren der Versuchstiere verzeichnet werden. Aufgrund der

vorhandenen Parallelen zwischen Nephrogenese und Regeneration kann man auf eine Funktion OPNs in der Nephrogenese schließen⁸². Rogers wies die mRNA-Expression OPNs an unterschiedlichen Tagen während der Nephrogenese nach⁸². Er zeigte, dass bei Ratten OPN noch vor der Kondensation im Metanephron ab Embryoanitag 13 (E13) exprimiert wird. Sowohl in der Ureterknospe als auch in dem sich entwickelnden Nephronsegment vor der Geburt und in der nephrogenischen Zone nach der Geburt bleibt diese Expression erhalten⁸². OPN scheint während der Nephrogenese als ein wichtiger Regulator der prä tubulären Kondensation des metanephritischen Blastems über den alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor zu agieren⁸². Ein pharmakologisches Blockieren entweder von OPN direkt, oder des alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptors durch Anti-OPN-Antikörper oder Proteine, die die Nukleinsäuresequenz Arg-Gly-Asp besitzen, cycloRGDfV, Anti-alpha(v)beta(3)-AK oder LM609 verhindert die normale Nephrogenese. Die Einführung von alpha(v)-antisense-Oligonukleotiden oder -Antikörpern in die metanephritische Organkultur führt zu der Dymorphogenese der Niere mit einer reduzierten Population an Nephronen⁸².

Diese Beobachtungen deuten, wie o.g., auf Parallelen zwischen der Nierenentwicklung und der Nierenregeneration hin. Zelluläre Migration, die beiden Prozessen zugrunde liegt, benötigt OPN, welches in der Niere gebildet wird, sowohl um die epithelialen Zellen aus der extrazellulären Matrix proteolytisch zu lösen als auch um die zeitweise von ihren Matrices losgelösten Zellen vor Apoptose zu bewahren^{82 48}.

In fetalen, menschlichen Nieren wird Osteopontin ca. ab Tag 75-80 der Schwangerschaft im tubulären Epithel gebildet¹⁰³. Dabei findet man OPN zeitweise auch in der Ureterknospe und in einigen interstitiellen Zellen. Die Protein- und mRNA-Spiegel steigen mit dem Gestationsalter und bleiben bis in das Erwachsenenalter⁴⁸ erhalten.

1.4.2.1.2 CD44-Rezeptor

Der CD44-Rezeptor (CD44) enthält mindestens 19 Exons, die in eine Vielzahl von CD44-Formen gespleißt werden^{32 99 87}. In embryonalen Nieren ist der CD44-Rezeptor basolateral in von der Ureterknospe (UB) abstammenden Strukturen zu finden. Die unter anderem in dem komplexen *cross-talk* der Nephrogenese über die CD44-Rezeptoren agierende gegenseitige Interaktion zwischen dem metanephritischen

Mesenchym (MM) und der Ureterknospe (UB) in der sich entwickelnden Niere führt zu der Verzweigungsmorphogenese und der Bildung des Ureterbaumes. Hyaluronsäure als wichtiger Ligand des CD44-Rezeptors tritt ebenfalls in der Nähe des sich entwickelnden Ureterbaums auf ⁷⁵. In der extrazellulären Umgebung stimuliert Hyaluronsäure über CD44 deutlich die Bildung zellulärer Wachstumsprozesse und multizellulärer Schnüre (frühe Schritte in der Verzweigungsmorphogenese) und spielt eine Rolle als „Überlebensfaktor“ für die Zelle.

Das Blocken von CD44, dem hauptsächlichen Oberflächenrezeptor, oder die Degradation von Hyaluronsäure führt zu vermindertem Zellüberleben und verminderter Morphogenese. Während der Morphogenese in Anwesenheit von Hyaluronsäure (HA) ändert sich die Expression einer kleinen Gruppe von Genen, die für Apoptose, Proliferation und Morphogenese zuständig sind. Dazu gehört die Hochregulierung des CD44-Rezeptors, der auf den Knospenspitzen der Verzweigungen zu finden ist ⁷⁵. Weiterhin zeigt sich sowohl im Metanephritischen Mesenchym (MM) als auch in der Ureterknospe (UB) die HA-Synthase, so dass man von der Fähigkeit Hyaluronsäure sezernieren zu können ausgehen kann ⁷⁵.

Man vermutet, dass HA die Verzweigungsmorphogenese fördert, indem sie eine positive Rückkopplungsschleife kreiert, die einerseits die Interaktion von CD44 mit Hyaluronsäure auf den Knospenspitzen verstärkt und andererseits ein Transkriptionsprogramm aktiviert, welches Zellüberleben/-proliferation und Migration/Morphogenese von Zellen durch die Expression von morphoregulatorischen Schlüssel-molekülen fördert ⁷⁵. Die intrazelluläre Form OPNs scheint mit dem Hyaluron-CD44-Ezrin/Radixin/Moesin(ERM)-Proteinkomplex in embryonalen, migrierenden Fibroblasten assoziiert zu sein. Dieser Komplex verbindet CD44 mit intrazellulärem Aktin und steht mit dem Phosphatidylinositol-Signalweg in Verbindung und könnte darüber in die Migration von Fibroblasten, aktivierten Makrophagen und metastatischen Zellen involviert sein.

Auch an anderen Schauplätzen wird eine Interaktion Osteopontins mit dem CD44 Rezeptor beschrieben; so z.B. in der Pathogenese der Steinbildung nach Nierenschäden oder bei proinflammatorischen und chemotaktischen Reaktionen via T-Lymphozyten ^{102 109 112}.

1.4.2.1.3 alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor

In der Nephrogenese wirkt OPN über den alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor als ein Regulator der prä tubulären Kondensation des metanephritischen Blastems (MM)⁸². Die Bindungen mit den Integrinen, z.B. alpha(v)beta1, alpha(v)beta3, alpha(v)beta(v), alpha9beta1 und alpha4beta1, beruhen auf dem RGD-Motiv und dem Phosphorylierungsgrad des OPN¹⁰⁹. Diese Bindungen sind für die chemotaktische Wirkung OPNs auf glatte Muskelzellen, endotheliale Zellen und Makrophagen von Bedeutung².

Die Wirkung OPNs kann über den alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor im Sinne einer antiapoptotischen Rolle in der Nephrogenese agieren, da kultivierte blastemische Zellen des Metanephrons in der Gegenwart von trunkiertem OPN199 eine gesteigerte Apoptoserate aufweisen⁸². Folgerichtig scheint OPN eine wichtige antiapoptotische Rolle während der Kondensation des metanephritischen Blastems zu spielen, ein unabdingbares Vorstadium der Nephronbildung *in vivo*. Rogers bezieht sich dabei auf Denhardt, dass OPN diesen antiapoptotischen Effekt, interagierend mit dem alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor, über eine Hochregulierung des antiapoptotischen Protoonkogens bcl-2 bewirkt²⁴. Seine Vermutung wird durch den Nachweis von bcl-2 in dem sich kondensierenden metanephritischen Blastem⁵⁸ und das Auftreten fulminanter Apoptose⁹³ bei dem Fehlen von bcl-2 unterstützt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass OPN, das während der Nephrogenese in dem Rattenmetanephron *in vivo* exprimiert wird, auch *in vitro* über die Bindung zum alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor seine Rolle in der Nephrogenese entfaltet⁸². Die Integrinrezeptor-Expression des Integrins alpha(v) hat man an E13 auch bereits bei der Maus nachweisen können. Dort konnte dieses Integrin sowohl in epithelialen Elementen der sich entwickelnden Nephronen nachgewiesen werden als auch seine Assoziation mit der beta(3)-Untereinheit. Unterstützend zeigen sich in dieser Hinsicht die Beobachtungen bei Ratten, dass OPN im Metanephron ab E13, noch vor der Kondensation, exprimiert wird⁸². Sowohl in der Ureterknospe, als auch in dem sich entwickelnden Nephronsegment vor der Geburt und in der nephrogenischen Zone nach der Geburt bleibt diese Expression erhalten. Ein Blockieren entweder von OPN direkt oder des alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptors durch Anti-OPN-Antikörper oder Proteine, die die Nukleinsäuresequenz Arg-Gly-Asp besitzen, cycloRGDfV, Anti-alpha(v)beta(3)-AK oder LM609 verhindert die normale Nephrogenese. Somit führt die Einführung von

alpha(v)-Antisense-Oligonukleotiden oder Antikörpern in die metanephritische Organkultur zu der Dysmorphogenese der Niere mit einer reduzierten Population an Nephronen⁸².

1.5 Auswahl des Tiermodells

Um die Genexpression in der Niere während der intrauterinen Entwicklung und post partum zu untersuchen, musste ein Tiermodell, welches durch eine angeborene verminderte Anzahl von Nephronen mit spontanem salzsensitiven arteriellen Hypertonus, Albuminurie und chronisch progredientem Nierenversagen im Erwachsenenalter charakterisiert ist, gewählt werden. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Charakteristika entsprechender Tiermodelle.

Tabelle 2 : Nephronenanzahl, arterieller Hypertonus und progredientes Nierenversagen in verschiedenen hypertensiven Rattenstämmen

Hochdruck- Rattenstamm	Kontroll- Rattenstamm	% Nephrone vs. Kontrolle	Kommentar	Referenz
Munich-Wistar- Frömter	Wistar	51%	spontaner HT und HT nach Salzbelastung, FSGS	^{84 40 29 55}
Dahl salzsensitiv	Dahl salzresistent	85% -100%	HT nach Salzbelastung; FSGS	^{95 4 76}
Milan- hypertensiv	Milan- normotensiv	83%	HT und keine FSGS	^{8 14 11}
Prag- hypertensiv	Prag- normotensiv	81%	spontaner HT; keine Daten zu FSGS	⁴³
Fawn Hooded	Wistar	100%	Nephronenanzahl nicht in Subgruppen mit höchstem HT und FSGS quantifiziert	²²
PVG/c	Wistar	122%	Hypotonie und Resistenz gegen FSGS	³⁶

Abkürzungen: HT, arterieller Hypertonus; FSGS, fokal-segmentale Glomerulosklerose. Tabelle erweitert und modifiziert nach Brenner [16, 38]

Die Tabelle 2 zeigt, dass bereits auch einige andere Rattenmodelle mit einem angeborenem Hypertonus eine geringere Anzahl an Nephronen aufweisen^{16 91}. Die salzsensitive Dahl-Ratte weist eine Reduktion von 15% auf, die Milan Bluthochdruckratte eine Reduktion von 17% und die spontan-hypertensive Ratte ein Reduktion von 14%. Im salzsensitiven Dahl Rattenmodell wurden sich widersprechende Befunde hinsichtlich der Anzahl der Nephrone erhoben. Azar und Mitarbeiter berichten eine 15%ige Reduktion der Nephrone im salzsensitiven im Vergleich zum salzresistenten Dahl-Rattenstamm⁵. Eine longitudinale Studie von Sterzel und Kollegen zeigt aber, dass eine Albuminurie schon vor Salzbelastung, also im prähypertensiven Stadium, ohne erhöhten glomerulären Druck und mit unveränderter Nephronenzahl zu beobachten ist⁹⁵.

Die Progression der Nierenschädigung ist aber nach Manifestation des HT beschleunigt. Eine salzarme Diät verzögert, verhindert jedoch nicht die fortschreitende Nierenschädigung in salzsensitiven Dahl-Ratten²⁰.

Für unsere Versuche haben wir die MWF-Ratte gewählt, weil sie im Vergleich zu den o.g. Ratten eine sehr viel stärkere Reduktion der Nephrone von 50% aufweist. Diese Reduktion der Nephronenzahl ist bereits ab dem Embryonaltag E19 nachweisbar und mit einem Anstieg der Filtrationsfläche der einzelnen Glomerula an D100 assoziiert^{30,83}. Tabelle 3 gibt einen Überblick über morphologische und funktionelle Befunde bei MWF-Ratten.

Tabelle 3: Morphologische und funktionelle Befunde bei MWF-Ratten

Parameter	MWF	Referenzstamm	Interpretation	Geschlecht/ Alter in Wo	Referenz
Anzahl der Glomerula pro Niere	m $13,7 \pm 1,4 \cdot 10^3$ w $13,0 \pm 1,8 \cdot 10^3$	Wistar	erniedrigt Faktor 0,5	12-14 Wo	28
Systolischer Blutdruck (mmHg)	184 ± 17	ACEI MWF	erhöht 40mmHg	ca. m/34 Wo	80
Systolischer Blutdruck (mmHg)	m 165 ± 2 w 156 ± 3	Lewis	m +30mmHg w +20mmHg	14 Wo	55
Systolischer Blutdruck unter 8% NaCl (mmHg)	m 220 ± 8 w 192 ± 9	MWF Normaldiät	m +55mmHg w +36mmHg	14 Wo	55
Proteinurie (mg/d)	295 ± 64	MWF im Alter von 10 Wo	deutlich erhöht, ca. Faktor 10	m/34 Wo	80
Albuminurie (mg/d)	23 ± 8	Lewis	deutlich erhöht, ca. Faktor 60	m/14 Wo	55
Albuminurie unter 8% NaCl (mg/d)	87 ± 20	MWF Normaldiät	deutlich erhöht, ca. Faktor 4	m/14 Wo	55
Glomerulärer Druck P_{GC} (mmHg)	51 ± 1	ACEI MWF	normal	m/18 Wo	80
Proximal tubulärer Druck P_T (mmHg)	13 ± 1	ACEI MWF	normal	m/18 Wo	80
Transglomerulärer Druck	38 ± 2	ACEI MWF	normal	m/18 Wo	80
Einzelnephron GFR SNGFR (nl/min)	102 ± 19	Wistar	erhöht ca. Faktor 2	m/12-14 Wo	28
Glomerulärer Plasmafluss Q_A (nl/min)	367 ± 114	Wistar	erhöht ca. Faktor 2	m/12-14 Wo	28

MWF: Munich Wistar Frömter Ratte; m: männlich; w: weiblich; ACEI: ACE Hemmung

Diese anatomischen Gegebenheiten werden von einer Reihe funktioneller Änderungen begleitet. So ist z.B. eine Zunahme der Einzelnephronfiltrationsrate bei männlichen, ausgewachsenen MWF-Ratten dokumentiert ³⁹. Der durch ein Nephronendefizit verursachte spontane Hypertonus wird von einer Albuminurie und progressiven, renalen Schäden wie Glomerulosklerose und interstitieller Fibrose beim ausgewachsenen MWF-Tier begleitet.

Das Munich-Wistar-Frömter (MWF)-Rattenmodell ist das einzige bisher morphologisch und funktionell ausreichend charakterisierte Tiermodell mit ausgeprägter kongenitaler Oligonephronie. Es vereint in sich die klinisch bedeutsamen Risikofaktoren der Progression der chronischen Niereninsuffizienz: spontaner salzsensitiver arterieller Hypertonus und Proteinurie (Tabelle 2 und Tabelle 3). Deshalb ist die MWF-Ratte das momentan beste Modell zur Identifikation ontogenetischer Faktoren, die zur Oligonephronie und anschließender arterieller Hypertonie, Albuminurie und progredienter Niereninsuffizienz führen.

Der MWF-Tierstamm entstammt einer Sublinie der Ivanovas-Wistar-Ratten und wurde ursprünglich von Professor Frömter, Frankfurt/Main, selektiert und dann ab 1978 im Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover als MWF/Ztm-Tierstamm über fünf Generationen auf subkapsulär gelegene Glomerula weiterselektiert ⁴⁰.

Dieser Stamm weist über 50 kapselberührende Nierenkörperchen pro Niere auf ⁵². Weil man aus diesen durch Mikropunktion der Bowman-Kapsel direkt Ultrafiltrat gewinnen kann, erschien die MWF für experimentelle Untersuchungen interessant.

In nachfolgenden Untersuchungen wurden dann weitere phänotypische Befunde erhoben. Ausgehend von einer zunächst verringerten Glomeruladichte konnte dann bei den MWF/Ztm-Ratten eine erniedrigte Glomerulaanzahl nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Wistar-cryptorchic-(WC/Ztm-) Ratte war die Glomerulazahl bei MWF/Ztm-Tieren um 27% reduziert ⁵².

Weiterhin wurde beobachtet, dass männliche Tiere relativ früh eine arterielle Hypertonie und Proteinurie entwickeln, während diese klinisch-pathologischen Befunde bei weiblichen Tieren verzögert und abgeschwächt auftraten.

In den letzten Jahren hat die Arbeitsgruppe der Dres. Guiseppa und Andrea Remuzzi, Bergamo, wesentliche Untersuchungen bei MWF-Ratten durchgeführt [82-95]. Die

Untersucher haben in einer gemeinsamen Arbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Barry M. Brenner, Boston, auf die Bedeutung der MWF-Ratte zum Studium der Pathogenese des arteriellen Hypertonus und der progredienten chronischen Niereninsuffizienz hingewiesen ³⁰. In dieser Arbeit konnten die Autoren nachweisen, dass männliche MWF-Ratten im Alter zwischen 12 und 14 Wochen eine Proteinurie entwickeln, wohingegen weibliche MWF-Ratten zu diesem Zeitpunkt noch eine normale Proteinausscheidung im Urin aufweisen ³⁰. Die Anzahl der Glomerula war sowohl in männlichen (-51%) als auch weiblichen (-47%) MWF-Ratten im Vergleich zu Wistar-Kontrollratten signifikant niedriger. Im Verhältnis zum Körpergewicht war sowohl in den männlichen MWF-Ratten als auch in den männlichen Wistar-Ratten die Anzahl der Nephrone um 63% gegenüber den weiblichen MWF- und Wistar-Tieren reduziert ³⁰. In männlichen MWF-Ratten waren die Einzelnephron-GFR (SNGFR) und der renale Plasmafluß (RPF) im Vergleich zu den anderen drei Gruppen verringert.

Salzbelastung, bei verminderter Nephronenzahl der MWF-Ratten, sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Tieren, führt zu einer ausgeprägten Hypertonie und einem Anstieg der Albuminurie ⁵⁵. Basierend auf den bislang durchgeführten Untersuchungen kann man zusammenfassend feststellen, dass männliche MWF-Ratten eine verminderte Glomerulazahl (Nephronenzahl), eine spontane salzsensitive Hypertonie und Proteinurie entwickeln, wobei der intraglomeruläre Druck (P_{GC}) normal ist und die nachgewiesene Erhöhung der SNGFR auf einen erhöhten Ultrafiltrationskoeffizienten (Kf) zurückgeführt werden kann. Bisherige Befunde zeigen, dass der erhöhte Kf sowohl durch eine Vergrößerung der Filtrationsfläche wie auch durch eine Erhöhung des druckabhängigen Filtrationsfaktors bei MWF-Tieren hervorgerufen werden kann. Inwieweit die drei Parameter erniedrigte Nephronenzahl, arterielle Hypertonie und Proteinurie kausal zusammenhängen ist momentan noch nicht abschließend geklärt ⁶⁰. Die bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass funktionelle Veränderungen an der glomerulären Basalmembran (GBM) für die Manifestation der Proteinurie mitverantwortlich sind ^{79 81 51}. Hierfür sprechen die Befunde, daß eine Therapie des spontanen Hypertonus mit Hemmstoffen des ACE die Proteinurie reduzieren, jedoch nicht normalisieren kann, obwohl keine strukturellen oder ultrastrukturellen Veränderungen nach ACE-Hemmung nachweisbar waren. Eine Behandlung des spontanen Hypertonus mit dem Dihydropyridin-Calciumantagonisten Nitrendipin blieb hingegen trotz gleicher Senkung des arteriellen Blutdrucks ohne

Einfluss auf die Proteinurie. Im Gegensatz zur Nitrendipinbehandlung war der ACE-Hemmer jedoch in der Lage den normalen glomerulären Druck um ca. 10 mm Hg (50 vs. 40 mm Hg) auf niedrig normale Werte zu senken. Infolgedessen kann postuliert werden, dass bei MWF-Ratten ein funktioneller Defekt an der GBM vorliegt, der bereits in Gegenwart eines normalen glomerulären Druckes zur Proteinurie führt. Die Bedeutung von funktionellen Veränderungen und der Einfluss von geschlechtsspezifischen Faktoren wird durch die Tatsache belegt, dass weibliche MWF-Ratten hinsichtlich der Reduktion der Glomerulazahl und der Glomerulagröße ähnliche Veränderungen aufweisen wie männliche Tiere, obwohl die Entwicklung der Hypertonie und Proteinurie deutlich abgeschwächt und verzögert ist. Auf der Basis der bisher berichteten Untersuchungsergebnisse sind die wesentlichen phänotypischen Befunde der männlichen MWF-Ratte in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Als Kontrollstamm sollen Wistar-Ratten dienen, da diese genetisch sehr nahe am Ursprungstamm der MWF Ratte liegen und damit die genetische Heterogenität ohne Beziehung zur bearbeiteten Pathologie minimal ist ⁸⁴.

Für keines der in Tabelle 2 aufgeführten Tierstämme sind bisher Untersuchungen während der Nephrogenese zur Genexpression des renalen RAS oder des OPN-CD44-Integrinrezeptor-Systems erfolgt.

1.6 Zusammenfassung

Die beschriebenen Beobachtungen unterstreichen die Notwendigkeit intakter Signalwege des RAS, des OPN-CD44-Integrinrezeptor-Systems und des IGF-Systems in der embryonalen Niere als eine notwendige Bedingung für eine normale Nierenentwicklung. Das RAS ist nicht nur systemisch im Gefäßsystem des Organismus, sondern auch gewebeständig in verschiedenen Organen gefunden worden ^{6 56 74}.

In der Niere findet man neben der lokalen Expression im vaskulären Mesangium alle seine funktionellen Komponenten im Glomerulum und Tubulussystem ¹⁸.

Seit 1990 ist bekannt, daß Angiotensin II in sehr hoher Konzentration im Ultrafiltrat und in den renalen Arteriolen gefunden wird ⁸⁸. In der Nephrogenese scheint das RAS dabei neben den bekannten vaskulären Funktionen auch Wachstum und Differenzierung von

tubulären Zellen zu induzieren. Der molekulare Mechanismus, der aufgrund eines supprimierten RAS den renalen pathoanatomischen Veränderungen zugrunde liegt, ist noch nicht geklärt. Hier könnte das RAS auf der Ebene von Zell-zu-Zell und Zell-zu-Matrix-Interaktionen von Bedeutung sein. Weitere molekulare Interaktionspartner, die an Geweberemodellierung und –reparaturprozessen beteiligt sind, wie z.B. Osteopontin, könnten dabei ebenfalls eine Rolle spielen.

Zusammengefasst scheinen das IGF-System, das RAS sowie das OPN-CD44-Integrinrezeptor-System Glieder in dem komplexen, temporospatialen Prozeß der Differenzierung der Nephrone als sich gegenseitig beeinflussende Systeme in Form eines hochkomplexen *cross talk* beteiligt zu sein. Jeweils werden sie jedoch spezifisch in den drei Abschnitten des Gesamtnephrons, Harnleiter, Sammelrohre, distaler und proximaler Tubulus und Henle-Schleife sowie Bowman-Kapsel und seinem begleitenden Gefäßsystem nebeneinander in der jeweiligen zellspezifischen Kombination exprimiert. In der vorgelegten Arbeit werden genetisch bekannte Expressionsmuster dieser Systeme in einem normo- sowie hypertensiven Rattenstamm untersucht.

2 Aufgabenstellung

Es ist das Ziel dieser Arbeit, die Genexpressionen von Komponenten des RAS und des OPN-CD44-Integrinrezeptor-Systems während der Nephrogenese zu untersuchen. Damit sollen Rückschlüsse auf die Bedeutung von Komponenten des RAS und des OPN-CD44-Integrinrezeptor-Systems für die Entwicklung von Nephronen gezogen werden.

Dazu wurde eine vergleichende Untersuchung dieser Komponenten an fetalem und postpartalem Nierengewebe im Munich-Wistar-Frömter-Rattenstamm mit angeboren verminderter Anzahl von Nephronen, postpartalem, spontanem, salzsensitivem Hypertonus, Proteinurie und chronisch progredientem Nierenversagen sowie im normotonen Wistar-Rattenstamm durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Homogenisator Ultra Turrax T25, Jahnke und Kunkel, Deutschland

Kühlzentrifuge Eppendorf 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Photometer, Shimadzu, Duisburg, Deutschland

Gelkammer (90 Volt) Biorad, München, Deutschland

Fotogerät und -drucker für Gele, SONY

ThermoCycler PTC-200 und PTC-100, MJ Research Peltier

Taqman-Apparat ABI-Prism 7000 STS, Applied Biosystems, Darmstadt

Pipette Reference 10-100 µl, 100-1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Mikrozentrifuge II, The Griffin Group, Inc. OHIO, USA

Bioanalyzers 2100 der Firma Agilent, Santa Clara, USA

Eppendorf Tischzentrifuge 5402, Hamburg, Deutschland

Blutdruckmessgerät, TSE Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland

Präzisionswaage, Satorius Laboratory, Göttingen, Deutschland

Glasgefäße mit Schraubverschluss 20ml, Packard, Econoglass, Göttingen, Deutschland

Messzylinder, Brand Duran, USA

Szintillationsgefäße aus Glas 20 ml, Packard, Göttingen, Deutschland

Stoffwechselkäfige für Ratten, Ehret, Emmendingen, Deutschland

3.1.2 Instrumente und Nahtmaterial

Anatomische Pinzette, Aesculap Standard BD 47/ BD 35, Melsungen, Deutschland

Chirurgische Pinzette, Aesculap Standard BD 557, Melsungen, Deutschland

Chirurgische Schere, Aesculap Standard-Modell BC 320, Melsungen, Deutschland

Feine Präparierschere, Aesculap BC 2, Melsungen, Deutschland

Feine Präparierschere, Aesculap Jameson-Werber BC 175, Melsungen, Deutschland

Micro-Pinzette Uhrmacher Modell, Aesculap BD 329, Melsungen, Deutschland

Wundspreizer, Aesculap Mellinger OA 241, Melsungen, Deutschland

Haken, Werkstatt Lorenz

Kanülen Gr.1, Gr. 12, Gr. 26; Braun, Sterican, Melsungen, Deutschland

Sterile Einwegspritzen 2ml, 5ml, 10ml; Sterican, Braun, Melsungen, Deutschland

Sterile Einwegspritzen 1ml; Plastipak, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

3.1.3 Futtermittel

Standardhaltungsfutter für Ratten, Altromin, Lage, Deutschland

3.1.4 Medikamente und Arzneimittel

Desinfektionsmittel für Instrumente, Braun, Melsungen, Deutschland

S - Ketaminhydrochlorid 43mg / kg KG, Ketanest, S 25mg/ml, Parke-Davis, Berlin, Deutschland

Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %, Braun, Melsungen, Deutschland

3.1.5 Verbrauchsmaterial

Eppendorf-Gefäße Safe Lock, 1,5 ml, 0,5 ml Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Eppendorfpipetten Standardtips 1000µl, 500µl, 50µl, 20µl, 10µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Falcon GefäÙe gross, mittel, klein, Sarstedt, Deutschland

96-Well-Platten für Taqman-apparat, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

ReaktionsgefäÙe Safe-Lock 1,5 ml, 2 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Standardtips 20 µl, 100 µl, 1000 µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Sterile Mullkompressen 5x5 mm, GAZIN, Lohmann Rauscher Inter. GmbH & Co.KG, Neuwied, Deutschland

Untersuchungshandschuhe M, Kimberly-Clark, Safeskin PFE

Verpackungsfolie, Saran, The Dow Chemical Company, Edegem, Belgien

Wattestäbchen 15 cm, Lohmann Rauscher Inter. GmbH & Co.KG

3.1.6 Reagenzien

Flüssiger Stickstoff

Trizol™Reagenz, Gibco Life Technologies, Mannheim, Deutschland

Chloroform

Ethanol 75%, Braun, Melsungen, Deutschland

DEPC (Diethylpyorpcarbonat)-Lösung 0.01%(RNase-frei)

2 - Propanol 70%, Braun, Melsungen, Deutschland

Agarosegel 2% Biozym, Oldendorf, Deutschland

TAE-Puffer (Trisacetat + EDTA)

Ethidiumbromid, Sigma, Steinheim, Deutschland

Ficoll, Firma Fluka, Taufkirchen, Deutschland

Master Mix für Taqman, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Aqua dest.

3.1.7 Kits

First Strand cDNA Synthesis Kit, MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland

QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

Quantikine Mouse Osteopontin, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

3.1.8 Oligonukleotide

Tabelle 4: Primer für die quantitative *real time* PCR und Taqmansonden

<i>Gen</i>	<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
18S rRNA	18S-F	GGAGCCTGCGGCTTAATTT
	18S-R	CAACTAAGAACGGCCATGCA
	18S probe	CAATCTGTCAATCCTGTCCGTGTCCG
AGT	AGT-F	CTACGTTCACTTCCAAGGGAAGA
	AGT-R	CACAGACACTGAGGTGCTGTTG
	AGT probe	CCAGAACTCATGGAGCCCAGTCAGCT
ACE2 (SYBR Green)	ACE2-F	GAGGAGAATGCCCAAAGATGA
	ACE2-R	GAAATTTTGGGCGATCTTGGA
AT-1A	AT-1A-F	CCACATTCCCTGAGTTAACATATGA
	AT-1A-R	GAGTTGGTCTCAGACACTATTCGAAA
	AT-1A probe	ATCACCAGGTAAAGGTC

<i>Gen</i>	<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
AT-1B	AT-1B-F	TGCCACCAGGCTTGAAAGA
	AT-1B-R	ACGTGAATTGCTCTCTGACACTATTT
	AT-1B probe	AAATGCACCGTGTGCAGTCGCCA
AT-2	AT-2-F	CCTTCCTGTATTGTTTCGTTGGA
	AT-2-R	TGGAGCCAAGTAATGGGAACTC
	AT-2 probe	CCGCTTCCAACAGAAGCTCCGTAGTG
OPN (SYBR Green)	OPN-F	CGAGGTGATAGTGTGGTTTATGGA
	OPN-R	CGTCTGTAGCATCAGGGTACTG
CD44	CD44-F	GGGTGGTTTCGACACTGTGACT
	CD44-R	TGTGGTCACTCCACTGTCTTGAT
	CD44 probe	AATTAGCTGGACACTCAAGT
ITGA5	ITGA5-F	CCTGTATCCTGCATCAACCTTAGC
	ITGA5-R	CCTATAGAGTTGGGTACATGTTTTCCA
	ITGA5 probe	TCTGCCTCAACGCC

Oligonukleotide, bezogen durch Proligo LLC, USA und Taqmansonden, bezogen durch TIB-Molbiol, Berlin, Deutschland.

Forward (F) und reverse (R) Primer für die Polymerasekettenreaktion Amplifikation und fluorogene Proben für die Analyse von 18S rRNA (18S), Angiotensinogen (Agt), Angiotensin-Konversionsenzym 2 (ACE2), Angiotensin II-Rezeptor Typ 1a (AT1a), Angiotensin II-Rezeptor Typ 1b (AT1b), Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 (AT2), Osteopontin (OPN), CD44-Rezeptor (CD44), Integrinkette alpha(v) (ITGA5). Alle Proben sind mit 6FAM an ihren 5'- and TAMRA an ihren 3'- Enden ligiert.

3.1.9 Tierstämme

Für das Projekt wurden sowohl Munich-Wistar-Frömter (MWF)-Versuchstiere aus der MWF/FUB Züchtung der Charité-Campus Benjamin Franklin, Berlin, Deutschland, als auch Wistar-Ratten, ursprünglich aus der Harlan und Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland, verwendet. Die Tierversuche wurden entsprechend den institutionellen Richtlinien durchgeführt. Zu der Auswahl dieser Rattenstämme leiteten die für diese Arbeit notwendigen Bedingungen. Das MWF-Rattenmodell zeigte sich aufgrund seiner genetisch bedingten Oligonephronie als geeignet, Ursachen der genetischen Oligonephronie molekularbiologisch zu erforschen. Das genetisch gesunde Wistar-Rattenmodell eignete sich für die Vergleichsuntersuchungen. Beide Stämme sollten morphologisch und funktionell ausreichend charakterisiert sein.

Die genauen Eigenschaften der ausgewählten Tiermodelle stellen sich wie folgt dar:

Die Munich-Wistar-Frömter-Ratte, kurz MWF-Ratte, ein Rattenmodell mit ausgeprägter kongenitaler Oligonephronie, deren Nephronenanzahl nach unveröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe um 51% verringert ist (Tabelle 2). Es vereint in sich die klinisch bedeutsamen Risikofaktoren der Progression der chronischen Niereninsuffizienz: die Entwicklung eines spontanen arteriellen Hypertonus und einer Proteinurie (Tabellen 2 und 3). Das Tiermodell eignet sich daher hervorragend zur Identifizierung von genetischen Faktoren, die an der Entwicklung einer kongenitalen Oligonephronie beteiligt sind. Der Stamm wurde 1996 am UKBF, FU Berlin, durch Inzucht etabliert. Die Tiere stammten aus der ursprünglichen Kolonie des MWF/Ztm- Stammes des zentralen Tierlaboratoriums der Medizinischen Hochschule Hannover.

Die Wistar-Ratte ist ein gesundes Rattenmodell, das sich im Alter von 12-14 Wochen bei gesunder Niere normoton und ohne Proteinurie darstellt und regelmäßig als Referenzstamm bei Untersuchungen an MWF-Tieren genutzt wird. Die Wistar-Ratten liegen genetisch sehr nahe am Ursprungsstamm der MWF-Ratte, wodurch genetische Unterschiede-von der Nephronenanzahl abgesehen–minimiert werden ⁸⁴.

Die Wistar-Ratten wurden von Charles River, Sulzfeld, Deutschland, bezogen.

Für unsere Untersuchungen wurden insgesamt 16 MWF-Ratten und 16 Wistar-Ratten verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden über einen Zeitraum von einem Jahr durchgeführt. Die Eingriffe erfolgten unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes und standen im Einklang mit den Richtlinien für Tierversuche des Instituts für Klinische Pharmakologie, Campus Benjamin Franklin, Charité. Unter der Genehmigungsnummer T 0273-01 wurden die beschriebenen Versuche durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt. Die Eingriffe erfolgten sämtlich nach dem in den Richtlinien festgelegten methodischen Vorgehen.

3.2.1.1 Haltung der Tiere

Die Haltung der Ratten erfolgte in den Räumen der Forschungsanstalt für Experimentelle Medizin (FEM) der Freien Universität Berlin. Bei freiem Zugang zu Wasser und Standard-Rattenfutter (20% Proteinanteil) lebten maximal sechs Ratten in einem Makrolon-Gemeinschaftskäfig (Typ 4). Die Temperatur in den Haltungs- und Versuchsräumen des FEM betrug durchgehend 20 °C, die Luftfeuchtigkeit lag bei 50%. Ein natürlicher, zwölfständiger Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch eine automatisierte Beleuchtung gewährleistet.

3.2.1.2 Organentnahme

Für die Organentnahme der embryonalen Nieren am Embryonaltag 19 wurden die schwangeren Ratten mit Ketanest intraabdominell narkotisiert und in Rückenlage gelagert. Nach jeweils medianer Eröffnung der Abdominalhöhle wurde der Uterus entnommen und die Muttertiere wurden durch Entfernung des Herzens getötet. Es folgte die Präparation der jeweils vorhandenen Embryonen zur Entnahme der Nieren. Der Zugang zur Freilegung der retroperitonealen Nieren erfolgte mittels medianer Laparotomie. Die Embryonen wurden durch Dekapitation getötet.

Die Organentnahme bei den Jungtieren an D7 erfolgte ebenfalls nach intraabdomineller Narkotisierung mittels Ketanest und anschließender Tötung durch Entfernung des Herzens. Nach medianer Laparotomie wurden die Nieren retroperitoneal freipräpariert.

Vor den jeweiligen Organentnahmen wurden die Körper- und Plazentagewichte ermittelt. Die freipräparierten Nieren der Embryos und Jungtiere wurden nach dem Wiegen in jeweils einem 2 ml-Eppendorfgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Aufarbeitung in den Räumen der Klinischen Pharmakologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, gelagert. Die Rattenkadaver wurden separat gesammelt und durch die Tierkörperbeseitigung des Hauses entsorgt.

3.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

3.2.2.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus dem bei -80°C tiefgefrorenen Nierengewebe erfolgte über die Trizol-Methode. Dazu wurden 100 mg Gewebe in 1 ml eisgekühltem Trizol ca. 2x 30 sec mit dem Sono-Stab Polytron auf Eis homogenisiert und bei 5.000 Upm für 10 min bei 4°C zur Entfernung grober Partikel zentrifugiert. (Alle Zentrifugationsschritte erfolgten mit der Eppendorf Tischzentrifuge 5402, Hamburg, Deutschland). Der abpipettierte Überstand wurde zur kompletten Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe für ca. 1h bei Raumtemperatur gelagert und zur Phasenseparation mit 200 µl Chloroform/1 ml Trizol vermischt, für 2-3 min bei RT inkubiert und bei 12.000 Upm für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die RNA, die sich in der oberen durchsichtigen Phase befand, wurde mit 500 µl Isopropanol/1 ml Trizol präzipitiert und für 10 min bei RT gelagert. Anschließend wurde die RNA bei 12.000 Upm für 10 min bei 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml 75%igem, -20°C kaltem Ethanol/1 ml Trizol gewaschen und bei 4.900 Upm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet 5 min luftgetrocknet und in 50 µl EPCH 20 bei 60° C in 5 min gelöst. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte über eine 1:200-Verdünnung mit DEPC-H₂O im Photometer bei 260-280 nm. Zur Überprüfung der Integrität der DNA wurden 1 µl (ca. 500 ng) der RNA und 0,5 µl Laufpuffer in einem Gesamtvolumen von 6 ml auf ein 1%iges Agarose/Ethidiumbromid-Gel, bestehend aus 30 ml 1x TAE und 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml), aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von ca. 5 V/cm Elektrodenabstand und einer Stromstärke von ca. 200 mA über ungefähr 35 min. Die extrahierte RNA wurde anschliessend bei -80° C gelagert.

3.2.2.2 RNA–Qualitätskontrolle

Mithilfe des *Bioanalyzer*s 2100 der Firma Agilent, Santa Clara, USA, wurde eine Kapillarelektrophorese auf einem RNA–Chip für eine Quantitäts– und Qualitätsprüfung der extrahierten RNA durchgeführt. Ein RNA–Chip besteht aus einer Platte mit 12 Reservoiren, verbunden durch ein Netzwerk vieler Kapillaren. Durch das Füllen der Kapillaren mit einem Trägergel und der Reservoirs mit entweder der Puffer– oder der Probelösung ist ein Elektrophoreseverfahren auf feinstem Niveau möglich.

3.2.2.3 Gelelektrophorese und optische Konzentrationmessung (Photometrie)

Zur Validierung der Qualität der Proben und der Ermittlung des RNA-Gehalts und der Reinheit wurden diese in einer Gelelektrophorese bei 90 Volt aufgetragen und fotografiert. RNA lässt sich deutlich an zwei spezifischen Banden der 28S- und der 18S-Einheit erkennen und von Verunreinigungen unterscheiden.

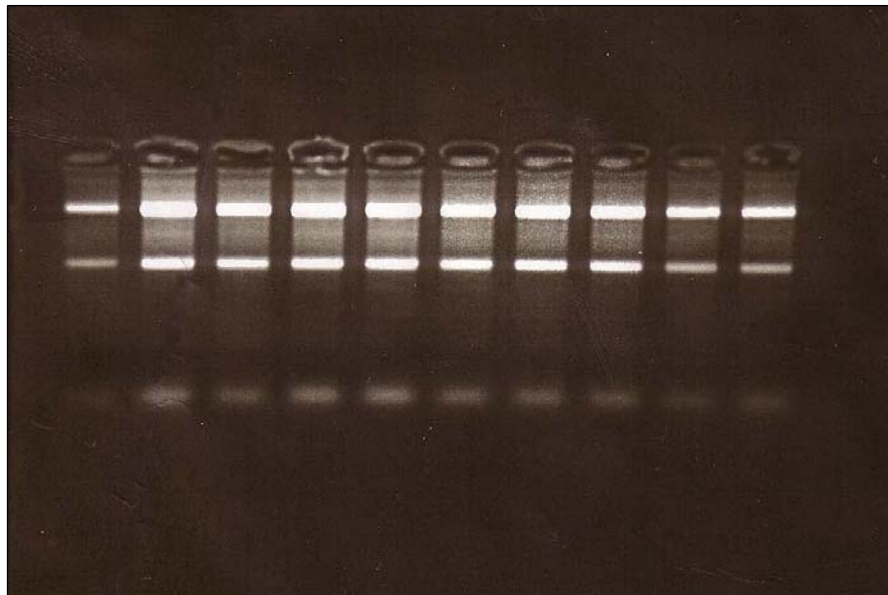


Abbildung 3: Nachweis der extrahierten RNA mittels Gelelektrophorese.

Sichtbar sind die mRNA-spezifischen Banden der 28S und der 18S-Untereinheiten.

Waren die Banden in allen Proben gut zu identifizieren, so wurde anschließend die genaue RNA-Konzentration mittels Photometrie gemessen. Dazu wurden 4µl der RNA mit 96µl DEPC versetzt und nach vorheriger Leerkontrolle wurde die Dichte der Probe

bei 260 (A1) und bei 280 (A2) nm Wellenlänge im Photometer gemessen. Zur optimalen Qualität der Probe sollte der Quotient A1/A2 zwischen 1,5 und 2 liegen, da sonst von einer Proteinverunreinigung oder einer Degradation der RNA ausgegangen werden musste. Die Konzentration wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet.

$$RNA(\mu g / \mu l) = \frac{OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000}$$

Die errechnete Konzentration stellte die Grundlage für weitere quantitative Analysen mittels Taqman-PCR dar.

3.2.2.4 Reverse Transkription

Die mRNA ist ein sehr empfindliches polymeres Molekül, das durch Temperaturschwankungen und Ribonukleasen ständig von Zerstörung bedroht ist. Für die weitere molekularbiologische Analyse musste die extrahierte RNA in stabilere cDNA umgeschrieben werden. Diese Reaktion wurde mittels des *First Strand cDNA Synthesis* Kit, MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland, in zwei Schritten durchgeführt:

1. *Annealing* der *random hexamer primer*

In einem ersten Schritt wurde ein sogenannter *random hexamer primer* gebildet: Dieser entsteht aus einem Nukleotidmix, der sich an der zu vervielfältigenden Stelle zu einem passenden Primer zusammenfindet, um die gewünschte Sequenz umschreiben zu können. Hierzu wurden zu jeweils 2µg RNA (die Berechnung des entsprechenden Volumens erfolgte anhand der photometrisch gemessenen RNA-Konzentrationen) 1µl des *Random Hexamer Primers* gegeben. Diese Mischung wurde auf 11µl Gesamtvolumen mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Mit diesem Ansatz konnte die PCR erfolgen (für 5 Min bei 70°, dann für weitere 5 Min bei 4°C).

2. Reverse Transkription

Dem aus der ersten PCR entstandenen Ansatz wurden jeweils 4µl Puffer, 1µl RNase-Inhibitor, 2µl dNTP-Mix sowie 2µl reverse Transkriptase-Enzym hinzugefügt, so dass die weitere PCR erfolgen konnte (10 Min bei 25°, 60 Min bei 37°, 10 Min bei 70° und 10 Min bei 4°C). Das Produkt dieser Reaktion diente als Basis für die folgenden Untersuchungen mittels Taqman-PCR.

3.2.2.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine schnelle und sensitive Methode der DNA-Analytik. Sie ist eine primerdefinierte, enzymatische Replikation, mit deren Hilfe man eine annähernd exponentielle Amplifikation einer bestimmten Zielsequenz erreicht. Zur weiteren Quantifizierung der mRNA waren bisher Methoden wie *Northern Blot* oder *dot blot* notwendig, die viel Zeit sowie große Mengen an RNA erforderten. Mittels der Polymerasekettenreaktion lassen sich definierte Abschnitte der DNA vervielfältigen. Die Probenansätze durchlaufen dabei die Phasen Denaturierung, *annealing* und Elongation. Durch Temperaturerhöhung auf 95°C werden in der Denaturierungsphase die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren aufgebrochen, so dass sich in der anschließenden Annealingphase (bei 55°C, Schmelztemperatur der Primer (T_m)) die sequenzspezifischen Oligonukleotide (*forward and reverse primer*) anlagern können. Anschließend wird in der Elongationsphase die von den Primern markierte Sequenz amplifiziert.

3.2.2.5.1 Quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion

Die quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (PCR), (RATPCR), ist eine Methode, die es ermöglicht, während der PCR die Bildung des Produktes direkt zu verfolgen. Der Verlauf der Akkumulation des PCR Produktes über die Zeit lässt Rückschlüsse auf die Menge der enthaltenen *templates* zu. Die quantitative *real-time* PCR beruht auf der kontinuierlichen Messung eines Fluoreszenzsignals, welches proportional zu der Quantität der amplifizierten DNA zunimmt. Eine quantitative Aussage der während der PCR gebildeten DNA wird somit möglich. In der vorgelegten Arbeit wurden zwei verschiedene Techniken der RATPCR (Taqman/ SYBR Green) verwendet, welche im Folgenden genauer beschrieben werden.

3.2.2.5.1.1 Die Taqman-Polymerasekettenreaktion

Eine Form der *real-time* Polymerasekettenreaktion (PCR) stellt die Taq-Man PCR dar, welche mithilfe eines Taq-Man Systems, bestehend aus einer TaqMan-Sonde und einem diese Sonde umgebenden TaqMan *forward*- und *reverse-primer*-Paar, arbeitet.

Die TaqMan-RT-PCR ist eine entwickelte Technik, die ein akkumulierendes PCR-Produkt in „Echtzeit“ über den Gebrauch einer zweifach TaqMan fluorogen gelabelten

cDNA Sequenz (*reporter* und *quencher fluorophore*) misst. Der fluorogene 5'-Nuklease Assay macht sich die endogene 5'-3'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase zunutze, um die TaqMan Sequenz zu spalten, die während der PCR an der Ziel cDNA-Sequenz hybridisiert. Ist die TaqMan-Sequenz intakt, so wird die *reporter fluorophore* Emission von der *quencher fluorophore* supprimiert.

Während der PCR lagert sich die TaqMan-Sequenz am Ziel-cDNA-Strang an und die 5'-3'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase spaltet die *reporter fluorophore* von der *quencher fluorophore* ab, was zu einem Anstieg der *reporter* Fluoreszenz führt. Die verbleibende TaqMan-Sequenz dissoziiert von der Ziel-Sequenz, so dass sich die PCR ungehindert fortsetzen kann. Die Intensität der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge der eingesetzten Ziel-cDNA.

Das Fluoreszenz-Signal wird durch ein ABI Prism 7000 *sequence detection* System, PE Applied Biosystems, Foster City, USA, das eine schnelle Analyse von vielen Transkripten aus einem Gewebepool im 96-*well* Format erlaubt, gemessen.

Die Sonde sollte dabei Exon-Exon-Grenzen überschreiten, um die Hybridisierung genomischer DNA zu verhindern. Die TaqMan Sonde nutzt die 5'3'Exonukleaseaktivität der TaqPolymerase und den *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) aus.

FRET ist ein physikalischer Prozess, bei dem Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffes (Donor) auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor) übertragen wird, sollte sich dieser in ausreichender Nähe befinden und sich das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Empfängers überlagern. An beiden Enden ist die TaqMan-Sonde selbst mit Donor- und Akzeptorfluorchrom versehen und muss der PCR zugegeben werden. Bei der TaqMan PCR spricht man anstelle von Donor und Akzeptor auch von *reporter* und *quencher*, da nur Licht der Wellenlänge eines der beiden Fluorchrome, nämlich des Donors (*reporters*), gemessen wird. Die Sonde hybridisiert an die Zielsequenz und wird während der Elongationsphase von der TaqPolymerase abgebaut. Dabei trennen sich durch Diffusion die abgespaltenen Basen voneinander. Durch den dadurch sich vergrößernden Abstand zwischen *reporter* und *quencher* wird somit die ausgesendete Fluoreszenz des *reporters* durch den *quencher* nicht mehr unterdrückt. Für jeden denaturierten Doppelstrang wird folglich im folgenden Zyklus ein weiteres

Fluoreszenzsignal freigesetzt, so dass das Fluoreszenzsignal proportional zu der amplifizierten Menge an DNA wächst.

Die Taqman-PCR ist eine Variante der PCR-Methode, bei der die Amplifikation der Zielsequenz und seine Quantifizierung simultan in einem Reaktionsgefäß ermöglicht werden. Dies gelingt auch, wenn nur geringe Mengen RNA in der Probe vorhanden sind. Die Reduzierung der Arbeitsschritte und der im Vergleich geringe Zeitaufwand tragen dabei zur Minimierung der verschiedenen Fehlerquellen bei.

Es wird bei der Taqman-PCR zunächst eine für die zu amplifizierende Sequenz spezifische Sonde angefertigt. Dieses Oligonukleotid ist am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden *reporter*-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat=FAM) markiert, das 3'-Ende trägt einen *quencher*-Farbstoff (Rhodamin-Derivat=TAMRA). Die Wahl der Sonde erfolgt mit dem Programm Primer Express, Applied Biosystems, Foster City, USA, das speziell für das Design der Taqmansonden sowie Taqmanprimer geeignet ist. Die Sonde ist hochspezifisch für das zu amplifizierende Produkt.

Nach dem primären Anlagern der Sonde an den cDNA-Strang unterdrückt der *quencher* zunächst durch seine räumliche Nähe zum *reporter* dessen Fluoreszenzsignal. Während der PCR wird diese Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase Nukleotid für Nukleotid abgebaut. Dadurch wird der *reporter*-Farbstoff vom *quencher* getrennt und die Fluoreszenz nicht länger unterdrückt. Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes steigt die Fluoreszenz mit jedem weiteren Zyklus an. Das Signal kann nun im Zeitverlauf durch die Anregung zur Fluoreszenz bei 488 nm gemessen werden. Es ist dabei strikt sequenzspezifisch, da nicht komplett passende Sondenmoleküle vor Beginn der Reaktion verdrängt werden.

Funktionsweise der Taqman-PCR

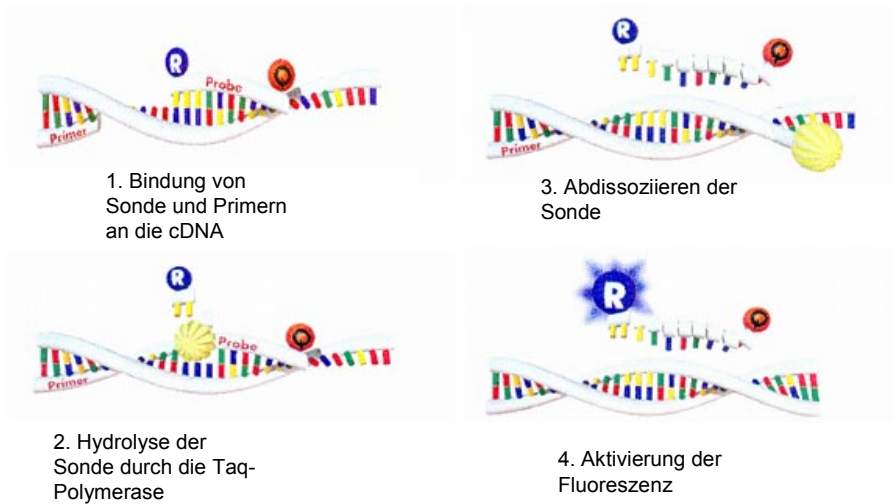


Abbildung 4: schematische Darstellung der Reaktionsabläufe bei der Methode der Taqman-PCR (modifiziert nach der Taqman-Arbeitsanleitung von Applied Biosystems).

Zur Auswertung des *TaqMan-assay* wird die relative Quantifizierung mit Standardkurven benutzt. Dabei wird das Expressionslevel des untersuchten Gens auf die Expression eines sog. *housekeeping*-Gens normiert. Ein *housekeeping*-Gen ist ein Gen, welches idealerweise ungeachtet experimenteller Bedingungen *in vitro* oder Krankheiten *in vivo* im untersuchten Gewebe konstant in der gleichen Menge exprimiert wird. Bekannte und häufig eingesetzte Vertreter dieser Klasse sind z.B. β -Actin, GAPDH, Cyclophilin, 18S-rRNA, PBGD (Porphobilinogen Deaminase) und andere. 18-S-rRNA wurde in der vorliegenden Arbeit als *housekeeping*-Gen benutzt. Eine Normierung auf diesen endogenen Standard hat den Vorteil, dass z.B. verschiedene reverse Transkriptions-Ansätze mit möglicherweise unterschiedlichen Effizienzen direkt miteinander verglichen werden und Pipettierfehler bei der Dosierung der RNA ausgeglichen werden können. Das Expressionslevel der zu bestimmenden mRNA-Sequenz und der Sequenz des *housekeeping*-Gens wird mit Hilfe von Standardkurven bestimmt. Dazu werden PCR-Fragmente benutzt, die die beim *TaqMan-assay*

amplifizierten Sequenzen enthalten. Es werden sieben serielle 1:10 Verdünnungen hergestellt, die auf jedem assay des jeweiligen Gens als Standards bekannter Konzentrationen mitbestimmt werden. Die Zuordnung der Konzentrationen der Standards kann zwar absolut durch die enthaltene Kopienanzahl (photometrisch bestimmt) erfolgen, im Falle der hier gewünschten Analyse, nämlich eines relativen Vergleiches verschiedener Behandlungsgruppen miteinander, können vereinfachend arbiträre Einheiten korrespondierend zum Verdünnungsgrad gewählt werden. Dem ersten Standard wird dementsprechend die Konzentration 1 zugeordnet, dem zweiten Standard die Konzentration 0,1 usw.

Trägt man die erhaltenen CDs der Standards über den Logarithmus ihrer Konzentrationen auf, so erhält man eine Kalibriergerade, welche die Konzentrations- bzw. Expressionsbestimmung (E) der unbekanntenen Proben ermöglicht.

Die erhaltenen Quotienten sind einheitenlos und haben keine reale Entsprechung. Die Werte eignen sich jedoch gut zum relativen Vergleich verschiedener Gruppen untereinander. Die Auswertung erfolgt, indem der Mittelwert der rE einer Kontrollgruppe als 100% definiert wird und die Mittelwerte der anderen Gruppen als Prozent der Kontrolle angegeben werden.

Die PCR-Reaktion ist in ihrer frühen exponentiellen Phase reproduzierbarer als an ihrem Endpunkt. Betrachtet man Amplifikationsplots von Wiederholungen derselben Probe, so erkennt man, dass die Kurven mit zunehmender Zyklenzahl im Bereich ihrer Sättigung immer mehr divergieren, während sie anfänglich praktisch perfekt übereinander liegen. Dies liegt an der exponentiellen Natur der PCR, durch die sich kleinere Schwankungen am Anfang der Reaktion im Laufe der Zeit zu immer größeren Effekten „aufschaukeln“ können. Je früher eine Auswertung der Amplifikationskurve erfolgt, desto präziser ist daher das Ergebnis.

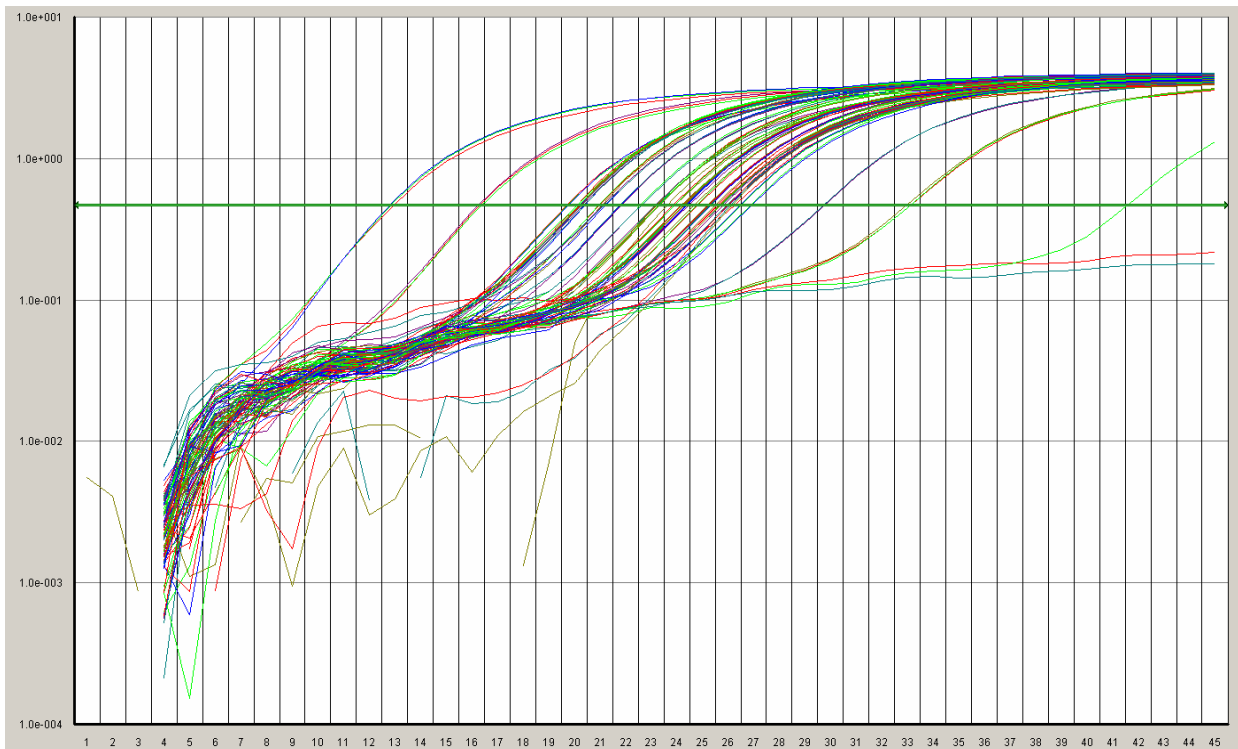


Abbildung 5: Typische Fluoreszenzkurven eines Taqman-PCR-Laufs mit 45 aufeinander folgenden Zyklen.

Die horizontale grüne Linie repräsentiert den Ct-Wert (cycle threshold, Zyklusschwellenwert). Deutlich sichtbar ist der Verlauf der sieben Standardverdünnungen sowie die Leerkontrolle (mit einem Ausreißer) ganz rechts.

Primer- und Sondendesign

Um aus der extrahierten RNA die gewünschten Abschnitte amplifizieren zu können, müssen zunächst die für die Sequenz spezifische Sonde und die dazu passenden Primerpaare für die jeweilige Sequenz entworfen werden. Die Sequenz wird dazu zunächst einem sogenannten *alignment* unterzogen, d.h., mit allen bekannten Sequenzen des Genoms verglichen. Erst wenn sich keine Überschneidungen zeigen, kann sicher mit der ausgesuchten Sequenz gearbeitet werden. Es werden für die Methode der Taqman-PCR die Sonde sowie jeweils zwei Primerpaare benötigt: ein internes, nah an der Sequenz liegendes Paar, und ein externes, weiter entfernt liegendes Paar. Da diese Primer für die Methode spezifische Voraussetzungen erfüllen müssen, wird ein Softwareprogramm, *Primer Express®*, *Tutorial for Real Time Quantitative PCR Primer and Probe Design*, *Applied Biosystems Real Time Quantitative PCR systems (7700, 5700)*, Foster City, USA, zum Design dieser Primer genutzt.

Das TaqMan-Sondendesign muß dabei nach folgenden Regeln erfolgen:

Der G-C-Gehalt sollte zwischen 30-80% betragen. Aneinanderreihungen identischer Nukleotide sollten vermieden werden. Dies gilt besonders für Guanin. Aneinanderreihungen von vier oder mehr Guaninen sollten vermieden werden. Weiterhin sollte kein Guanin am 5'-Ende erscheinen. Schließlich sollte der Strang mit mehr Cytosin als Guanin als Sonde ausgewählt werden.

Für Einzelsondenansätze bei Einsatz des *Primer Express*®-Programms sollte die Schmelztemperatur (T_m) mit 68°-70° gewählt werden.

Die Taq-Man-Primer werden wie folgt gewählt:

Die Primer werden nach der Sonde ausgewählt. Man wählt die Primer in größtmöglicher Nähe zu der Sonde, ohne diese zu überlappen. Der G-C-Gehalt sollte zwischen 30-80% liegen. Auch hier sollten Aneinanderreihungen identischer Nukleotide vermieden werden, wiederum besonders bei Guanin. Mehr als vier Guanine hintereinander sollten nicht auftreten. Beim Anwenden der *Primer Express*®-Software sollte die Temperatur 58°C-60°C betragen. Die fünf Nukleotide am 3'-Ende sollten nicht mehr als zwei Guanin- und/oder Cytosin-Basen enthalten.

3.2.2.5.1.2 SYBR Green

Der Farbstoff SYBR Green bildet durch Interkalation mit der doppelsträngigen DNA einen fluoreszierenden Komplex. Während einer PCR steigt das Fluoreszenzsignal folglich proportional zu der neu entstandenen doppelsträngigen DNA an. Im Vergleich zur TaqMan-PCR ist keine Sonde notwendig.

Die Spezifität dieses PCR-Produktes sollte jedoch durch Schmelzkurven ständig überprüft werden, da durch die Interkalation des Farbstoffes SYBR Green mit jeglicher doppelsträngiger DNA die Spezifität z.B. im Vergleich zu der TaqMan-PCR auf einem weitaus geringeren Niveau anzusiedeln ist. Hierbei wird durch Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität bei zunehmender Temperatur deren erste Ableitung durch die beigefügte Software angezeigt. Sollte die PCR erfolgreich ohne Amplifikation von Nebenprodukten oder Verunreinigungen abgelaufen sein, stellt sich das Ergebnis in einem einzigen *peak* dar.

3.2.2.5.2 Auswertung der PCR-Ergebnisse

3.2.2.5.2.1 Quantifizierungsstrategie

Mittels Standardkurven lässt sich eine relative Quantifizierung zur Auswertung des qRT-PCR-assay heranziehen.

Als Norm gilt die Expression eines *housekeeping*-Gens.

Dieses ist ein Gen welches konstant in der gleichen Menge im untersuchten Gewebe exprimiert wird- ungeachtet experimenteller Bedingungen *in vitro* oder abweichender Bedingungen *in vivo*.

Häufige Vertreter dieser Klasse sind z.B. Gene wie β -Actin, GAPDH, 18S-rRNA, PBGD, Cyclophilin und andere. Somit können verschiedene RT-Ansätze mit möglicherweise unterschiedlichen Effizienzen, einem unterschiedlichen Maß an Pipettierfehlern usw., direkt miteinander verglichen werden. Mithilfe von Standardkurven lassen sich die Expressionslevel sowohl des zu bestimmenden Gens als auch des *housekeeping*-Gens bestimmen.

Hierfür benutzt man PCR-Fragmente, welche die beim Taq-Man-assay amplifizierten Sequenzen enthalten.

Sieben serielle 1:10 Verdünnungen werden hergestellt, welche auf jedem assay des jeweiligen Gens als Standards bekannter Konzentrationen mitbestimmt werden. Die Zuordnung der Konzentrationen der Standards kann absolut durch die enthaltene Kopienanzahl, photometrisch bestimmt, erfolgen. Im Falle der hier gewünschten Analyse, eines relativen Vergleiches verschiedener Behandlungsgruppen miteinander, können jedoch vereinfachend arbiträre Einheiten korrespondierend zum Verdünnungsgrad gewählt werden.

Standard 1 ordnet man die Konzentration 1 zu, Standard 2 0,1 usw.

Die PCR-Reaktion ist in ihrer frühen exponentiellen Phase reproduzierbarer als an ihrem Endpunkt. Anfänglich liegen die Kurven der Amplifikationsplots von Wiederholungen derselben Probe praktisch perfekt übereinander.

Im Verlauf mit zunehmender Zyklenzahl divergieren die Kurven im Bereich ihrer Sättigung immer mehr. Die Ursache liegt in der exponentiellen Natur der PCR, durch die sich kleinere Schwankungen am Anfang der Reaktion im Laufe der Zeit zu immer größeren Effekten summieren können. Je früher die Auswertung einer Amplifikationskurve demnach erfolgt, desto präziser ist das Ergebnis.

Trägt man die erhaltenen Ct-Werte der Standards über den Logarithmus ihrer Konzentration auf, so erhält man eine Kalibriergerade, welche die Konzentrations- bzw. Expressionsbestimmung E der unbekannt Probe ermöglicht.

Mittels:

$$rE(Gen) = \frac{E(Gen)}{E(housekeeper)}$$

berechnet man die relative Expression (rE) des untersuchten Gens.

Die Quotienten sind einheitslos und haben keine reale Entsprechung, doch eignen sie sich zum relativen Vergleich verschiedener Gruppen untereinander. Der Mittelwert der relativen Extinktionen einer Kontrollgruppe wird als 100% definiert und alle Mittelwerte der anderen Gruppen in % der Kontrolle angegeben.

3.2.2.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Die Proteinexpression des Osteopontins wurde quantitativ mit einem ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) bestimmt. Zu diesem Zweck wurde der Testkit „*Quantikine Mouse Osteopontin Immunoassay*“ der Firma R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland, eingesetzt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Vorschriften des Herstellers.

Die Bestimmung wurde dementsprechend in einer mit einem polyklonalen, für Maus-Osteopontin spezifischen Antikörper mit nachgewiesener Kreuzreaktivität für Ratten-Osteopontin vorbeschichteten Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Als Probenansatz dienten jeweils 100 mg tiefgefrorenes Nierengewebe. Mittels Ultra Turrax wurde das Gewebe aufgeschlossen. Nach dem Abzentrifugieren der festen Geweberückstände wurde der Überstand abpipettiert.

Jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurde anschließend mit 50µl des Testverdünnungspuffers beschickt. Danach wurden jeweils 50 µl entweder der OPN Standardlösung, der OPN Kontrolllösung oder des zu bestimmenden Probenansatzes pro Vertiefung hinzugefügt. Vor dem Vermischen der Probenansätze wurde die Platte mit einer Klebefolie abgedeckt und dann für eine Minute vorsichtig bewegt. Daran schloss sich eine Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur an. In diesem Schritt bindet das in den Proben, Standards und Kontrollen enthaltene Osteopontin konzentrationsabhängig an die in der Mikrotiterplatte immobilisierten Antikörper.

Zur Entfernung des nicht gebundenen Osteopontins wurden am Ende die Überstände der Vertiefungen abgesaugt und jede Vertiefung wurde insgesamt in fünf Durchgängen mit 400µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurden alle Rückstände des Waschpuffers sorgfältig abgesaugt.

Zur Vorbereitung der enzymatischen Bestimmung des in der Platte gebundenen Osteopontins wurden im nächsten Schritt je 100µl des zweiten enzymgekoppelten, polyklonalen, maus-osteopontinspezifischen Antikörpers – ebenfalls mit nachgewiesener Kreuzreaktivität für Ratten-Osteopontin – in jede Vertiefung der Platte zugegeben. Nach dem Abdecken der Mikrotiterplatte wurde sie weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Um nichtgebundenes Antikörperenzymkonjugat aus dem Ansatz zu entfernen, wurde anschließend die Waschprozedur in fünf Schritten, wie oben beschrieben, wiederholt.

Zum Schluss zur quantitativen enzymatischen Bestimmung des gebundenen Enzyms durch die Umsetzung des Substrats in einen blauen Farbstoff wurden je 100 µl Enzymsubstratlösung in jede Vertiefung pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Danach wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 µl „Stop“-Lösung pro Vertiefung und vorsichtigem Klopfen der Mikrotiterplatte beendet. Dabei schlägt die blaue Färbung der Lösung in Gelb um.

Die optische Dichte der Überstände wurde dann bei 450 nm Wellenlänge (Kontrollmessung bei 540 nm Wellenlänge) photometrisch bestimmt. Die gemessene Farbintensität ist direkt proportional der im dritten Schritt gebundenen Menge an enzymgekoppeltem Antikörper und damit der im zweiten Schritt gebundenen Menge an Osteopontin. Die Messung erfolgte mit dem Mikrotiterplattenphotometer „*Dynex MRX Elisa plate reader*“. Dabei wurde aus einer Stammlösung (2500 pg/ml) mittels sechs serieller 1:2 Verdünnungsschritte die Kalibrierkurve ermittelt, anhand welcher aus den gemessenen Extinktionsdaten die Konzentrationen abgelesen werden konnten.

Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde mit der Bradford-Methode bestimmt und diente zur Normierung der ELISA-Ergebnisse ¹³.

3.2.2.7 Statistische Analyse

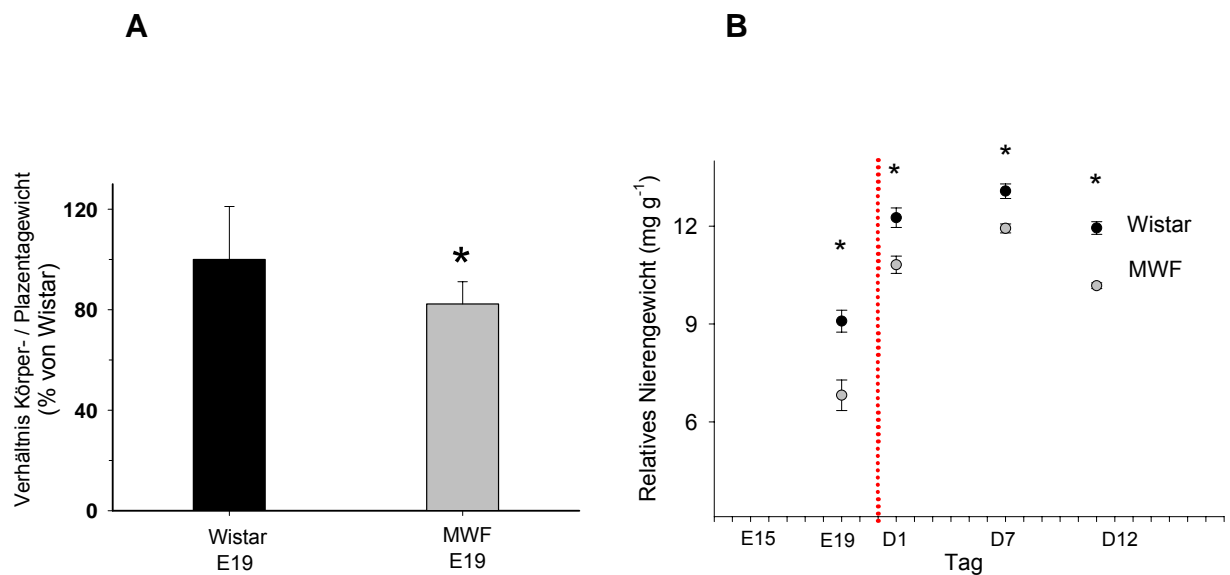
Die Auswertung der experimentell erhobenen Daten erfolgte mit SPSS 11.0 für Windows, der Firma SPSS, München, Deutschland. Alle Werte werden als Mittelwert (m) plus minus Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die statistische Analyse erfolgte durch den nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test. Unterschiede wurden bei einem $p < 0,05$ als signifikant angenommen. Für die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Sigmaplot 8.0 für Windows, der Firma Systat Software, Erkrath, Deutschland, verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Plazenta-, Nieren- und Körpergewichte

Das Verhältnis des Körpergewichts zum Plazentagewicht war an E19 bei den MWF-Tieren im Vergleich zu den Wistar-Tieren um 18 Prozent niedriger ($p < 0.05$). (Abb. 6A)

Die Messung der perinatalen Nierengewichte der MWF-Tiere zeigt zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant erniedrigte Werte ($p < 0,05$) im Vergleich zu den perinatalen Nierengewichten der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe. (Abbildung 6B)



Abbildungen 6A und 6B: Verhältnis von Körper-/ Plazentagewicht (6A) und relatives Nierengewicht (6B)

Abb. 6 A: Verhältnis von Körpergewicht und Plazentagewicht an Embryonaltag E19 (E19) und den Postnataltagen D1, D7 und D12 in Prozent des Gewichtsverhältnisses bei Wistar, n = 18-20, * $p < 0.05$ vs. Wistar.

Abb. 6 B: Perinatale Nierengewichte bezogen auf das Körpergewicht an Embryonaltag E19 (E19) und an den Postnataltagen 1, 7, und 12 (D1, D7, and D12). Die gepunktete Linie zeigt Embryonaltag E21 an, den Geburtstag, n = 18-54, * $p < 0.05$ vs. Wistar.

Die Körpergewichte der MWF-Tiere waren im Vergleich zu den Wistar-Kontrolltieren an den Embryonaltagen E15, E 17, E19 und an den postnatalen Tagen D1, D7, D12 und D100 reduziert ($P < 0.05$) (Tabelle 5).

Tabelle 5: Körpergewichte

	KG (g) Wistar	KG (g) MWF
E15	0.312 ± 0.004	0.236 ± 0.004 *
E17	0.868 ± 0.013	0.619 ± 0.014 *
E19	2.26 ± 0.03	2.03 ± 0.05 *
D1	6.58 ± 0.16	6.12 ± 0.80 *
D7	14.3 ± 0.2	13.4 ± 0.2 *
D12	22.8 ± 0.4	21.6 ± 0.6 *
D100	376 ± 8	334 ± 6 *

E (Embryonaltag) 15, E17, E19; D (Postnataltag) 1, D7, D12, D100; KG (Körpergewichte) in Gramm (g); * $p < 0.05$ vs. Wistar - Stamm, n = 15-30.

4.2 Nierengewichte, Urinvolumen, Kreatininclearance und Albuminurie

Die relativen Nierengewichte waren an E19, D1, D7 und D12 bei den MWF-Tieren, verglichen mit den Wistar-Tieren, geringer ($P < 0.05$). (Abbildung 6B)

Im Gegensatz dazu war das relative Nierengewicht bei den adulten MWF-Tieren an D100, verglichen mit den Wistar-Kontrolltieren, erhöht ($P < 0.05$) (Tabelle 6).

Der systolische Blutdruck und das Verhältnis des normalisierten linksventrikulären Gewichts des linken Ventrikels zum Körpergewicht war bei den MWF-Tieren im Vergleich zu den Wistar-Tieren an D 100 erhöht ($P < 0.05$) (Tabelle 6).

Das Urinvolumen und die Kreatininclearance waren bei den MWF-Tieren im Vergleich zu den Wistar-Kontrolltieren an D100 nicht verändert, jedoch zeigte sich an D100 bei den MWF-Tieren im Vergleich eine starke Zunahme der Urinalbuminexkretion ($P < 0.05$) (Tabelle 6).

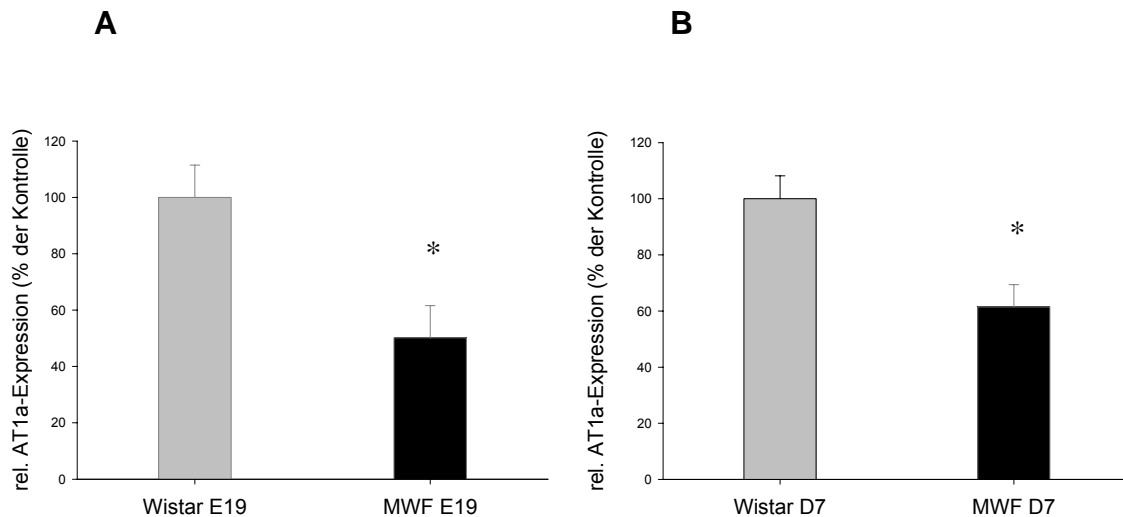
Tabelle 6

	Wistar D100	MWF D100
SBD (mmHg)	138 ± 8	159 ± 6 *
LV/KG (mg g⁻¹)	1.67 ± 0.04	1.91 ± 0.02 *
NG/KG (mg g⁻¹)	5.7 ± 0.2	6.2 ± 0.1 *
UV (ml 24h⁻¹)	12.8 ± 1.0	11.3 ± 1.1
Cl_{Krea} (ml min⁻¹)	2.76 ± 0.17	2.36 ± 0.14
UAE (mg 24h⁻¹)	0.2 ± 0.02	58.1 ± 5.8 *
GF (10⁻³ mm²)	6.1 ± 0.2	8.2 ± 0.2 *

Systolischer Blutdruck (SBD), Gewicht des linken Ventrikels bezogen auf das Körpergewicht (LV/KG), Nierengewicht bezogen auf das Körpergewicht (NG/KG), Urinvolumen (UV), Kreatininclearance (Cl_{Krea}), Urinalbuminexkretion (UAE) und Glomeruläre Fläche (GF) an Postnataltag 100 (D100) n = 8-16, * p<0.05 gegenüber Wistar.

4.3 Expressionsanalyse des Renin–Angiotensin–Systems

4.3.1: Renale AT1a-mRNA–Expression



Abbildungen 7A und 7B: Renale AT1a-mRNA–Expression an E19 (7A) und D7 (7B)

Abb. 7A: Dargestellt ist die renale, relative AT1a-mRNA–Expression der MWF (Munich-Wistar-Frömter-) Ratten im Vergleich zu der der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an E19 (Embryonaltag 19). Dabei ist $*P < 0,05$.

Abb. 7B: Dargestellt ist die renale, relative AT1a-mRNA–Expression der MWF-Ratten im Vergleich zu der der Wistar-Ratten Kontrollgruppe an D7 (Postnataltag 7). Dabei ist $*P < 0,05$.

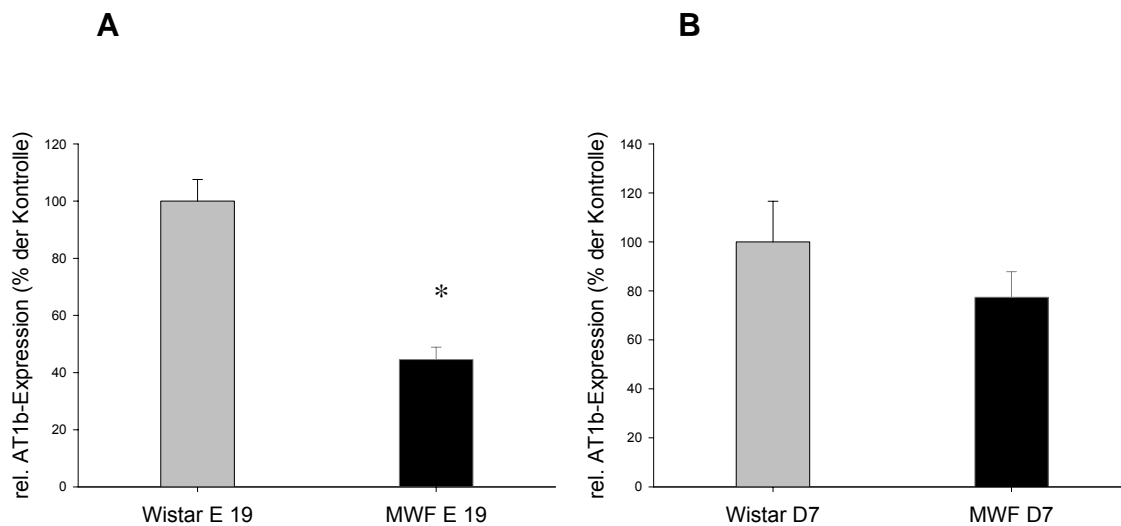
Der Mittelwert der relativen Expression der AT1a-mRNA der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an E19 (Abb. 7A) und an D7 (Abb. 7B) wird mit jeweils 100% angegeben.

Die renale, relative Expression der AT1a-mRNA ist bei den MWF–Tieren im Vergleich zu der bei den Wistar–Tieren an E19 um 50% erniedrigt ($P < 0,05$), (Abb. 7A). An D7 ist die relative renale Expression der AT1a-mRNA bei den MWF–Tieren im Vergleich zu der bei den Wistar–Tieren um 42% erniedrigt ($P < 0,05$), (Abb. 7B). An den beiden untersuchten Tagen E19 und D7 besteht eine etwa gleich starke Verminderung der mRNA-Expression bei den MWF-Tieren (Abb. 7a, 7B) von 50 % (E19) bzw. 42% (D7) gegenüber der der Kontrollgruppe. Das am Tag E19 bei den MWF-Tieren etwa um die Hälfte gegenüber den Wistar-Tieren erniedrigte Niveau der AT1a-mRNA-Expression bleibt somit an D7 erhalten.

Da bei der Durchführung der jeweiligen Messungen aufgrund stark unterschiedlicher Fluoreszenzniveaus kein gemeinsamer Schwellenwert definiert werden konnte, ist ein

quantitativer Vergleich der AT1a-Expression an den Tagen E19 und D7 innerhalb des jeweiligen Tierstammes nicht möglich.

4.3.2: Renale AT1b-mRNA-Expression



Abbildungen 8A und 8B: Renale AT1b-mRNA-Expression an E19 (8A) und D7 (8B)

Abb. 8A: Dargestellt ist die renale, relative AT1b-mRNA-Expression der MWF-Ratten im Vergleich zu der der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an E19 (Embryonaltag 19). Dabei ist * $P < 0,05$.

Abb. 8B: Dargestellt ist die renale, relative AT1b-mRNA-Expression der MWF-Ratten im Vergleich zu der der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an D7 (Postnataltag 7). Dabei ist $P > 0,05$.

Der Mittelwert der relativen Expression der AT1b-mRNA der Wistarrattenkontrollgruppe an E19 (Abb. 8A) und an D7 (Abb.8B) wird mit jeweils 100% angegeben.

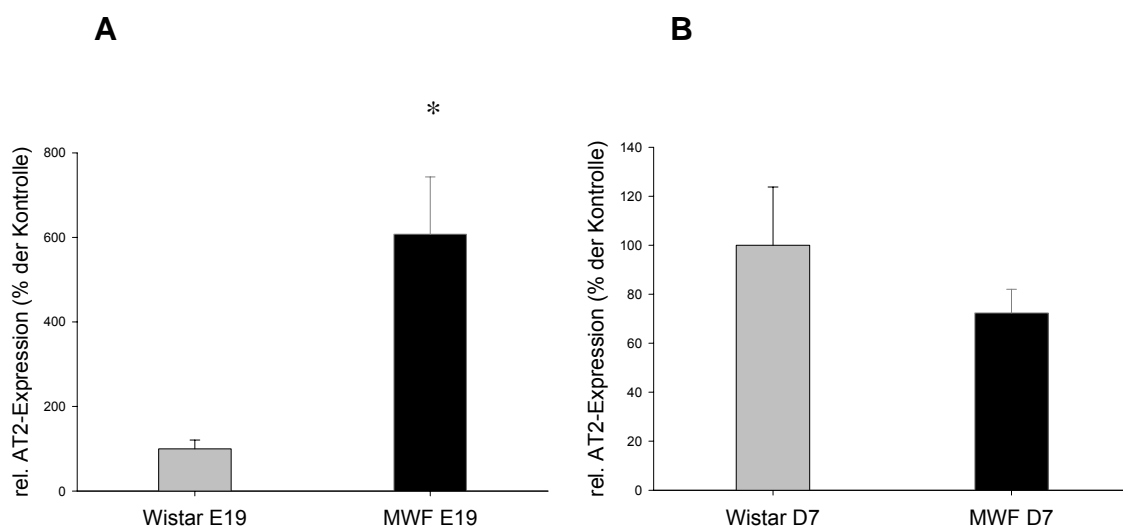
Die renale Expression der AT1b-mRNA ist bei den MWF-Tieren an E19 im Vergleich zu den Wistar-Tieren um 55% erniedrigt ($P < 0,05$), (Abb. 8A). Wie bei AT1a zeigt der Vergleich der AT1b-mRNA-Expressionen am Tag E19 zwischen den MWF- und den Wistar-Tieren den gleichen Unterschied von ungefähr der Hälfte bei den MWF-Tieren (Abb.8A).

An D7 ist zwischen den MWF- und den Wistar-Tieren kein Unterschied der AT1b-mRNA-Expression nachweisbar ($P > 0,05$), (Abb. 8B).

Damit besteht das an E19 unterschiedliche AT1b-mRNA-Expressionsniveau zwischen den MWF- und den Wistar-Tieren an D7 nicht mehr (Abb. 8A, 8B). Das weist auf eine zeitlich-dynamische Angleichung der renalen Expressionsniveaus von Wistar- und MWF-Tieren von E19 bis D7 hin.

Ein direkter Vergleich der AT1b-Expression an den Tagen E19 und D7 innerhalb des jeweiligen Tierstammes ist nicht möglich, da bei der Bestimmung der AT1b-mRNA-Expressionsniveaus bei der Durchführung der jeweiligen Messungen aufgrund stark unterschiedlicher Fluoreszenzniveaus kein gemeinsamer Schwellenwert definiert werden konnte.

4.3.3 Renale AT2-mRNA-Expression



Abbildungen 9A und 9B: Renale AT2-mRNA-Expression an E19 (9A) und D7 (9B)

Abb. 9A: Dargestellt ist die renale, relative AT2-mRNA-Expression der MWF-Ratten im Vergleich zu der der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an E19 (Embryonaltag 19). Dabei ist * $P < 0,05$.

Abb. 9B: Dargestellt ist die renale, relative AT2-mRNA-Expression der MWF-Ratten im Vergleich zu der der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an D7 (Postnataltag 7). Dabei ist $P > 0,05$.

Der Mittelwert der relativen Expression der AT2-mRNA der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an E19 (Abb. 9A) und an D7 (Abb.9B) wird mit jeweils 100% angegeben.

Am Tag E19 ist im Vergleich zwischen den beiden Tierstämmen MWF und Wistar die renale Expression der AT2-mRNA bei den MWF-Tieren im Vergleich zu den Wistar-Tieren um 508% erhöht ($P < 0,05$) (Abb. 9A) und fällt bis zum Tag D7 auf ca. 70 % ($P > 0,05$) des Wertes der Wistar-Tiere ab (Abb. 9B). Damit ist die mRNA-Expression des AT2-Rezeptorgens an E19 bei den MWF-Tieren gegenüber den Wistar-Tieren um das Fünffache erhöht ($P < 0,05$), (Abb. 9A). An D7 sind keine Unterschiede der Genexpressionsniveaus mehr messbar ($P > 0,052$), (Abb. 9B).

Das an E 19 erhöhte AT2-mRNA-Expressionsniveau bei den MWF- im Vergleich zu den Wistar-Tieren besteht an D7 nicht mehr. In diesem Sinne liegt von E19 bis D7 eine klare zeitlich-dynamische Angleichung der relativen AT2-mRNA-Expression des MWF- an die des Wistar-Tierstammes vor (Abb. 9A, 9B).

Innerhalb des jeweiligen Tierstammes war ein Vergleich der AT2-mRNA-Expression an den Tagen E19 und D7 bei stark unterschiedlicher Fluoreszenzniveaus der jeweiligen Messungen nicht möglich, da die Festlegung eines gemeinsamen Schwellenwertes sich verbot.

4.3.4 Renale Angiotensinogen-mRNA-Expression

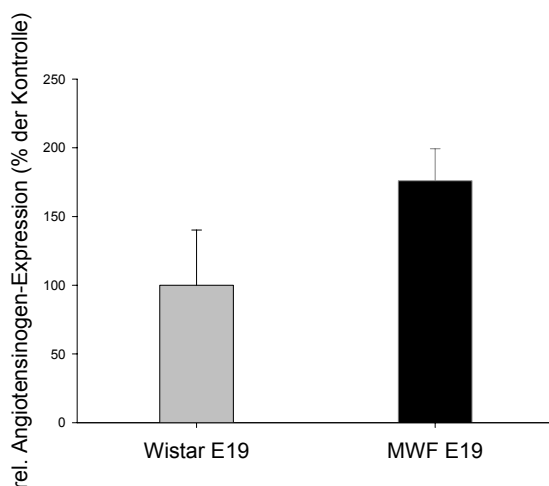


Abbildung 10: Renale Angiotensinogen-mRNA-Expression an E19

Abb. 10: Dargestellt ist die renale, relative Angiotensinogen (Agt)-mRNA-Expression der MWF- im Vergleich zu der der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an E19 (Embryonaltag 19). Dabei ist $P > 0,05$.

Der Mittelwert der relativen Expression der Angiotensinogen-mRNA der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an E19 (Abb. 10) wird mit 100% angegeben.

Das relative Expressionsniveau bei den MWF-Tieren liegt bei ca. 175% dieses Wertes (Abb.10). Der Unterschied der beiden Angiotensinogen-mRNA-Expressionsniveaus zwischen den Wistar- und den MWF-Tieren ist nicht signifikant ($P > 0,05$), (Abb.10).

4.3.5 Renale Angiotensin-Konversionsenzym 2-mRNA-Expression

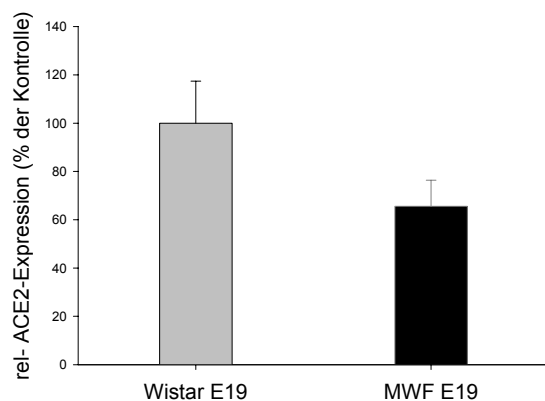


Abbildung 11: Renale Angiotensin-Konversionsenzym 2-mRNA-Expression an E19

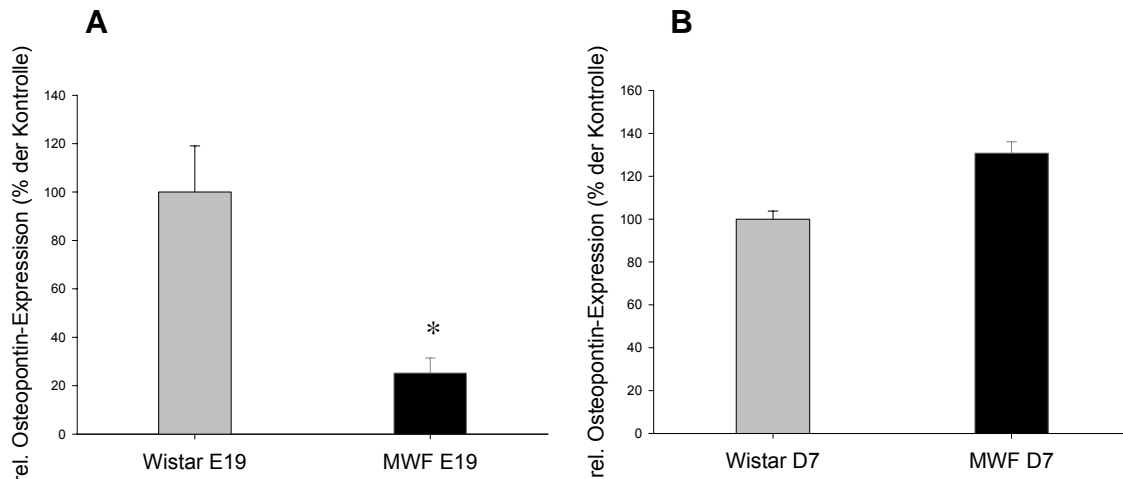
Abb. 11: Dargestellt ist die renale, relative Angiotensin-Konversionsenzym 2 (ACE2)-mRNA-Expression der MWF-Ratten im Vergleich zu der der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an E19 (Embryonaltag 19). Dabei ist $P > 0,05$.

Der Mittelwert der relativen Expression der Angiotensin-Konversionsenzym 2 (ACE2)-mRNA der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an E19 (Abb. 11) wird mit 100% angegeben.

Das ACE2-Expressionsniveau bei den MWF-Tieren liegt bei 65% dieses Wertes (Abb.11). Der Unterschied der beiden ACE2-mRNA-Expressionsniveaus zwischen den Wistar- und den MWF-Tieren ist nicht signifikant ($P > 0,05$), (Abb.11).

4.4 Expressionsanalyse des Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-Systems

4.4.1 Renale Osteopontin-mRNA-Expression



Abbildungen 12A und 12B: Renale Osteopontin-mRNA-Expression an E19 (12A) und D7 (12B)

Abb. 12A: Dargestellt ist die renale, relative Osteopontin (OPN)-mRNA-Expression der MWF-Ratten im Vergleich zu der der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an E19 (Embryonaltag 19). Dabei ist * $P < 0,05$.

Abb. 12B: Dargestellt ist die renale, relative Osteopontin (OPN)-mRNA-Expression der MWF-Ratten im Vergleich zu der der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an D7 (Postnataltag 7). Dabei ist $P > 0,05$.

Der Mittelwert der relativen Expression der Osteopontin (OPN)-mRNA der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an E19 (Abb. 12A) und an D7 (Abb. 12B) wird mit jeweils 100% angegeben.

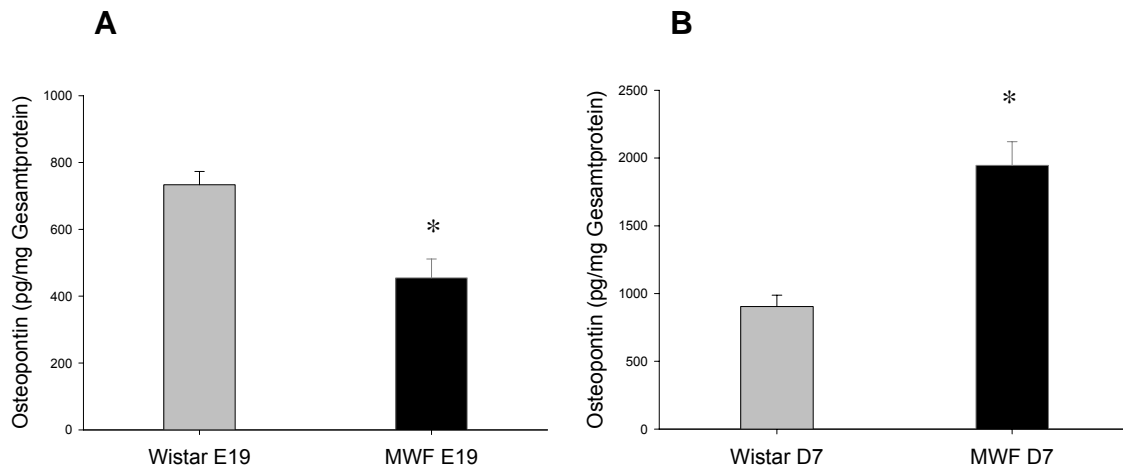
Die renale Expression der OPN-mRNA war bei den MWF- im Vergleich zu der der Wistar-Tiere an E19 um 75% erniedrigt ($P < 0,05$), (Abb 12A).

An D7 scheinen sich die Expressionsverhältnisse im Vergleich zu E19 umzudrehen. Es können jedoch keine Unterschiede im Vergleich der OPN-mRNA-Expression zwischen den MWF- und den Wistar-Tieren aufgezeigt werden ($P > 0,05$), (Abb. 12B).

Das erniedrigte mRNA-Expressionsniveau zwischen den MWF- und den Wistar-Tieren an E19 hat sich bis D7 angeglichen (Abb. 12A, 12B). Folglich ist hier eine zeitliche Dynamik zu erkennen.

Ein Vergleich der OPN-mRNA-Expression innerhalb der Tierstämme MWF und Wistar an den Tagen E19 und D7 war aufgrund stark unterschiedlicher Fluoreszenzniveaus der jeweiligen Messungen nicht möglich, da kein gemeinsamer Schwellenwert definiert werden konnte.

4.4.2 Renale Osteopontin-Proteinbestimmung



Abbildungen 13A und 13B: Renale Osteopontin-Proteinbestimmung an E19 (13A) und D7 (13B)

Abb. 13A: Dargestellt ist die renale, quantitative Proteinbestimmung des Osteopontins (OPN) bei den MWF-Ratten im Vergleich zu der bei der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an E19 (Embryonaltag 19). Dabei ist * $P < 0,05$.

Abb. 13B: Dargestellt ist die renale quantitative Proteinbestimmung des Osteopontins bei den MWF-Ratten im Vergleich zu der bei der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an D7 (Postnataltag 7). Dabei ist * $P < 0,05$.

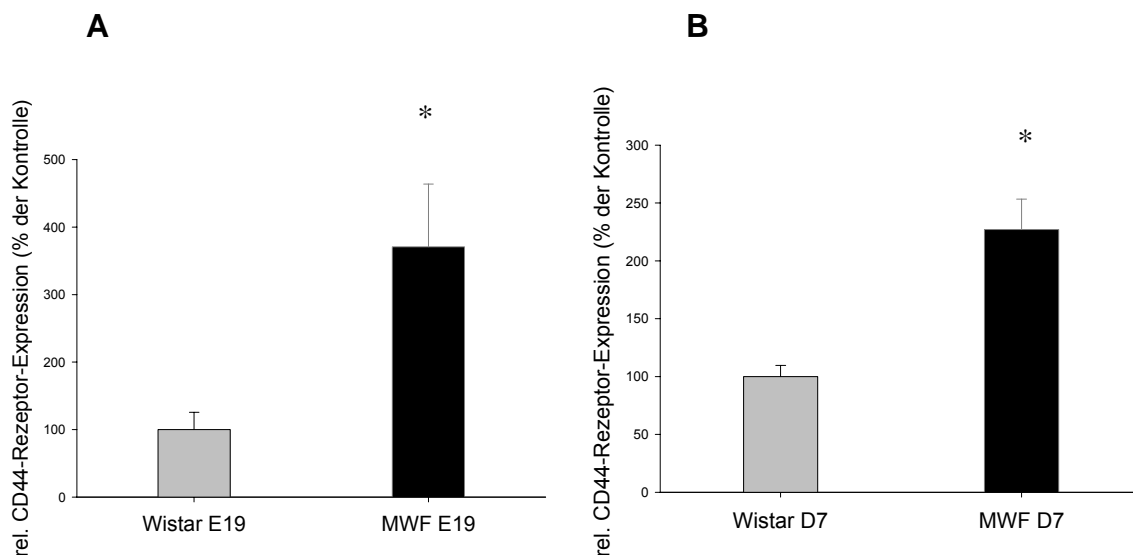
Die renale Osteopontin (OPN)-Proteinexpressionsmessung bestätigt an E 19 (Abb. 13A) das Ergebnis der OPN-mRNA-Expressionsmessung (Abb. 12A), an D7 bestätigt die renale Osteopontin (OPN)-Proteinexpressionsmessung (Abb. 13B) das Ergebnis der OPN-mRNA-Expressionsmessung tendenziell (Abb. 12B).

An E 19 ist die renale OPN-Proteinexpression bei den MWF- im Vergleich zu den Wistar-Tieren an E19 um 38% erniedrigt ($P < 0,05$), (Abb. 13A).

An D7 dreht sich das Verhältnis um. Die OPN-Proteinexpression ist bei den MWF-Tieren im Vergleich zu den Wistar-Tieren um 115% erhöht ($P < 0,05$), (Abb. 13B).

Während an E19 die OPN-Proteinexpression bei den MWF- im Vergleich zu den Wistar-Tieren erniedrigt ist, ist diese an D7 bei den MWF- im Vergleich zu den Wistar-Tieren erhöht. Somit ist hier eine zeitliche Dynamik vorzuweisen. Diese Dynamik wird auch an der absoluten Zunahme der OPN-Proteinmenge deutlich. Bei den Wistar-Tieren nimmt OPN bezogen auf je 1mg Proteinextrakt von 734 pg an E19 auf 903 pg an D7 um das 1,23-fache nur wenig zu. Demgegenüber steigt bei den MWF-Tieren OPN von 455 pg an E19 auf 1.945 pg um das 4,28-fache an.

4.4.3 Renale CD44–Rezeptor-mRNA–Expression



Abbildungen 14A und 14B: Renale CD44–Rezeptor-mRNA–Expression an E19 (14A) und D7 (14B)

Abb. 14A: Dargestellt ist die renale, relative CD44–Rezeptor(CD44)-mRNA–Expression der MWF-Ratten im Vergleich zu der der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an E19 (Embryonaltag 19). Dabei ist $P < 0,05$.

Abb. 14B: Dargestellt ist die renale, relative CD44–Rezeptor(CD44)-mRNA–Expression der MWF-Ratten im Vergleich zu der der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an D7 (Postnataltag 7). Dabei ist $P < 0,05$.

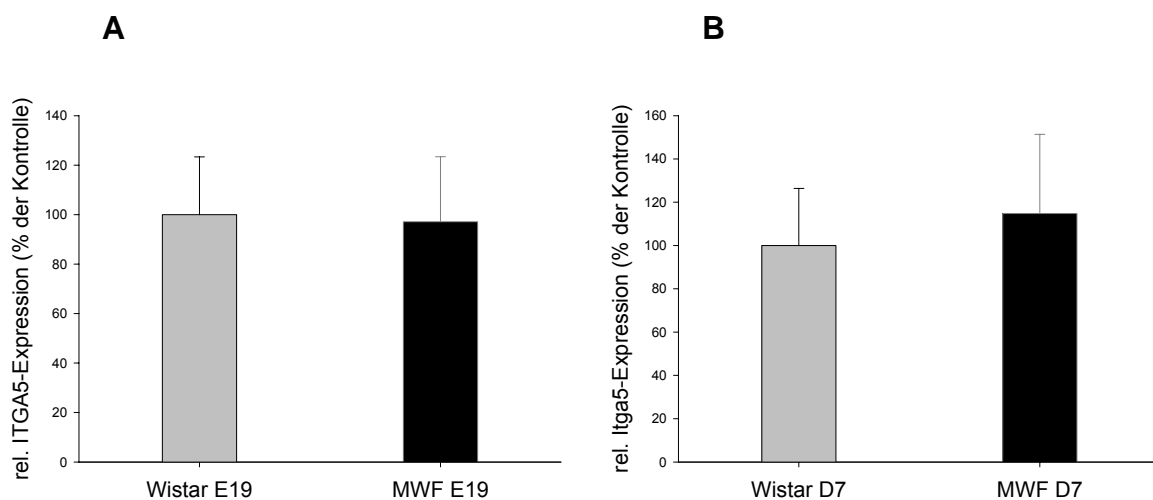
Der Mittelwert der relativen Expression der CD44-Rezeptor-(CD44)-mRNA der Wistarrattenkontollgruppe an E19 (Abb. 14A) und an D7 (Abb.14B) wird mit jeweils 100% angegeben.

An E19 zeigt die relative renale CD44-Rezeptor (CD44)-mRNA-Expression bei den MWF- im Vergleich zu den Wistar-Tieren eine Erhöhung um 271% ($P < 0.05$), (Abb. 14A).

An D7 erreicht die renale Expression der CD44-mRNA bei den MWF- im Vergleich zu der bei den Wistar-Tieren ein Erhöhung von 127% ($P < 0.05$), (Abb. 14B).

Zusammengefasst besteht an den beiden untersuchten Tagen E19 und D7 eine starke Erhöhung der CD44-mRNA-Expression bei den MWF-Tieren (Abb. 14A, 14B) von 271 % (E19) bzw. 127% (D7) gegenüber der der Kontrollgruppe. Das an E19 gegenüber den Wistar-Tieren stark erhöhte Niveau der CD44-mRNA-Expression bei den MWF-Tieren bleibt somit an D7 erhalten.

4.4.4 Renale mRNA-Expression der Integrinkette alpha(v)



Abbildungen 15A und 15B: Renale-mRNA-Expression der Integrinkette alpha(v) an E19 (15A) und D7 (15B)

Abb. 15:A Dargestellt ist die renale, relative mRNA-Expression der Integrinkette alpha(v) (Itga5) der MWF-Ratten im Vergleich zu der der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an E19 (Embryonaltag 19). Dabei ist $P > 0,05$.

Abb. 15B: Dargestellt ist die renale, relative mRNA-Expression der Integrinkette alpha(v) (Itga5) der MWF-Ratten im Vergleich zu der der Wistar-Ratten-Kontrollgruppe an D7 (Postnataltag 7). Dabei ist $P > 0,05$.

Der Mittelwert der relativen Expression der Integrinkette alpha(v) (Itga5)-mRNA der Wistarrattenkontrollgruppe an E19 (Abb. 15A), und an D7 (Abb.15B) wird mit jeweils 100% angegeben.

An E19 zeigt die renale Expression der Itga5-mRNA bei den MWF-Tieren mit 97% im Vergleich zu der bei den Wistarkontrolltieren keine Unterschiede ($P > 0,05$), (Abb 15A).

Auch an D7 sind keine Unterschiede der Itga5-mRNA-Expressionsmessung zwischen den MWF- und den Wistar-Tieren messbar ($P > 0,05$), (Abb. 15B).

Sowohl an E19 (Abb. 15A) als auch an D7 (Abb. 15B) ist damit beim MWF- und Wistar-Tierstamm die Itga5-mRNA-Expression etwa gleich groß. Es besteht folglich keine zeitliche Dynamik.

5 Diskussion

Die Relevanz der intrauterinen Programmierung der Nephronenanzahl als möglicher pathognomonischer Faktor renaler und kardiovaskulärer Erkrankungen trat in den letzten Jahren zunehmend in den Vordergrund^{16 9}. Für die Entstehung und Progression einer chronischen Niereninsuffizienz und die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist dabei eine verminderte Nephronenanzahl von Bedeutung^{9 16}.

Es ist das Ziel dieser Arbeit, die Genexpressionen von Komponenten des RAS und des OPN-CD44-Integrinrezeptor-Systems während der Nephrogenese zu untersuchen. Damit sollen Rückschlüsse auf die Bedeutung von Komponenten des RAS und des OPN-CD44-Integrinrezeptor-Systems für die Entwicklung von Nephronen gezogen werden.

Dazu wurde eine vergleichende Untersuchung dieser Komponenten an fetalem und postpartalem Nierengewebe im Munich-Wistar-Frömter-Rattenstamm mit angeboren verminderter Anzahl von Nephronen, postpartalem, spontanem, salzsensitivem Hypertonus, Proteinurie und chronisch progredientem Nierenversagen sowie im normotonen Wistar-Rattenstamm durchgeführt.

5.1 Die Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems in der Nephrogenese

Es gibt zahlreiche Arbeiten, die belegen, dass das Renin-Angiotensin-System (RAS) maßgeblich an der Nephrogenese beteiligt ist^{108 44 69}.

Wie in der aktuellen Literatur beschrieben werden sowohl Angiotensinogen, Renin und ACE in mesangialen Zellen des sich entwickelnden Nierengefäßsystems synthetisiert und freigesetzt. Dementsprechend wird in der embryonalen Niere Angiotensin II gebildet, das sowohl über den intrarenalen Blutstrom als auch das Ultrafiltrat⁸⁸ an Rezeptoren im nierenspezifischen Gefäß- und Tubulussystem binden kann^{7 31}.

In dem dynamischen Prozess der Nephrogenese weisen einige Komponenten des RAS eine starke Zeitabhängigkeit auf. Deshalb wird im folgenden Abschnitt der Diskussion neben den Stammunterschieden der mRNA-Expression auch auf die von der Zeit

abhängigen mRNA-Expressionsmuster der einzelnen Komponenten des RAS genauer eingegangen.

5.1.1 Vergleichende mRNA-Expressionsanalyse MWF/ Wistar:

Stammunterschiede und zeitliche Dynamik

5.1.1.1 Angiotensin II-Rezeptor Typ 1a

Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt erstmals eine während der Nephrogenese an E19 um 50 % verminderte Expression der AT1a-mRNA in der Niere bei den MWF-Tieren im Vergleich zu den Wistar-Tieren (Abb. 7A). Am postnatalen Tag D7 bleibt dieser Unterschied bestehen (Abb.7B). Das an E19 und D7 etwa um die Hälfte gegenüber den Wistar-Tieren erniedrigte Niveau der AT1a-mRNA-Expression bei den MWF-Tieren bleibt somit erhalten.

Das Vorkommen der Angiotensin II-Rezeptoren während der unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersuchten Hilgers und Norwood^{44 69 70}. Im Jahr 2000 beschrieb Norwood, dass die AT1-mRNA minimal an E 14, stark an E 20 exprimiert wird und im Erwachsenenalter persistiert⁷⁰. An E 14 macht der AT1-Rezeptor einen Anteil von 24% aus. Er kann dabei im undifferenzierten Mesenchym identifiziert werden⁷⁰. An E 17 beträgt die AT1-mRNA-Expression 4% der AngII-Rezeptoren und ist an reifen Nephronsegmenten zu finden⁷⁰. An E20 zeigen sich die mRNA-Expressionen von AT1 im äußeren Nierenmarkstreifen, in den tiefergelegenen Nephronen, in den Markstreifen und Blutgefäßen⁷⁰.

Wood und Rasch beschreiben, dass als Folge eines inaktiven RAS während der Nephrogenese, experimentell durch Angiotensin-Rezeptor-Blocker ausgeschaltet, renale Fehlentwicklungen ausgelöst werden können¹⁰⁸. So resultiert die Blockade des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1a (AT1a) durch den nicht hochspezifischen AT1a-Rezeptorblocker Losartan während der postnatalen Tage 1-12 im Rattenmodell in einer verminderten Anzahl an Nephronen (Reduktion um 42%) sowie in einem salzsensitiven Hypertonus im Erwachsenenalter¹⁰⁸. In einer anderen Arbeit wurde der Effekt der AngII-Rezeptorenblockade (AngII-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2) und der Hemmung des Angiotensin-Konversionsenzym in der postpartalen Phase der Nephrogenese an neugeborenen Sprague-Dawley-Ratten untersucht¹⁰⁰. Dabei induzierte die selektive Blockade von AngII-Rezeptoren Typ 1 (AT1) mittels Losartan in neugeborenen Ratten

einen Stillstand in der Reifung der Nierengefäße und des renalen Wachstums und resultierte in einer veränderten Nierenarchitektur. Diese war durch weniger, dickere und kürzere afferente Arteriolen, durch eine reduzierte glomeruläre Größe und Anzahl sowie durch eine tubuläre Dilatation charakterisiert ¹⁰⁰.

Die selektive Blockade des AngII-Rezeptors Typ 2 (AT2) mittels PD-123319 in neugeborenen Ratten führte jedoch zu keiner Beeinflussung der renalen Größe oder Form ^{100 70}. Diese Resultate weisen darauf hin, dass AngII über die AngII Typ1-Rezeptoren (AT1) die postpartale Nephrogenese beeinflusst ^{100 70 69}.

Basierend auf den Ergebnissen von Wood und Rasch könnten die verminderten AT1a-mRNA-Expressionen an E19 und D7 im MWF-Stamm (Abb. 7A, 7B) eine zentrale Bedeutung für den angeborenen Nephronenmangel von 50% haben. Dies unterstreicht die mögliche Bedeutung des RAS und speziell des AT1a-Rezeptors für die Entwicklung einer Oligonephronie während der Nephrogenese.

Weiterhin deutet der fortbestehende Unterschied der AT1a-mRNA-Expression zwischen E19 und D7 nicht nur darauf hin, dass die verminderte AT1a-mRNA-Expression bei den MWF-Tieren andauert (Abb. 7B), sondern auch, dass der mögliche funktionelle Einfluß des AT1a-Rezeptors auf die Entwicklung einer Oligonephronie nicht nur intrauterin, sondern auch postpartal erhalten bleibt.

Im Gegensatz zu Wood bestehen die morphologischen Veränderungen der Nierenentwicklung im MWF-Modell nicht (unveröffentlichte Befunde unserer Arbeitsgruppe). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass eine genetisch verminderte mRNA-Expression des AT1a-Rezeptors (im Gegensatz zu einer exogenen, pharmakologischen AT1a-Rezeptorblockade) zu einer Verminderung der Anzahl intakter Nephrone führt und nicht primär zu einer morphologischen Fehlentwicklung (dickere Arteriolen, Interlobular- und Bogenarterien mit zwiebelschalenähnlicher Wand, besonders in der kortikalen Gegend vorhandene atrophische Tubuli, zarte interstitielle Veränderungen in der Nähe atrophischer Tubuli ¹⁰⁷, sowie papilläre Atrophie, abnorme Wandverdickungen der intrarenalen Arteriolen, tubuläre Atrophie kombiniert mit interstitiellem Wachstum und einer deutlichen Einschränkung der Urinkonzentrierungsfähigkeit ^{37 38}).

Das Vorkommen der Angiotensin II-Rezeptoren (Angiotensin II-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2) während der unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Niere wurde von Norwood untersucht⁶⁹. Er zeigte, dass während der Metanephrogenese an E 14 die AT1-Rezeptoren minimal exprimiert werden. An E19 und E 20 ist die Expression der AT1-Rezeptoren renal erhöht. Direkt nach der Geburt steigt die renale AT1-Rezeptorendichte an, mit einem Maximum am 10. postnatalen Tag⁶⁹. Im Vergleich zu dem AT2-Rezeptor dominiert zu diesem Zeitpunkt der AT1-Rezeptor⁶⁹. Am Ende des ersten Monats ist das Vorkommen der AT1-Rezeptoren mit dem Vorkommen der AT1-Rezeptoren im Erwachsenenalter vergleichbar. Im Gegensatz zum AT1-Rezeptor lässt sich die Expression des AT2-Rezeptors von dem Embryonaltag E14 bis zum postnatalen Tag D7 leicht nachweisen, nach dem postnatalen Tag D14 ist der Nachweis der Expression des AT2-Rezeptors nicht mehr möglich⁶⁹. In der Erwachseneniere ist somit ebenfalls keine Expression des AT2-Rezeptors mehr aufzuzeigen⁶⁹. An E 17 war der AT1-Rezeptor an reifen Nephronsegmenten zu finden, während der AT2-Rezeptor an kondensiertem Mesenchym und an sich in Differenzierung befindendem Epithel befand. An E 20 waren beide Rezeptoren in der äußeren Medulla, an Nephronen und Blutgefäßen zu finden. AT2 war in der sich aktiv differenzierenden Rinde nachzuweisen⁶⁹.

Für weitere Erkenntnisse der ontogenetischen Effekte des AT1-Rezeptors wurden die renalen AT1a- und AT1b-mRNA-Expressionen untersucht. Während der Nierenreifung wurden keine Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionen der beiden Isoformen entdeckt. Die AT-1a-mRNA-Expression betrug dabei durchgehend 78% der beiden Rezeptoren. Es geht daraus hervor, dass die renale AT1-Rezeptorendichte nach der Geburt rapide zunimmt, assoziiert mit einer Erhöhung sowohl der AT1a- als auch der AT1b-mRNA-Expressionen. In der erwachsenen Niere scheint als prädominanter Rezeptor AT1a für die Mehrheit der Effekte des AngII's bezüglich glomerulärer und tubulärer Funktionen verantwortlich zu sein³⁴.

Auch Bouby N et al. zeigen¹², dass in der Rattenniere AT1a der prädominant exprimierte Rezeptorensubtyp in den Nephronensegmenten darstellt, dass das Glomerulum die einzige Struktur mit einem relativ hohen AT1b-Anteil ist und dass die AT1a- und AT1b-Rezeptorsubtypen sich nicht in ihrer Effizienz der *calcium-second messenger*-Aktivierung unterscheiden¹².

In der vorgelegten Arbeit besteht der Unterschied einer verminderten AT1a-mRNA-Expression sowohl an E 19 (Abb. 7A) als auch an D7 (Abb. 7B). Dies unterstreicht, dass genetische Unterschiede das Expressionsniveau der Rezeptoren während der intra- und postnatalen Entwicklungsphase festlegen. Man kann daraus schließen, dass die verminderten Expressionsniveaus des renalen AT1a-Rezeptors während der intrauterinen und postnatalen Phase bei den MWF-Tieren genetisch determiniert sind. Geht man, wie oben diskutiert, von einer wahrscheinlichen Beteiligung des AT1a-Rezeptors an der Ausbildung einer Oligonephronie aus, macht die beobachtete anhaltende Erniedrigung der AT1a-mRNA-Expression bei den MWF-Tieren sowohl an E 19 wie auch an D 7 deutlich, dass essentielle dynamische Differenzierungsschritte der quantitativen Nephronenanlage sowohl intrauterin als auch postpartal ablaufen und vom AT1a-Rezeptor beeinflusst werden können.

Die Befunde der zitierten Autoren sowie die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit deuten auf die Bedeutung des AT1a-Rezeptors für die Nephrogenese, insbesondere für die Entwicklung einer Oligonephronie während der Nephrogenese, hin.

5.1.1.2 Angiotensin II-Rezeptor Typ 1b

Ähnlich dem AT1a-Rezeptor ist im MWF-Stamm intrauterin am Tag E 19 die AT1b-mRNA-Expression um mehr als 50 % reduziert (Abb.8A). An D7 ist bezüglich der mRNA-Expression des AT1b-Rezeptors zwischen dem MWF- und dem Wistar-Tierstamm kein Unterschied mehr nachweisbar (Abb.8B). Eindeutig kann somit eine zeitliche Dynamik im Sinne der Angleichung unterschiedlicher Genexpressionsniveaus an E 19 und D7 zwischen dem MWF- und dem Wistar-Tierstamm aufgezeigt werden.

Bouby N et al. zeigen ¹², dass in der Rattenniere AT1b neben AT1a der weniger dominant exprimierte Rezeptorensubtyp in den Nephronsegmenten darstellt, dass das Glomerulum die einzige Struktur mit einem hohen AT1b-Anteil ist und dass die AT1a- und AT1b-Rezeptorsubtypen sich nicht in ihrer Effizienz der *calcium-second-messenger*-Aktivierung unterscheiden. Beim Menschen kodiert jeweils ein Gen für den AT1-Rezeptor und ein anderes für den AT2-Rezeptor ³. Demgegenüber kodieren bei der Ratte und der Maus zwei Gene für die beiden Isoformen des AT1-Rezeptorsubtyps, AT1a und AT1b, und ein anderes für den AT2-Rezeptorsubtyp ³. Die DNA-Sequenzen der Gene der beiden Isoformen des AT1-Rezeptors bei der Ratte sind zu 90% homolog.

Die Proteinsequenz der beiden Isoformen ist sogar zu 95% homolog. Funktionell scheint kein Unterschied zwischen beiden Isoformen zu bestehen^{3 69}. Jedoch unterscheidet sich das Verhältnis ihrer quantitativen Expression in den jeweiligen Organen³. In den meisten Fällen ist der dominierende Isotyp der AT1a-Rezeptor³. In der Harnhohlröhre und in der Nebenniere überwiegt jedoch der AT1b-Isotyp³. Durch Beobachtungen und Experimente bei Ratten und Mäusen mit Deletionen der einzelnen und beider Gene der Isotypen des AT1-Rezeptors (AT1a und AT1b) zeigte sich, dass der Ausfall eines der beiden Rezeptorisotypen durch die Funktion des verbliebenen Rezeptorisotyps anscheinend kompensiert werden kann. Nur wenn die Gene der beiden Isotypen gleichzeitig deletiert waren, stellten sich die gleichen pathologischen Veränderungen ein, die auch durch pharmakologische Rezeptorblockade durch Losartan hervorgerufen werden können³.

Basierend auf den oben beschriebenen Befunden der anderen Autoren könnte auch die verminderte AT1b-mRNA-Expression im MWF-Stamm an E19 (Abb. 8A) eine Ursache für den angeborenen Nephronenmangel sein. Dies deutet darauf hin, dass auch der AT1b-Rezeptor in der Nephrogenese eine Rolle spielt.

Die in der vorgelegten Arbeit aufgezeigte Dynamik eines im Unterschied zu E19 an D7 nicht mehr bestehenden, verminderten mRNA-Expressionsniveaus bei den MWF-Tieren verdeutlicht zusätzlich, dass im Gegensatz zu dem AT1a-Rezeptor der AT1b-Rezeptor vornehmlich für die intrauterinen Schritte der Nephrogenese von Bedeutung sein kann. Eine verminderte AT1b-mRNA-Expression während der intrauterinen Nephrogenese kann somit ebenfalls an der Ausbildung einer Oligonephronie von Bedeutung sein.

In der vorgelegten Arbeit werden zusammenfassend erstmals die mRNA-Expressionen des AT1b-Rezeptors zwischen einem normotensiven Tierstamm (Wistar) und einem hypertensiven Tierstamm mit angeborener Oligonephronie (MWF) an unterschiedlichen Tagen in der Nephrogenese verglichen. Die bekannten Vorarbeiten sowie die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit machen die Bedeutung des AT1b-Rezeptors an der Ausbildung einer Oligonephronie während der Nephrogenese wahrscheinlich.

5.1.1.3 Angiotensin II-Rezeptor Typ 2

Am Tag E19 ist im Vergleich zwischen den beiden Stämmen die renale Expression der AT2-mRNA bei den MWF– im Vergleich zu den Wistar-Tieren um das Fünffache erhöht

(Abb.9A). An D7 unterscheidet sich die mRNA-Expression des AT2-Rezeptors bei den MWF-Tieren nicht mehr von der mRNA-Expression des AT2-Rezeptors bei den Wistar-Tieren (Abb.9B). Im Sinne eines im Gegensatz zu E19 an D7 nicht mehr bestehenden Unterschiedes des Genexpressionsniveaus des AT2-Rezeptors zwischen dem MWF- und dem Wistar-Tierstamm ist hier eine zeitliche Dynamik zu erkennen.

Wolf zeigte ¹⁰⁶, dass AT2-Rezeptoren während der renalen fetalen Entwicklung bei der Ratte im Überfluß exprimiert und nach der Geburt deutlich herunterreguliert werden, wohingegen die Anzahl an AT1-Rezeptoren mit der Reifung fortschreitet ¹⁰⁶. Weiterhin ist ein vermehrtes Auftreten kongenitaler Nieren- und Harntraktanomalien bei Mäusen mit defizientem AT2-Rezeptor entdeckt worden, welches einen weiteren Beleg für eine Beteiligung dieses Rezeptorsubtyps an der Nieren- und Harnwegentwicklung liefert ¹⁰⁶. Die wachstumstimulierenden Effekte des Angiotensin II über den Angiotensin II-Rezeptor Typ1 könnten durch Angiotensin II-Rezeptor Typ2 induzierte Apoptose und Wachstumsinhibition gehemmt werden (Abb. 9A) ¹⁰⁶. In diesem Sinne könnten Veränderungen in dem Signalweg über den Ang II-Rezeptor Typ 2 die delicate Balance zwischen Wachstumsstimulation und -inhibition stören, was Veränderungen in der Tubulogenese zur Folge hätte ¹⁰⁶.

Basierend auf den Aussagen Wolfs lässt die in der vorgelegten Arbeit präsentierte hohe mRNA-Expression des AT2-Rezeptors an E 19 (Abb. 9A) bei den MWF-Tieren zusammen mit der erniedrigten mRNA-Expression des AT1a-Rezeptors bei den MWF-Tieren an E19 und D7 (Abb. 7A, 7B)) und der erniedrigten mRNA-Expression des AT1b-Rezeptors bei den MWF-Tieren an E19 (Abb. 8A) diese Balance klar in Richtung einer gehemmten Nephrogenese ausschlagen. Die Hochregulierung der AT2-mRNA bei den MWF-Tieren könnte demzufolge durch eine Störung der Balance zwischen den Angiotensin II-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 und somit zwischen Wachstumsstimulation und Inhibition während der Nephrogenese mit an der Ausbildung einer Oligonephronie beteiligt sein.

In einer anderen Arbeit wurde der Effekt der Angiotensin II-Rezeptorblockade (Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 und Typ 2) und der Hemmung des Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) in der postpartalen Phase der Nephrogenese an neugeborenen Sprague-Dawley-Ratten untersucht ¹⁰⁰. Dabei induzierte die selektive Blockade von Angiotensin II-Rezeptoren Typ1 mittels Losartan in neugeborenen Ratten

einen Stillstand in der Reifung der Nierengefäße und des renalen Wachstums mit dem Resultat einer veränderten Nierenarchitektur¹⁰⁰.

Die selektive Blockade des Angiotensin II-Rezeptors Typ 2 (AT2) mittels PD-123319 in neugeborenen Ratten führte jedoch zu keiner Beeinflussung der renalen Größe oder Form. Diese Resultate weisen darauf hin, dass Angiotensin II vor allem über die Angiotensin II-Rezeptoren Typ1 die postpartale Nephrogenese beeinflusst^{100 70}. Das in der vorgelegten Arbeit im Vergleich zu der mRNA-Expressionsmessung der AT1-Rezeptoren gegenteilige Ergebnis einer Hochregulierung der AT2-mRNA-Expression deckt sich mit den Befunden o.g. Autoren. So beeinflusst der AT2-Rezeptor im Gegensatz zum AT1-Rezeptor die Nephrogenese gegenteilig.

Bei den MWF-Tieren könnte somit auf der Basis der präsentierten Ergebnisse geschlussfolgert werden, dass während des *cross talk* der Nephrogenese die Oligonephronie bei den MWF-Tieren auch durch eine erhöhte mRNA-Expression des AT2-Rezeptors (Wachstumsinhibition/ Apoptose) ausgelöst werden kann.

Bei den MWF-Tieren besteht in der vorgelegten Arbeit das erhöhte Niveau der Genexpression des AT2-Rezeptorgens im Vergleich zu den Wistar-Tieren an D7 nicht mehr (Abb. 9B). Diese zeitliche Dynamik verdeutlicht, dass, wie auch bei dem AT1b-Rezeptor diskutiert, die Folgen eines gestörten mRNA-Expressionsniveaus des AT2-Rezeptors sich vornehmlich intrauterin auf die Entstehung einer Oligonephronie auswirken können.

Das Vorkommen der Angiotensinrezeptoren während der unterschiedlichen Entwicklungsstadien wurde auch von Norwood untersucht⁶⁹. Beide Rezeptoren wurden während der Metanephrogenese exprimiert. Der AT1-Rezeptor wurde dabei minimal an E14 exprimiert, an E19 zeigte sich eine erhöhte Expression des AT1-Rezeptors. In der ersten postnatalen Woche konnte eine erhöhte mRNA-Expression des AT1-Rezeptors nachgewiesen werden. Bis zum Ende des ersten postnatalen Monats war die mRNA-Expression des AT1-Rezeptors mit dem Expressionsniveau im Erwachsenenalter vergleichbar. An E19 waren AT1- und AT2-Rezeptoren in ausgeglichenem Verhältnis vorhanden. Unmittelbar nach der Geburt stieg die Ang II-Rezeptordichte an, mit einem Maximum am 10. postnatalen Tag⁶⁹. Zu diesem Zeitpunkt war der AT2-Rezeptor nicht dominierend. Mit dem fortschreitenden Alter nahm die Ang II-Rezeptordichte,

besonders die des AT2-Rezeptors wieder ab ⁶⁹. Im Gegensatz zum AT1-Rezeptor konnte die renale mRNA-Expression des AT2-Rezeptors von E14 bis zum postnatalen Tag D7 leicht nachgewiesen werden. An D28 war jedoch keine renale mRNA-Expression des AT2-Rezeptors mehr vorzuweisen ⁶⁹. In der adulten Niere war somit keine Expression des AT2-Rezeptors mehr aufzuzeigen ⁶⁹. An E14 machte der AT2-Rezeptor einen Anteil von 76 % aller AT-Rezeptoren aus und wurde dabei im undifferenzierten Mesenchym identifiziert ⁶⁹. Die AT2-mRNA-Expression war an E17 sowohl am kondensierten Mesenchym als auch am differenzierten Epithel zu finden. An E20 zeigte sich die mRNA-Expression des AT2-Rezeptors kontinuierlich in der sich aktiv differenzierenden Nierenrinde ⁶⁹.

Unterstützend zu der obengenannten These zeigt Shanmugam die zelluläre Verteilung des AT2-Rezeptors in der sich entwickelnden Rattenniere ⁸⁹. Vom Embryonaltag 12 (E12) bis zum postpartalen Tag 15 (D15) wird die AT2-mRNA in dem undifferenzierten nephrogenen mesenchymalen Gewebe, jedoch nicht in den unreifen und reifen Glomerula und Tubuli der Niere nachgewiesen ⁸⁹. Nach dem postpartalen Tag D22 wird keine AT2-mRNA-Expression mehr gefunden. Bereits Shanmugam deutet somit daraufhin, dass das Verschwinden der mRNA-Expression des AT2-Rezeptors synchron mit dem Endpunkt der Nephrogenese stattfindet. Er schließt daraus, dass AngII über den AT2-Rezeptor als ein Differenzierungs bzw. Wachstumsfaktor während der Nephrogenese agiert ⁸⁹.

Die Aussagen Shanmugams unterstützen die oben diskutierten Vermutungen der hauptsächlich intrauterinen Bedeutung des AT2-Rezeptors für die Nephrogenese.

Die von anderen Autoren bereits beschriebene Vermutung einer starken Zeitabhängigkeit der verschiedenen Komponenten des RAS wird durch die in der vorgelegten Arbeit beschriebenen Ergebnisse unterstützt. Weiterhin ergänzen die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit die Aussagen der Autoren in dem Sinne, dass der AT2-Rezeptor vornehmlich während der intrauterinen Nephrogenese wirkt.

5.1.1.4 Angiotensinogen

Zwischen den beiden Angiotensinogen-mRNA-Expressionsniveaus der Wistar- und MWF-Tiere an E 19 besteht kein Unterschied (Abb. 10).

Wolf konnte zeigen, dass bei Mäusen mit gezielter Deletion der Gene für Angiotensinogen (Ang) oder das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) deutliche Abnormitäten der Nieren auftreten ¹⁰⁶. Vor dem Hintergrund der von Wolf beschriebenen Effekte eines renalen Angiotensinogenmangels ¹⁰⁶ legt dieser Befund nahe, dass der Phänotyp der MWF-Tiere nicht auf einem pränatalen renalen Angiotensinogenmangel beruht.

5.1.1.5 Angiotensin-Konversionsenzym 2

In der vorgelegten Arbeit wurde erstmalig die mRNA-Expression des Angiotensin-Konversionsenzym 2 (ACE2) bestimmt. Zwischen den beiden ACE2-mRNA-Expressionsniveaus der Wistar- und MWF-Tiere an E 19 besteht kein Unterschied (Abb. 11). Da bisher keine vergleichenden Untersuchungen der ACE2-mRNA-Expressionsniveaus aus der embryonalen Nephrogenese veröffentlicht wurden, gibt diese Arbeit einen ersten Hinweis darauf, dass entsprechend der fehlenden unterschiedlichen Expression zwischen MWF und Wistar an E19 eine veränderte ACE2-mRNA-Expression bei der Ausbildung der Oligonephronie bei den MWF-Tieren wahrscheinlich keine Rolle spielt. Diese Aussage steht nicht im Widerspruch zu dem Befund, dass bei Ratten mit spontanem Hypertonus (SHR) die tubulären ACE2-mRNA-Expressionsniveaus in der Niere direkt bei Geburt zunächst erhöht waren, ehe sie im Verlauf der klinischen Ausprägung der postpartalen Hypertonie absanken und auf niedrigem Niveau verblieben ⁹⁸. Somit müssten eher andere Komponenten des RAS als Angiotensinogen und ACE2 zur Ausbildung einer Oligonephronie beitragen.

5.2 Die Bedeutung des Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-Systems in der Nephrogenese

Es gibt zahlreiche Arbeiten, die belegen, dass das Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-System (OPN-CD44-Integrinrezeptor-System) maßgeblich an der Nephrogenese beteiligt ist ^{48 75 82}.

In dem dynamischen Prozess der Nephrogenese weisen einige Komponenten des OPN-CD44-Integrinrezeptor-Systems eine starke Zeitabhängigkeit auf. Deshalb wird im folgenden Abschnitt der Diskussion neben den Stammunterschieden der mRNA-

Expression auch auf die von der Zeit abhängigen mRNA-Expressionsmuster der einzelnen Komponenten des OPN-CD44-Integrinrezeptor-Systems genauer eingegangen werden.

5.2.1 Vergleichende mRNA-Expressionsanalyse MWF/ Wistar: Stammunterschiede und zeitliche Dynamik

5.2.1.1 Osteopontin

In dem hypertensiven MWF-Tierstamm sind im Vergleich zu dem normotensiven Wistar-Tierstamm eine Verminderung sowohl der renalen Osteopontin(OPN)-mRNA-Expression am Embryonaltag 19 (E19) (Abb.12A), als auch eine Erniedrigung der OPN-Proteinexpression an E19 (Abb.13A) nachzuweisen. Am postnatalen Tag 7 (D7) kehren sich die Verhältnisse um (Abb.12B und 13B), Unterschiede können bei der mRNA-Expressionsmessung jedoch nicht aufgezeigt werden (Abb. 12B). Die OPN-Proteinexpression ist bei den Wistar-Tieren an D7 erhöht (Abb. 13B). Die OPN-mRNA-Expression zeigt analog zur OPN-Proteinexpression an D7 die Tendenz einer Hochregulierung bei den MWF-Tieren im Vergleich zu den Wistar-Tieren (Abb. 12B). Die Verminderung der OPN-mRNA- sowie der Proteinexpression an E 19 im Gegenstaz zu der Erhöhung der OPN-Proteinexpression (tendenziell auch der mRNA-Expression) an D7 weisen auf eine veränderte, starke zeitliche Dynamik der Osteopontingenexpression bei dem MWF- im Vergleich zu dem Wistar-Tierstamm hin.

Rogers schreibt Osteopontin (OPN) eine Bedeutung in der Nephrogenese zu ⁸². Nach ischämischem Stress, so begründet er seine Aussage, kann eine verstärkte OPN-mRNA-Expression in den Nieren der Versuchstiere verzeichnet werden. Aufgrund der vorhandenen Parallelen zwischen Nephrogenese und Regeneration kann man somit auf eine Funktion des OPN in der Nephrogenese schließen ⁸². Rogers weist die mRNA-Expression des OPN an unterschiedlichen Tagen während der Nephrogenese nach. Er zeigt, dass bei Ratten OPN noch vor der Kondensation im Metanephron ab Embryonaltag 13 (E13) exprimiert wird. Sowohl vor der Geburt in der Ureterknospe und in dem sich entwickelnden Nephronsegment als auch nach der Geburt in der nephrogenischen Zone bleibt diese Expression erhalten ⁸². Dabei scheint OPN während der Nephrogenese als ein Schlüsselregulator der prä-tubulären Kondensation des metanephritischen Blastems über den $\alpha(v)\beta(v)$ -Integrinrezeptor zu agieren. Ein

pharmakologisches Blockieren entweder von OPN direkt oder des alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptors durch Anti-OPN-Antikörper oder -Proteine, die die Nukleinsäuresequenz Arg – Gly - Asp besitzen (cycloRGDfV, Anti-alpha5beta3-AK oder LM609), verhindert die normale Nephrogenese. Die Einführung von alpha(v)-*antisense*-Oligonukleotiden oder Antikörpern in die metanephritische Organkultur führt zu der Dysmorphogenese der Niere mit einer reduzierten Population an Nephronen⁸².

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit einer erniedrigten OPN-mRNA-Expression bei den MWF-Tieren an E 19, bestätigt durch eine erniedrigte OPN-Proteinexpression bei den MWF- Tieren an E 19, unterstützen frühere Hinweise anderer Autoren, dass die Blockade oder Schwächung der OPN-Wirkung zu einem gestörten Ablauf der Nephrogenese führt.

Mit der vorgelegten vorgelegten Arbeit wurden erstmalig vergleichende Untersuchungen der Genexpression während der Nephrogenese zwischen einem normotensiven (Wistar) und einem hypertensiven Tierstamm mit angeborenem Nephronenmangel (MWF) durchgeführt. Diese lassen den Schluss zu, dass OPN eine bedeutende Rolle für einen angeborenen Nephronenmangel spielen kann. Sehr interessant ist, dass sich das Verhältnis der OPN-Expressionen perinatal zwischen dem Wistar- und MWF-Tierstamm umkehrt. Am Embryonaltag E 19 sind sowohl die mRNA-Expression als auch die Proteinexpression des Osteopontingens im MWF-Tierstamm erniedrigt, am postnatalen Tag D7 ist die mRNA-Expression des OPN tendenziell erhöht, die Proteinexpression von Osteopontin ist erhöht. Dies könnte sowohl Ausdruck eines verzögerten Anspringens der OPN-mRNA-Expression bei den MWF-Tieren im Rahmen der Nephrogenese sein und damit ursächlich im Zusammenhang mit der verminderten Nephronenbildung im MWF-Tierstamm stehen, als auch im Sinne einer postpartalen Kompensation zur Stimulation der Nephronenbildung interpretiert werden. So kann vor allem die stark erhöhte Proteinexpression an D7 bei den MWF-Tieren möglicherweise als Ausdruck eines Kompensationsprozesses bei manifestem Nephronenmangel gedeutet werden.

Erstmals wurden in der vorgelegten Arbeit die OPN-Expressionsniveaus zwischen dem oligonephronen Rattenstamm MWF und dem normonephronen Rattenstamm Wistar an unterschiedlichen Tagen verglichen. Im Sinne einer zeitlichen Dynamik bestehen die an E 19 aufgezeigten erniedrigten mRNA- und Proteinexpressionen des OPN an D7 nicht

mehr. Im Gegensatz zu E19 ist an D7 die Proteinexpression bei den MWF-Tieren erhöht, die mRNA-Expression ist tendenziell erhöht.

Hudkins beschreibt, dass in der nierengesunden, ausgewachsenen Ratte Osteopontin in dem proximalen und distalen Nierentubulus sowie in dem aufsteigenden Ast der Henle-Schleife exprimiert wird ⁴⁸. Nach Induktion akuter Ischämie werden nach einem Tag die Expression der OPN-mRNA und des Proteins in dem distalen Tubulus und dem aufsteigenden Ast der Henle-Schleife signifikant hochreguliert; nach 5 Tagen auch im proximalen Tubulus. Das in dem proximalen regenerierenden Tubulus auf die Basalmembran sezernierte OPN scheint die Migration regenerierender Zellen entlang dieser Basalmembran zu unterstützen ⁴⁸. Diese Beobachtungen unterstreichen Parallelen zwischen der Nierenentwicklung und der Nierenregeneration. Zelluläre Migration, die beiden Prozessen zugrunde liegt, benötigt OPN, welches in der Niere gebildet wird, sowohl um die epithelialen Zellen aus der extrazellulären Matrix proteolytisch zu lösen als auch, um die zeitweise von ihren Matrices losgelösten Zellen vor Apoptose zu bewahren ⁴⁸. Zum zeitlichen Verlauf des Auftretens der Osteopontin-mRNA-Expression schreibt Hudkins weiterhin, dass in embryonalen menschlichen Nieren Osteopontin ca. ab Tag 75 - 80 der Schwangerschaft im tubulären Epithel gebildet wird ⁴⁸. In fetalen Nieren findet man OPN zeitweise auch in der Ureterknospe und in einigen interstitiellen Zellen. Die Protein- und mRNA-Spiegel steigen mit dem Gestationsalter und bleiben bis in das Erwachsenenalter bestehen ⁴⁸.

Auch Verhulst zeigt, dass die OPN-Lokalisation in ischämischen Nieren bei Menschen und Ratten vergleichbar ist ¹⁰³. In gesunden Nieren bei Menschen und Ratten ist OPN am apikalen Pol der Zellen des distalen Tubulus vorhanden. Nach ischämischem Stress oder toxischem Schaden wird OPN in diesen Zellen hochreguliert und de novo in Zellen des proximalen Tubulus in perinukleären Vesikeln der Epithelien exprimiert ¹⁰³.

Zusammengefasst könnte der Anstieg der OPN-Genexpression an D7, wie oben diskutiert, erstens Ausdruck eines verzögerten Anspringens der OPN-mRNA-Expression bei den MWF-Tieren im Rahmen der Nephrogenese sein und damit ursächlich im Zusammenhang mit der verminderten Nephronenbildung im MWF-Tierstamm stehen oder zweitens im Sinne eines Kompensationsprozesses zur Stimulation der Nephronbildung postpartal bestehen.

5.2.1.2 CD44 Rezeptor

In der vorgelegten Arbeit zeigt der an der Nephrogenese beteiligte CD44-Rezeptor an E19 fast eine Verdreifachung der mRNA-Expression bei dem hypertensiven MWF- im Vergleich zum normotensiven Wistar-Tierstamm (14A). An D7 ist die mRNA-Expression bei den MWF-Tieren im Vergleich zu den Wistar-Tieren (Abb.14B) weiter um mehr als das Doppelte stark erhöht. Somit bleibt das stark erhöhte Expressionsniveau des CD44-Rezeptors bei den MWF-Tieren sowohl an E19 als auch an D7 erhalten.

Der CD44 Rezeptor (CD44) ist der zentrale Oberflächenrezeptor tubulärer Strukturen während der Nephrogenese. *In vitro* führt die Blockade des CD44-Rezeptors zu einem verminderten Überleben von Tubuluszellen und gestörter Nephrogenese ⁷⁵. Hierbei spielt die Interaktion zwischen dem Metanephritischen Mesenchym (MM) und der Ureterknospe (UB) eine zentrale Rolle. Die essentielle Interaktion zwischen dem MM und der UB gibt den Anstoß für die Verzweigungsmorphogenese und somit die Bildung des Ureterbaumes.

In embryonalen Nieren ist CD44 hauptsächlich basolateral in den von der Ureterknospe abstammenden Strukturen zu finden ⁷⁵. In gesunden menschlichen Nieren wird der CD44-Rezeptor am dominantesten exprimiert. Der CD44-Rezeptor bindet Hyaluronsäure. Über diese Bindung wird eine positive *feedback*-Schleife kreiert, die zu einer verstärkten Interaktion von CD44 mit Hyaluronsäure an den Spitzen der Ureterknospe führt. Somit wird durch die Expression von morphoregulatorischen Schlüsselmolekülen ein Transkriptionsprogramm für Zellüberleben, Zellproliferation, Zellmigration und Morphogenese von sich in einer Matrix befindlichen Zellen aktiviert ⁷⁵. Die während der Nephrogenese mit dem CD44-Rezeptor interagierende Hyaluronsäure tritt in der Nähe des sich entwickelnden Ureterbaumes auf ⁷⁵.

Osteopontin kann Bindungen mit dem CD44-Rezeptor eingehen. Der CD44-Rezeptor enthält mindestens 19 Exons, die in eine Vielzahl von CD44-Formen gespleißt werden ^{32 99 87}. Die intrazelluläre Form des OPN scheint mit dem Hyaluron-CD44-ERM(*protein ezrine/radixine/moesine*)-Komplex in embryonalen, migrierenden Fibroblasten assoziiert zu sein ¹¹². Dieser Bindungskomplex spielt weiterhin eine Rolle in anderen Differenzierungsprozessen, wie sie z.B. in aktivierten Makrophagen, migrierenden

Fibroblasten und metastatischen Zellen vorkommen. Migrierende Fibroblasten sind ein wichtiger Bestandteil während der embryonalen Morphogenese¹¹².

Auffallend an unseren Ergebnissen ist, dass an beiden Entwicklunstagen, sowohl intrauterin an E 19 (14A) als auch postpartal an D7 (14B), die mRNA-Expression des CD44-Rezeptors erhöht ist. Das kann darauf hindeuten, dass der CD44-Rezeptor ursächlich in die verminderte Entwicklung von Nephronen involviert ist. Zusammengefasst werden OPN und sein Rezeptor, CD44, im Vergleich zwischen dem normotensiven Wistar- und dem hypertensiven MWF-Tierstamm mit angeborenem Nephronenmangel unterschiedlich exprimiert. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass das OPN-CD44-Integrinrezeptor-System eine ursächliche Rolle für das Nephronendefizit des MWF-Tierstammes spielt.

5.2.1.3 Alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor

Der alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor ist ein weiterer, wesentlicher Rezeptor des Osteopontins (OPN).

Diese Arbeit zeigt, dass die mRNA-Expression des alpha(v)-Integrinrezeptorpeptids als Bestandteil des heterodimeren alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptors, des nach CD44 zweiten bekannten Rezeptors für den Liganden OPN, weder an E19 (Abb. 15A), noch an D7 (Abb. 15B) Unterschiede im Vergleich der beiden Tiergruppen MWF und Wistar aufweist und damit im Zeitgang unverändert ist.

Die mRNA der alpha(v)-Integrinrezeptorkette wird in den sich entwickelnden Nieren in unveränderter Weise exprimiert. Interessant ist, dass in der vorgelegten Arbeit weder an E19, noch an D7 im Gegensatz zum CD44-Rezeptor wesentliche Unterschiede in der mRNA-Expression der alpha(v)-Integrinrezeptorkette (Itga5) feststellbar waren. Dies ist besonders bemerkenswert, da der Integrinrezeptor alpha(v)beta(3) ebenfalls für die Nephrogenese von zentraler Bedeutung ist. Eine zeitliche Dynamik der unterschiedlichen Genexpressionsniveaus zwischen den Tierstämmen entfällt hier.

Wie einleitend beschrieben ist der alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor über den Liganden Osteopontin an der Nephrogenese beteiligt⁸². Über den alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor interagiert OPN während der prä-tubulären Kondensation des metanephritischen Blastems⁸². Die mRNA-Expression des Integrins alpha(v) hat man

an E13 auch bereits bei der Maus nachgewiesen. Dort konnte dieses Integrin sowohl in epithelialen Elementen der sich entwickelnden Nephrone nachgewiesen werden als auch seine Assoziation mit der beta(3)-Untereinheit gezeigt werden⁸². Unterstützend zeigen sich in dieser Hinsicht die Beobachtungen bei Ratten, dass OPN zeitgleich im Metanephron ab E13, noch vor der Kondensation, exprimiert wird. Sowohl in der Ureterknospe als auch in dem sich entwickelnden Nephronsegment vor der Geburt und in der nephrogenischen Zone nach der Geburt bleibt diese Expression erhalten⁸². Ein Blockieren des alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptors oder des OPN direkt, durch Anti-OPN-AK oder -Proteine, die die Nukleinsäuresequenz Arg-Gly-Asp besitzen (cycloRGDfV, Anti-alpha5beta3-AK oder LM609) verhindert die normale Nephrogenese⁸². Somit führt die Einführung von alpha(v)-*antisense*-Oligonukleotiden oder Antikörpern in die metanephritische Organkultur zu der Dymorphogenese der Niere mit einer reduzierten Population an Nephrone⁸². Diese nephrogenesefördernde Wirkung des OPN scheint über den alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor im Sinne einer antiapoptotische Rolle in der Nephrogenese zu agieren, da blastemische Zellen, die innerhalb des Metanephrons kultiviert werden, in der Gegenwart von trunkiertem OPN199 eine gesteigerte Apoptoserate aufweisen⁸². Folgerichtig scheint OPN über den alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor eine wichtige antiapoptotische Rolle während der Kondensation des metanephritischen Blastems zu spielen - ein unabdingbares Vorstadium der Nephronbildung *in vivo*. Diesen antiapoptotischen Effekt könnte OPN, interagierend mit dem alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor, über eine Hochregulierung des antiapoptotischen Protoonkogens bcl-2 bewirken^{82 90}. Tatsachen wie das Auffinden von bcl-2 in dem sich kondensierenden metanephritischen Blastem und das Auftreten fulminanter Apoptose bei dem Fehlen von bcl-2 unterstützen diese Vermutung. Schlussfolgernd wird OPN während der Nephrogenese in dem Rattenmetanephron *in vivo* exprimiert und nutzt die Bindung zum alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor für die Tubulogenese *in vitro*^{90 111}

Im Unterschied zum CD44-Rezeptor scheint eine veränderte Genexpression des alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptors keine ursächliche Rolle für den Nephronenmangel des MWF-Tierstammes zu spielen. Dies lässt den Schluss zu, dass die im Zusammenhang mit OPN gestörte Nephrogenese nicht auf einer gestörten mRNA-Expression des alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptors, sondern auf einer gestörten mRNA-Expression der Liganden basiert.

5.3 Die Bedeutung der Interaktion des Renin-Angiotensin-Systems, des Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-Systems und des *insulin-like growth factor*-Systems während der Nephrogenese

5.3.1 Die Interaktion des Renin-Angiotensin-Systems und des Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-Systems

Es besteht eine komplexe Interaktion zwischen dem Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptorsystem (OPN-CD44-Integrinrezeptor-System) und dem Renin-Angiotensin-System (RAS). In der vorgelegten Arbeit bestehen keine Unterschiede der Angiotensinogen- und ACE2-mRNA-Expressionen zwischen dem MWF- und dem Wistar-Tierstamm an dem Vergleichstag E 19 (Abb. 10, 11). Es sind jedoch sowohl die mRNA-Expressionen der Angiotensin II-Rezeptoren Typ 1a und Typ 1b (AT1a und AT1b),(Abb. 7A,8A) und des Osteopontins (Abb.12A) bei den MWF-Tieren an E19 und des AT1a-Rezeptors an D7 (Abb. 7B) herunterreguliert, als auch die mRNA-Expressionen des AngII-Rezeptors Typ 2 (AT2) an E19 (Abb. 9A), des CD44-Rezeptors an E19 und D7 (Abb. 14A,B) und die Proteinexpression Osteopontins an D7 (13B) hochreguliert.

Die renale OPN-Expression sowie die renale Integrinrezeptorexpression werden durch Angiotensin II hochreguliert ¹⁵.

In der vorgelegten Arbeit sind an E19 die AT1-mRNA-Expressionen bei den hypertensiven MWF-Tieren herunterreguliert. An D7 ist der AT2 Rezeptor hochreguliert. Die OPN-mRNA-Expression und die OPN-Proteinexpression sind an E 19 verringert, die OPN-Proteinexpression ist erhöht, die OPN-mRNA-Expression ist nur in der Tendenz an D7 erhöht. Da erstmals in der vorgelegten Arbeit die Genexpressionsmuster des RAS und des OPN-CD44-Integrinrezeptor-Systems vergleichend zwischen MWF- und Wistar-Tieren untersucht wurden, können die unterschiedlichen Genexpressionsmuster ein Hinweis dafür sein, dass für den angeborenen Nephronenmangel im MWF-Tierstamm ein gestörter *cross-talk* des RAS mit dem OPN-CD44-Integrinrezeptor-System ursächlich eine Rolle spielen kann.

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit, sowie die Befunde der anderen Autoren darauf hin, dass die veränderte mRNA-Expression der einzelnen Faktoren des RAS und des OPN-CD44-Integrinrezeptor-Systems sich gegenseitig

beeinflussen können und im MWF-Tierstamm als Ergebnis eine Störung des komplexen *crosstalk* der Nephrogenese mit der phänotypisch sichtbaren Folge einer Oligonephronie mit salzsensitivem Hypertonus bewirken.

5.3.2 Die Interaktion des Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-Systems und des *insulin-like growth factor*-Systems

Aus Regenerationsvorgängen ist weiterhin bekannt, dass es eine Interaktion zwischen dem *insulin-like growth factor*-System (IGF-System) und dem Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-System (OPN-CD44-Integrinrezeptor-System) gibt ⁷³.

In der vorgelegten Arbeit sind wie o.g. im hypertensiven MWF-Tierstamm im Vergleich zu dem normotensiven Wistar-Tierstamm eine Erniedrigung sowohl der renalen OPN-mRNA-Expression am Embryonaltag 19 (E 19) (Abb. 12A) als auch eine Erniedrigung der OPN-Proteinexpression am Embryonaltag 19 (E 19) (Abb. 13A) nachzuweisen. Am postnatalen Tag 7 (D7) kehrt sich das Verhältnis um (Abb. 12B, 13B). Hier zeigt die OPN-Proteinexpression bei den MWF-Tieren im Vergleich der beiden Tage eine Erhöhung (Abb. 13B), während die OPN-mRNA-Expression tendenziell erhöht ist (Abb. 12B).

Weiterhin fand man in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beim Vergleich der mRNA-Expressionen des *insulin-like growth factor-I* (IGF-I), des *insulin-like growth factor-II* (IGF-II) und des *insulin-like growth factor binding protein 3* (IGFBP-3) im Nierengewebe Unterschiede zwischen den beiden Rattenstämmen MWF und Wistar an E19 ⁸³. Aus den Ergebnissen dieser Vorarbeit ließ sich schlussfolgern, dass die Herunterregulation der fetalen IGF-I-mRNA-Expression in Kombination mit der erhöhten mRNA-Expression der renalen IGF-Bindungsmoleküle (IGF-II-Rezeptor und IGFBP-3) in der sich entwickelnden Niere womöglich mit einem genetischen Nephronendefizit und adultem Hypertonus assoziiert sein könnte.

Bereits 1996 berichtet Padanilam, dass die Infusion von IGF zu einer erhöhten OPN-mRNA-Expression und einer beschleunigten Regeneration bei ischämisch geschädigten Nieren führt ⁷³. Denkbar ist deshalb, dass auch im Rahmen der Nephrogenese eine Interaktion zwischen IGF und OPN stattfindet. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde, wie o.g., im selben Zeitrahmen bei den MWF-Tieren an E19 eine

verminderte Expression des fetalen IGF-I in Kombination mit einer erhöhten Expression von renalen IGF-Bindungsmolekülen (IGF-II-Rezeptor und IGFBP-3) gemessen. In der vorgelegten Arbeit zeigen sich an E19 die OPN-mRNA-Expression und die OPN-Proteinexpression verringert (Abb. 13A, 14A). Dies entspricht dem zu erwartenden Fakt einer verminderten IGF-Produktion.

An D7 liegen bezüglich der IGF-mRNA-Expressionen zwischen den beiden Tierstämmen keine Unterschiede mehr vor. Interessant ist, dass auch die verminderte OPN-mRNA-Expression in der vorgelegten Arbeit an D7 nicht mehr besteht (Abb. 12B). Die Proteinexpression weist an D7 sogar eine erhöhte Expression des Osteopontins bei den MWF-Tieren nach (Abb. 13B), die mRNA-Expression des OPN ist an D7 tendenziell erhöht. Diese erhöhten bzw. tendenziell erhöhten Expressionsmuster des Osteopontins können unabhängig von IGF, wie oben diskutiert, auch im Sinne eines verzögerten Anspringens der OPN-mRNA-Expression bei den MWF-Tieren im Rahmen der Nephrogenese bestehen und damit ursächlich im Zusammenhang mit der verminderten Nephronbildung im MWF-Tierstamm stehen oder im Sinne eines Kompensationsversuches zur Stimulation der Nephronbildung postpartal interpretiert werden. Zusammengefasst liefern auch die Befunde von D7 einen Hinweis für die mögliche Interaktion zwischen dem OPN-CD44-Integrinrezeptor- und dem IGF-System.

5.3.3 Die Interaktion des Renin-Angiotensin-Systems, des Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-Systems und des *insulin-like growth factor*-Systems

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit weisen auf zwei an der Nephrogenese beteiligte Systeme hin (RAS, OPN-CD44-Integrinrezeptor-System). Die Ergebnisse aus den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beziehen sich auf ein drittes an der Nephrogenese beteiligtes System (IGF-System)⁸³.

Stuart identifizierte mittels *high-density DNA array* mögliche Gene, die an der Morphogenese beteiligt sind⁹⁶. Deutliche Unterschiede wurden zwischen Genmustern gefunden, die von der Ureterknospe(UB) oder dem Metanephritischen Mesenchym (MM) zu verschiedenen Zeitpunkten der Nephrogenese exprimiert wurden. Viele dieser Gene waren mit dem neuronalen Wachstum oder der Differenzierung in Zusammenhang zu bringen. Zusammengefasst deuten Stuarts Ergebnisse nicht nur

darauf hin, dass während der Nephrogenese geordnete genetische Programme in der UB und dem MM die Bildung der ganzen Niere dirigieren, sondern auch, dass noch viele bisher unbekannte Entwicklungspfade an der Nephrogenese beteiligt sind (z.B. HNF-6, ADAM-10, Celsr-3, DDR2, und andere Gene) ⁹⁶. So könnten z.B. das verminderte Vorhandensein der AT1a- und AT1b-Rezeptoren an E19 (Abb. 7A,8A) und das erhöhte Vorkommen des AT2-Rezeptors an E19 (Abb. 9A) bei den MWF-Tieren sowohl an dem verminderten Vorkommen des extrazellulären Matrixproteins Osteopontins (Abb. 12A, 13A) und der Hochregulation seines assoziierten Achsenproteins CD44 (Abb. 14A) als auch an der gestörten Regulation der IGF-I/IGFBP-5/IGF-I-Rezeptorachse ⁸³ mit einer daraus resultierenden, angeborenen Oligonephronie (mit einer später sich entwickelnden Hypertonie) beteiligt sein. Unabhängige Aktionspfade sind ebenfalls denkbar ⁵⁴. In Anbetracht der zitierten Arbeiten und vor dem Hintergrund der vorgelegten Ergebnisse wäre zu erwarten, dass, wie das IGF-System, auch das RAS und das OPN-CD44-Integrinrezeptor-System an der Induktion der Differenzierung der Nephrone wesentlich beteiligt sind.

Zusammengefasst könnten das RAS, das OPN-CD44-Integrinrezeptor-System sowie das IGF-System jeweils Glieder in dem temporospatialen Prozess der Differenzierung der gesamten Nephrone darstellen. In diesem Zusammenhang gäben sie ein Beispiel für den hochkomplexen *crossstalk* sich wechselseitig beeinflussender Systeme. Die Komponenten dieser drei Systeme würden allerdings in den jeweiligen Abschnitten des Gesamtnephrons in zellspezifischer Kombination exprimiert werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass das Wechselspiel dieser drei Systeme in den unterschiedlichen Abschnitten des Nephrons gleichzeitig in enger topologischer Nachbarschaft auch das begleitende spezifische Gefäßsystem betrifft. Das sind beim Nephron aufsteigend die Abschnitte des Harnleiters, der Sammelrohre, des distalen Tubulus, der Henle-Schleife, des proximalen Tubulus und der Bowman-Kapsel mit dem juxtaglomerulärem Apparat. Im Gefäßsystem stehen den Strukturen des Nephrons absteigend die Interlobular- und Bogenarterien, die afferenten Arteriolen, das Gefäßknäuel, die efferenten Arteriolen und Kapillaren, die *vasa recta* der juxtamedullären sowie das peritubuläre Netzwerk der kortikalen Nephrone, bis zu ihrer Einmündung in die *vena renalis* gegenüber.

Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, diese komplexen Vorgänge im Einzelnen zu untersuchen.

5.4 Perspektive und Ausblick

Mögliche pathoanatomisch funktionelle Ursachen des essentiellen Hypertonus sind ungeklärt.

Experimentelle und klinische Befunde haben in der Vergangenheit gezeigt, dass ein intrauterin erworbener Mangel an Glomerula ein Risikofaktor für die Manifestation eines arteriellen Bluthochdrucks und kardiovaskulärer Erkrankungen ist.

Ein angeborener Mangel an Nephronen (Oligonephronie) ist als potentieller pathophysiologischer Mechanismus in den Vordergrund gerückt.

Welche Regulationsstörungen der fetalen Nierenentwicklung zu einer angeborenen Reduktion von Nephronen, mit zunehmendem Alter zu einem arteriellen Hypertonus und schließlich zu einer progredienten Niereninsuffizienz führen, sind bisher nicht bekannt.

Es war das Ziel dieser Arbeit, die Genexpressionen von Schlüsselkomponenten des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) und des Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-Systems (OPN-CD44-Integrinrezeptor-System) während der Nephrogenese in zwei Rattenstämmen vergleichend zu untersuchen, um damit Rückschlüsse auf eventuelle Besonderheiten der OPN-CD44-Integrinrezeptor-System- und der RAS- Genexpression zu ermöglichen, die die Entwicklung einer kongenitalen Oligonephronie mit späterer arterieller Hypertonie, Albuminurie und progredienter Niereninsuffizienz begleiten.

Dazu wurde eine vergleichende Untersuchung der Genexpression der Komponenten des RAS und des OPN-CD44-Integrinrezeptor-Systems während der Nephrogenese im Munich-Wistar-Frömter-Rattenstamm (MWF) mit angeboren verminderter Anzahl von Nephronen, postpartalem, spontanem, salzsensitivem Hypertonus, Proteinurie und chronisch progredientem Nierenversagen sowie im normotonen Wistar-Rattenstamm (Wistar) durchgeführt.

In den hier präsentierten Experimenten wurden beim Vergleich der beiden Rattenstämme, MWF und Wistar, Unterschiede sowohl der embryonalen als auch der postnatalen Genexpression bei den meisten Komponenten des RAS und des OPN-

CD44-Integrinrezeptor-Systeme (AT-1a, AT-1b, AT-2, OPN, CD44) gefunden. Somit erweitert diese Arbeit die Erkenntnisse anderer Studien, die während der Nephrogenese Genexpressionsmuster und morphologische Veränderungen bei kongenitaler Oligonephronie im Vergleich zu einem gesunden Kontrollmodell untersuchten. Im RAS wurde dabei deutlich, dass wahrscheinlich nicht der Ligand Angiotensin II oder die extrazelluläre Monocarboxipeptidase ACE2, sondern die Rezeptoren AT1a, AT1b und AT2 an der Ausbildung des Nephronendefizits im MWF-Tierstamm beteiligt sind. Im OPN-CD44-Integrinrezeptor-System demgegenüber sind an der Entwicklung einer Oligonephronie im MWF-Tierstamm wahrscheinlich der Ligand Osteopontin sowie der CD44-Rezeptor und nicht der Integrinrezeptor beteiligt.

Während die vorgelegte Arbeit erste Hinweise auf eine Beteiligung einiger spezifischer Komponenten des RAS und des OPN-CD44-Integrinrezeptor-Systems während der Nephrogenese liefert, sollten zur weiteren Abklärung der kausalen Rolle der diskutierten Systemkomponenten Versuche mit einer selektiven Blockade z.B. der Angiotensin II-Rezeptoren, des Osteopontins und des CD44-Rezeptors vergleichend im Wistar- und MWF-Rattenstamm folgen.

Bei der Frühdiagnose und klinischen Prophylaxe der Oligonephronie könnten z.B. nichtinvasive, bildgebende Verfahren, wie PET oder MRT, zur Messung der Nephronenanzahl der Erwachseneniere eingesetzt werden. Solche Meßverfahren wären zum Beispiel auf der Basis der hochstoffwechselaktiven Eigenschaften des Nephrons über die Bestimmung des renalen Energiestoffwechsels vorstellbar.

Damit könnten in der großen Gruppe von weit über 90% der essentiellen Hypertonien unter Umständen die Patienten bestimmt werden, die durch eine angeborene Oligonephronie ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Hypertonie im Erwachsenenalter hätten. Letztlich könnte somit der Anteil der Bevölkerung bestimmt werden, der das Risiko einer „oligonephronie- bedingten Hypertonie“ trüge.

6 Zusammenfassung

6.1 Ziel der Arbeit

Oligonephronie könnte beim Menschen eine wichtige Ursache für die Entwicklung eines primären Hypertonus im Erwachsenenalter sein. Diese Hypothese wird von einem genetischen Rattenmodell gestützt, der Munich-Wistar-Frömter(MWF) -Ratte, die vor dem Hintergrund eines angeborenen Nephronenmangels einen spontanen Hypertonus entwickelt. Das Renin-Angiotensin-System (RAS) reguliert sowohl organständig wie auch systemisch durch endokrine, parakrine und intrakrine Wirkungen den Langzeitblutdruck des Säugerorganismus und ist an Wachstums- und Differenzierungsvorgängen der Niere während der embryonalen Nephrogenese beteiligt. Das Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)-Integrinrezeptor-System (OPN-CD44-Integrinrezeptor-System) spielt bei Differenzierungsprozessen während der Nephrogenese auch eine Rolle. In dieser Arbeit wird die Hypothese untersucht, ob eine Oligonephronie bereits im ungeborenen Föten nachweisbar ist und ob die Expression einiger Schlüsselkomponenten der Gene des RAS oder des OPN-CD44-Integrinrezeptor-Systems in der MWF-Ratte während der kritischen Phase der embryonalen Entwicklung der Niere anders ist.

6.2 Methoden

Es wurden hypertone MWF- und normotone Wistar-Ratten während der Nephrogenese am Embryonaltag 19 (E19) und dem postpartalen Tag 7 (D7) miteinander verglichen. Quantitative Bestimmungen der mRNA-Expression wurden mit der *real-time*-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) bestimmt. Teilweise erfolgte der Proteinnachweis der PCR-Ergebnisse mittels ELISA.

6.3 Ergebnisse

Im RAS war an E19 bei den MWF-Tieren im Vergleich zu den Wistar-Ratten das Niveau der Expression der renalen mRNA der Angiotensin II-Rezeptoren der Typen 1A (-50%)

($P < 0.05$) und 1B (-55%) vermindert ($P < 0.05$) (Abb. 7A, 8A). Demgegenüber war das Expressionsniveau des Angiotensin II-Rezeptors Typ 2 an E19 deutlich erhöht (+508%, $P < 0,05$) (Abb.9A). An D7 war in MWF gegenüber Wistar das Niveau der Expression der renalen mRNA des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1a (-42%, $P < 0,05$) erniedrigt (Abb. 7B). Im OPN-CD44-Integrinrezeptor-System waren an E19 bei den MWF-Tieren im Vergleich zu den Wistar-Tieren das Niveau der Expression der renalen mRNA des Osteopontins (-75%, $P < 0,05$) und die Proteinexpression des Osteopontins (-44%, $P < 0,05$) verringert (Abb. 12A, 13A) sowie das Niveau der Expression der renalen mRNA des Rezeptors CD44 (+270%, $P < 0,05$) erhöht (Abb. 14A). An D7 war in MWF gegenüber Wistar das Niveau der Expression der renalen Proteinexpression Osteopontins (+107%, $P < 0,05$) (Abb. 13B) und das Niveau der Expression der renalen mRNA des CD44-Rezeptors (+127%, $P < 0,05$) (Abb. 14B) erhöht. An D100 waren der systolische Blutdruck, die Urin-Albumin-Ausscheidung und die mittlere glomeruläre Fläche im Vergleich zu Wistar erhöht (jeweils $P < 0.05$), (Tabelle 6).

6.4 Schlussfolgerung

Die mRNA-Expression einiger Komponenten des organständigen RAS sowie des OPN-CD44-Integrinrezeptor-Systems könnten sowohl embryonal als auch postpartal für die Anlage der Oligonephronie während der Nephrogenese verantwortlich sein. Zur genaueren Erkenntnis bezüglich der Rollen der diskutierten Systeme müssten Versuche mittels selektiver Blockade, z.B. der AngII-Rezeptoren, Osteopontins und des CD44-Rezeptors, folgen.

7 Literaturverzeichnis

¹Z. Aberbukh, *et al.*, "Effect of dietary manipulations on glomerular filtration rate of mice offspring of nephrectomized mothers," *Am. J. Nephrol.* **13**(3), 190 (1993).

²S. Ashkar, *et al.*, "Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity," *Science.* **287**(5454), 860 (2000).

³L. P. Audoly, M. I. Oliverio, and T. M. Coffman, "Insights into the functions of type 1 (AT1) angiotensin II receptors provided by gene targeting," *Trends Endocrinol. Metab.* **11**(7), 263 (2000).

⁴S. Azar, *et al.*, "Single-nephron pressures, flows, and resistances in hypertensive kidneys with nephrosclerosis," *Kidney Int.* **12**(1), 28 (1977).

⁵S. Azar, *et al.*, "Single-nephron dynamics in "post-salt" rats with chronic hypertension," *J. Lab Clin. Med.* **91**(1), 156 (1978).

Ref Type: Journal

⁶M. Bader and D. Ganten, "Update on tissue renin-angiotensin systems," *J. Mol. Med.* **86**(6), 615 (2008).

|

⁷M. Bader, *et al.*, "Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research," *J. Mol. Med.* **79**(2-3), 76 (2001).

⁸P. G. Baer, G. Bianchi, and D. Liliana, "Renal micropuncture study of normotensive and Milan hypertensive rats before and after development of hypertension," *Kidney Int.* **13**(6), 452 (1978).

⁹D. J. Barker, *et al.*, "Weight in infancy and death from ischaemic heart disease," *Lancet* **2**(8663), 577 (1989).

¹⁰ G. Bianchi, *et al.*, "Blood pressure changes produced by kidney cross-transplantation between spontaneously hypertensive rats and normotensive rats," *Clin. Sci. Mol. Med.* **47**(5), 435 (1974).

¹¹ U. Boberg and A. E. Persson, "Increased tubuloglomerular feedback activity in Milan hypertensive rats," *Am. J. Physiol* **250**(6 Pt 2), F967-F974 (1986).

¹² N. Bouby, *et al.*, "Expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II-induced calcium mobilization along the rat nephron," *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**(11), 1658 (1997).

¹³ M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.* **72:248-54.**, 248 (1976).

¹⁴ A. Brandis, *et al.*, "Age-dependent glomerulosclerosis and proteinuria occurring in rats of the Milan normotensive strain and not in rats of the Milan hypertensive strain," *Lab Invest* **55**(2), 234 (1986).

¹⁵ P. Brassard, *et al.*, "Role of angiotensin type-1 and angiotensin type-2 receptors in the expression of vascular integrins in angiotensin II-infused rats," *Hypertension* **47**(1), 122 (2006).

¹⁶ B. M. Brenner, D. L. Garcia, and S. Anderson, "Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other?," *Am. J. Hypertens.* **1**(4 Pt 1), 335 (1988).

¹⁷ B. M. Brenner and H. S. Mackenzie, "Nephron mass as a risk factor for progression of renal disease," *Kidney Int. Suppl* **63**, S124-S127 (1997).

¹⁸ Y. Chen, D. Lasaitiene, and P. Friberg, "The renin-angiotensin system in kidney development," *Acta Physiol Scand.* **181**(4), 529 (2004).

¹⁹ J. J. Curtis, *et al.*, "Remission of essential hypertension after renal transplantation. 1983," *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**(12), 2404 (2000).

²⁰ L. K. Dahl, M. Heine, and K. Thompson, "Genetic influence of the kidneys on blood pressure. Evidence from chronic renal homografts in rats with opposite predispositions to hypertension," *Circ. Res.* **40**(4), 94 (1974).

²¹ U. Danilczyk and J. M. Penninger, "Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney," *Circ. Res.* **98**(4), 463 (2006).

²² M. H. de Keijzer, A. P. Provoost, and J. C. Molenaar, "Glomerular hyperfiltration in hypertensive fawn-hooded rats," *Ren Physiol Biochem.* **11**(1-2), 103 (1988).

²³ Gasparo M. De, "[AT(1) and AT(2) angiotensin II receptors: key features]," *Drugs. Spec No 1:1-10.*, 1 (2002).

²⁴ D. T. Denhardt, *et al.*, "Osteopontin-induced modifications of cellular functions," *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **760:127-42.**, 127 (1995).

²⁵ S. Deutscher, F. H. Epstein, and M. O. Kjelsberg, "Familial aggregation of factors associated with coronary heart disease," *Circulation* **33**(6), 911 (1966).

²⁶ M. Dodic, *et al.*, "Programmed hypertension: kidney, brain or both?," *Trends Endocrinol. Metab* **13**(9), 403 (2002).

²⁷ M. Ekblom, *et al.*, "Transient and locally restricted expression of laminin A chain mRNA by developing epithelial cells during kidney organogenesis," *Cell.* **60**(2), 337 (1990).

²⁸ A. Fassi, *et al.*, "Beneficial effects of calcium channel blockade on acute glomerular hemodynamic changes induced by cyclosporine," *Am. J. Kidney Dis.* **33**(2), 267 (1999).

²⁹ A. Fassi, *et al.*, "Progressive glomerular injury in the MWF rat is predicted by inborn nephron deficit," *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**(8), 1399 (1998).

³⁰ A. Fassi, *et al.*, "Progressive glomerular injury in the MWF rat is predicted by inborn nephron deficit," *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**(8), 1399 (1998).

³¹ F. Fyhrquist and O. Saijonmaa, "Renin-angiotensin system revisited," *J. Intern. Med.* **264**(3), 224 (2008).

³² P. Gakunga, *et al.*, "Hyaluronan is a prerequisite for ductal branching morphogenesis," *Development.* **124**(20), 3987 (1997).

Ref Type: Journal

³³ T. Gilbert, M. Lelievre-Pegorier, and C. Merlet-Benichou, "Immediate and long-term renal effects of fetal exposure to gentamicin," *Pediatr. Nephrol.* **4**(4), 445 (1990).

³⁴ C. A. Griffin, *et al.*, "Ontogenic expression of renal and hepatic angiotensin II receptor genes in the rat," *Nephron.* **76**(1), 103 (1997).

³⁵ C. E. Grim, *et al.*, "Effects of sodium loading and depletion in normotensive first-degree relatives of essential hypertensives," *J. Lab Clin. Med.* **94**(5), 764 (1979).

³⁶ J. Grond, *et al.*, "Analysis of renal structural and functional features in two rat strains with a different susceptibility to glomerular sclerosis," *Lab Invest* **54**(1), 77 (1986).

³⁷ G. Guron and P. Friberg, "An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development," *J. Hypertens.* **18**(2), 123 (2000).

³⁸ G. Guron, *et al.*, "Postnatal time frame for renal vulnerability to enalapril in rats," *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**(7), 1550 (1999).

³⁹ A. C. Guyton, *et al.*, "Systems analysis of arterial pressure regulation and hypertension," *Ann. Biomed. Eng* **1**(2), 254 (1972).

⁴⁰ H. Hackbarth, *et al.*, "Distribution of glomeruli in the renal cortex of Munich Wistar Fromter (MWF) rats," *Ren Physiol* **6**(2), 63 (1983).

⁴¹ I. Hamming, *et al.*, "The emerging role of ACE2 in physiology and disease," *J. Pathol.* **212**(1), 1 (2007).

⁴² G. B. Haycock, "Development of glomerular filtration and tubular sodium reabsorption in the human fetus and newborn," *Br. J. Urol.* **81 Suppl 2**, 33 (1998).

⁴³ H. Hellmann, J. M. Davis, and K. Thurau, "Glomerulus number and blood pressure in the Prague hypertensive rat," *Kidney Int. Suppl* **67**, S211-S212 (1998).

⁴⁴ K. F. Hilgers, V. F. Norwood, and R. A. Gomez, "Angiotensin's role in renal development," *Semin. Nephrol.* **17(5)**, 492 (1997).

⁴⁵ M. F. Horster, G. S. Braun, and S. M. Huber, "Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation," *Physiol Rev.* **79(4)**, 1157 (1999).

⁴⁶ W. E. Hoy, *et al.*, "Nephron number, glomerular volume, renal disease and hypertension," *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **17(3)**, 258 (2008).

⁴⁷ W. E. Hoy, *et al.*, "Quantifying the excess risk for proteinuria, hypertension and diabetes in Australian Aborigines: comparison of profiles in three remote communities in the Northern Territory with those in the AusDiab study," *Aust. N. Z. J. Public Health* **31(2)**, 177 (2007).

⁴⁸ K. L. Hudkins, *et al.*, "Osteopontin expression in fetal and mature human kidney," *J. Am. Soc. Nephrol.* **10(3)**, 444 (1999).

⁴⁹ M. Hughson, *et al.*, "Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight," *Kidney Int.* **63(6)**, 2113 (2003).

⁵⁰ D. P. Hyink and D. R. Abrahamson, "Origin of the glomerular vasculature in the developing kidney," *Semin. Nephrol.* **15(4)**, 300 (1995).

⁵¹ B. E. Iordache, *et al.*, "Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular capillary wall ultrastructure in MWF/Ztm rats," *J. Am. Soc. Nephrol.* **5(6)**, 1378 (1994).

⁵² Hackbarth H Kaufmann K, "Quantitative comparative investigations into the regulation of glomerular numbers in Munich–Wistar–Froter rats and Wistar cryptorchid rats [in German].," *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 1990; 265-304. (90 A.D.).

⁵³ G. Keller, *et al.*, "Nephron number in patients with primary hypertension," *N. Engl. J. Med.* **348**(2), 101 (2003).

⁵⁴ S. K. Kim, J. Y. Kwon, and T. J. Nam, "Involvement of ligand occupancy in Insulin-like growth factor-I (IGF-I) induced cell growth in osteoblast like MC3T3-E1 cells," *Biofactors.* **29**(4), 187 (2007).

⁵⁵ R. Kreutz, *et al.*, "Effect of high NaCl diet on spontaneous hypertension in a genetic rat model with reduced nephron number," *J. Hypertens.* **18**(6), 777 (2000).

⁵⁶ M. Krop and A. H. Danser, "Circulating versus tissue renin-angiotensin system: on the origin of (pro)renin," *Curr. Hypertens. Rep.* **10**(2), 112 (2008).

⁵⁷ S. C. Langlely and A. A. Jackson, "Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets," *Clin. Sci. (Lond)* **86**(2), 217 (1994).

⁵⁸ D. P. LeBrun, R. A. Warnke, and M. L. Cleary, "Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis," *Am. J. Pathol.* **142**(3), 743 (1993).

⁵⁹ R. S. Levine, C. H. Hennekens, and M. J. Jesse, "Blood pressure in prospective population based cohort of newborn and infant twins," *BMJ* **308**(6924), 298 (1994).

⁶⁰ F. C. Luft, "Hypertensive nephrosclerosis-a cause of end-stage renal disease?," *Nephrol. Dial. Transplant.* **15**(10), 1515 (2000).

⁶¹ F. C. Luft, "Hypertensive nephrosclerosis: update," *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **13**(2), 147 (2004).

⁶² H. S. Mackenzie and B. M. Brenner, "Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension?," *Am. J. Kidney Dis.* **26**(1), 91 (1995).

⁶³ H. S. Mackenzie, E. V. Lawler, and B. M. Brenner, "Congenital oligonephropathy: The fetal flaw in essential hypertension?," *Kidney Int. Suppl* **55**, S30-S34 (1996).

⁶⁴ R. Manalich, *et al.*, "Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study," *Kidney Int.* **58**(2), 770 (2000).

⁶⁵ C. Merlet-Benichou, *et al.*, "Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat," *Pediatr. Nephrol.* **8**(2), 175 (1994).

⁶⁶ J. J. Mullins, J. Peters, and D. Ganten, "Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene," *Nature.* **344**(6266), 541 (1990).

⁶⁷ G. Nguyen and A. H. Danser, "Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents," *Exp. Physiol* **93**(5), 557 (2008).

⁶⁸ H. Nishimura and I. Ichikawa, "What have we learned from gene targeting studies for the renin angiotensin system of the kidney?," *Intern. Med.* **38**(4), 315 (1999).

⁶⁹ V. F. Norwood, *et al.*, "Differential expression of angiotensin II receptors during early renal morphogenesis," *Am. J. Physiol* **272**(2 Pt 2), R662-R668 (1997).

⁷⁰ V. F. Norwood, *et al.*, "Novel expression and regulation of the renin-angiotensin system in metanephric organ culture," *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **279**(2), R522-R530 (2000).

⁷¹ J. R. Nyengaard and T. F. Bendtsen, "Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man," *Anat. Rec.* **232**(2), 194 (1992).

⁷² S. Okubo, *et al.*, "Angiotensinogen gene null-mutant mice lack homeostatic regulation of glomerular filtration and tubular reabsorption," *Kidney Int.* **53**(3), 617 (1998).

⁷³ B. J. Padanilam, D. R. Martin, and M. R. Hammerman, "Insulin-like growth factor I-enhanced renal expression of osteopontin after acute ischemic injury in rats," *Endocrinology.* **137**(5), 2133 (1996).

⁷⁴ M. Paul, Mehr A. Poyan, and R. Kreutz, "Physiology of local renin-angiotensin systems," *Physiol Rev.* **86**(3), 747 (2006).

⁷⁵ M. Pohl, *et al.*, "Role of hyaluronan and CD44 in in vitro branching morphogenesis of ureteric bud cells," *Dev. Biol.* **224**(2), 312 (2000).

⁷⁶ L. Raij, S. Azar, and W. F. Keane, "Role of hypertension in progressive glomerular immune injury," *Hypertension* **7**(3 Pt 1), 398 (1985).

⁷⁷ M. K. Raizada and J. F. Paton, "Recent advances in the renin-angiotensin system: angiotensin-converting enzyme 2 and (pro)renin receptor," *Exp. Physiol.* **93**(5), 517 (2008).

⁷⁸ W. D. Rees, *et al.*, "The effects of maternal protein restriction on the growth of the rat fetus and its amino acid supply," *Br. J. Nutr.* **81**(3), 243 (1999).

⁷⁹ A. Remuzzi, *et al.*, "Pathophysiologic implications of proteinuria in a rat model of progressive glomerular injury," *Lab Invest* **67**(5), 572 (1992).

⁸⁰ A. Remuzzi, *et al.*, "Angiotensin converting enzyme inhibition ameliorates glomerular filtration of macromolecules and water and lessens glomerular injury in the rat," *J. Clin. Invest* **85**(2), 541 (1990).

⁸¹ A. Remuzzi, *et al.*, "Sex related differences in glomerular ultrafiltration and proteinuria in Munich-Wistar rats," *Kidney Int.* **34**(4), 481 (1988).

⁸² S. A. Rogers, *et al.*, "Metanephric osteopontin regulates nephrogenesis in vitro," *Am. J. Physiol.* **272**(4 Pt 2), F469-F476 (1997).

⁸³ L. Rothermund, *et al.*, "Genetic low nephron number hypertension is associated with dysregulation of the hepatic and renal insulin-like growth factor system during nephrogenesis," *J. Hypertens.* **24**(9), 1857 (2006).

⁸⁴ G. Rovira-Halbach, *et al.*, "Single nephron hyperfiltration and proteinuria in a newly selected rat strain with superficial glomeruli," *Ren Physiol* **9**(6), 317 (1986).

⁸⁵ K. Sandberg and H. Ji, "Comparative analysis of amphibian and mammalian angiotensin receptors," *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol.* **128**(1), 53 (2001).

⁸⁶ R. A. Santos, A. J. Ferreira, and Simoes E Silva AC, "Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis," *Exp. Physiol* **93**(5), 519 (2008).

⁸⁷ G. R. Screaton, *et al.*, "Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**(24), 12160 (1992).

⁸⁸ M. G. Seikaly, B. S. Arant, Jr., and F. D. Seney, Jr., "Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat," *J. Clin. Invest* **86**(4), 1352 (1990).

⁸⁹ S. Shanmugam, *et al.*, "Expression of angiotensin II AT2 receptor mRNA during development of rat kidney and adrenal gland," *Am. J. Physiol* **268**(5 Pt 2), F922-F930 (1995).

⁹⁰ N. Sheibani, *et al.*, "Bcl-2 expression modulates cell adhesion and migration promoting branching of ureteric bud cells," *J. Cell Physiol.* **210**(3), 616 (2007).

⁹¹ K. Skov, *et al.*, "Number and size of renal glomeruli in spontaneously hypertensive rats," *J. Hypertens.* **12**(12), 1373 (1994).

⁹² M. J. Soler, J. Wysocki, and D. Batlle, "Angiotensin-converting enzyme 2 and the kidney," *Exp. Physiol* **93**(5), 549 (2008).

⁹³ C. M. Sorenson, *et al.*, "Fulminant metanephric apoptosis and abnormal kidney development in bcl-2-deficient mice," *Am. J. Physiol.* **268**(1 Pt 2), F73-F81 (1995).

⁹⁴ U. M. Steckelings, *et al.*, "Differential expression of angiotensin receptors in human cutaneous wound healing," *Br. J. Dermatol.* **153**(5), 887 (2005).

⁹⁵ R. B. Sterzel, *et al.*, "Renal disease and the development of hypertension in salt-sensitive Dahl rats," *Kidney Int.* **33**(6), 1119 (1988).

⁹⁶ R. O. Stuart, K. T. Bush, and S. K. Nigam, "Changes in gene expression patterns in the ureteric bud and metanephric mesenchyme in models of kidney development," *Kidney Int.* **64**(6), 1997 (2003).

⁹⁷ H. Tauchi, K. Tsuboi, and J. Okutomi, "Age changes in the human kidney of the different races," *Gerontologia.* **17**(2), 87 (1971).

⁹⁸ C. Tikellis, *et al.*, "Developmental expression of ACE2 in the SHR kidney: a role in hypertension?," *Kidney Int.* **70**(1), 34 (2006).

⁹⁹ A. S. Tucker, *et al.*, "Conserved regulation of mesenchymal gene expression by Fgf-8 in face and limb development," *Development.* **126**(2), 221 (1999).

¹⁰⁰ A. Tufro-McReddie, *et al.*, "Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development," *Am. J. Physiol.* **269**(1 Pt 2), F110-F115 (1995).

¹⁰¹ V. M. Vehaskari, D. H. Aviles, and J. Manning, "Prenatal programming of adult hypertension in the rat," *Kidney Int.* **59**(1), 238 (2001).

¹⁰² A. Verhulst, *et al.*, "Crystal retention capacity of cells in the human nephron: involvement of CD44 and its ligands hyaluronic acid and osteopontin in the transition of a crystal binding- into a nonadherent epithelium," *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**(1), 107 (2003).

¹⁰³ A. Verhulst, *et al.*, "Osteopontin synthesis and localization along the human nephron," *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**(5), 1210 (2002).

¹⁰⁴ A. Weller, *et al.*, "Development and growth of mouse embryonic kidney in organ culture and modulation of development by soluble growth factor," *Dev. Biol.* **144**(2), 248 (1991).

¹⁰⁵ E. M. Wintour, *et al.*, "Programming the cardiovascular system, kidney and the brain--a review," *Placenta* **24 Suppl A**, S65-S71 (2003).

¹⁰⁶ G. Wolf, "Angiotensin II and tubular development," *Nephrol. Dial. Transplant.* **17 Suppl 9**, 48 (2002).

¹⁰⁷ L. L. Woods, *et al.*, "Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats," *Pediatr. Res.* **49**(4), 460 (2001).

¹⁰⁸ L. L. Woods and R. Rasch, "Perinatal ANG II programs adult blood pressure, glomerular number, and renal function in rats," *Am. J. Physiol* **275**(5 Pt 2), R1593-R1599 (1998).

¹⁰⁹ Z. Xie, M. Singh, and K. Singh, "ERK1/2 and JNKs, but not p38 kinase, are involved in reactive oxygen species-mediated induction of osteopontin gene expression by angiotensin II and interleukin-1beta in adult rat cardiac fibroblasts," *J. Cell Physiol.* **198**(3), 399 (2004).

¹¹⁰ R. J. Young, *et al.*, "Glomerular size and glomerulosclerosis in Australian aborigines," *Am. J. Kidney Dis.* **36**(3), 481 (2000).

¹¹¹ R. Zent, *et al.*, "Involvement of laminin binding integrins and laminin-5 in branching morphogenesis of the ureteric bud during kidney development," *Dev. Biol.* **238**(2), 289 (2001).

¹¹² R. Zohar, *et al.*, "Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration," *J. Cell Physiol.* **184**(1), 118 (2000).

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
ACE2	Angiotensin-Konversionsenzym 2
AngII	Angiotensin II
Agt	Angiotensinogen
AT1	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT1a	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1a
AT1b	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1b
AT2	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
Bcl-2	Bcl-2 Protoonkogen
CAM	<i>Cell adhesion molecule</i>
CD44	CD44-Rezeptor
Ct-Wert	<i>Cycle threshold</i> , Zyklusschwellenwert
D(x)	Postnataler Tag x
E(x)	Embryonaltag x
ECM	Extrazelluläre Matrix
FAM	<i>Reporter-Farbstoff</i> (Fluoreszein-Derivat)
FGF	<i>Basic fibro-blast growth factor</i>
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GF	<i>Growth factor</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HA	Hyaluronsäure
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HT	Hypertonus
IGF-I, -II	<i>Insulin-like growth factor-I, -II</i>
IGFBP-3	<i>Insulin-like growth factor binding protein 3</i>
IGF-System	<i>Insulin-like growth factor-System</i>
Itga5	Integrinkette alpha(v)
Kf	Ultrafiltrationskoeffizient
MET	Mesenchymal-epithelialer Übergang
MM	Metanephrogenes mesenchymales Blastem/ Metanephritisches Mesenchym/ Blastem
OPN	Osteopontin
OPN-CD44-Integrinrezeptor-System	Osteopontin-CD44-Rezeptor-alpha(v)beta(3)- Integrinrezeptor-System
PCR	Polymerasekettenreaktion
P _{GC}	Intraglomerulärer Druck
RGD Sequenz	Peptidsequenz Arginin-Glycin-Aspartate ()
RAS	Renin-Angiotensin-System
RATPCR	Quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion
RPF	Renaler Plasmafluß
SNGFR	Einzelnephron-GFR
SSW	Schwangerschaftswoche
TAMRA	<i>Quencher-Farbstoff</i> (Rhodamin-Derivat)
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
UB	Ureterknospe (UB)
Urnierengang	Wolff-Gang, mesonephritischer Gang

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Anne Lena Freese, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Identifikation embryonaler Regulationsmechanismen der Oligonephronie – Ontogenese des arteriellen Hypertonus und der progressiven Niereninsuffizienz“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 07.12.2009

Anne Lena Freese

10 Danksagung

Bei Herrn PD Dr. med. Lars Rothermund möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Geduld bedanken, die er über die lange Zeit der Betreuung mit mir gehabt hat.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz für seine Unterstützung und seine freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie am Campus Benjamin Franklin der Charité bedanken, ohne die der experimentelle Teil der Arbeit nicht zu bewältigen gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt weiterhin Herrn Dr. rer. nat. Markus Wehland- von Trebra, ohne dessen fortwährende, niemals ermüdende, weitläufige und tatkräftige Unterstützung ein Vorankommen der Arbeit in gleicher Weise nicht möglich gewesen wäre.

Großer Dank gilt auch Herrn Marc Nierhaus, Frau Dr. rer. medic. Angela M. Schulz, Frau Heike Marquardt, Herrn Norbert Wendt, Frau Dr.med.Juliane Bolbrinker und Frau Dr. med. Marlene Kneifel für Ihre spontane Hilfe und aufmunternden Worte.

Mein größter Dank gilt aber meiner Familie, die mir immer ein Rückhalt war und ist. Sie hat mir alles ermöglicht.

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.