

**Aus der Klinik für Innere Medizin  
Endokrinologie und Nephrologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin**

**DISSERTATION**

**Bedeutung des renalen IGF-Systems für einen  
angeborenen Nephronmangel im MWF-Rattenstamm**

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

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin**

**von**

**Susanne Mieschel  
aus Neuruppin**

Gutachter: 1. PD Dr. med. L. Rothermund

2. PD Dr. med. J. Beige

3. Prof. Dr. med. H. Peters

Datum der Promotion: 20.11.2009

**meiner Mutter**

---

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1. Niere, Nephronanzahl und arterieller Hypertonus - Stand der Forschung	1
1.2. Nephrogenese	4
1.3. Regulationsmechanismen der Nephrogenese	6
1.3.1. Genregulation	6
1.3.2. Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrixproteine	7
1.3.3. Prostaglandine und das RAS-System	7
1.4. IGF, IGF-Rezeptoren, IGFBP	8
1.4.1. Historischer Überblick	8
1.4.2. Überblick über das IGF- System	9
1.4.3. Interaktionen zwischen IGF's und IGFBP	10
1.4.4. Intrauterine Mangelentwicklung und IGF-System	12
1.5. Tiermodell	14
2. Ziele	15
3. Material und Methoden	16
3.1. Tierhaltung	16
3.2. Organentnahme	16
3.3. Gewichtsmessungen	16
3.4. Materialien	17
3.5. Messung von Systolischer Blutdruck, Gewicht des linken Ventrikels, Nierengewicht, Harnvolumen, Kreatininclearance, Albuminexkretion im Urin am Tag D 70 post partum	18
3.5.1. Bestimmung von Harnvolumen, Kreatininclearance und Albuminexkretion	18
3.5.2. Messung des systolischen Blutdrucks	18
3.6. IGF-I Immunhistochemie	19
3.7. IGF-II Immunhistochemie	20
3.8. IGF-I-R Immunhistochemie	20
3.9. IGFBP-1 und -3 Immunhistochemie	21
3.10. Quantifizierung	22
3.11. Statistische Analyse	22

4. Ergebnisse	24
4.1. Systolischer Blutdruck, Gewicht des linken Ventrikels, Nierengewicht, Harnvolumen, Kreatininclearance, Albuminexkretion im Urin am Tag D 70 post partum	24
4.2. Gewichte	24
4.2.1. Körpergewicht	24
4.2.2. Plazentagewicht	25
4.2.3. Nierengewicht	25
4.3. Immunhistologischer Nachweis des renalen IGF-I	26
4.4. Immunhistologischer Nachweis des renalen IGF-II	29
4.5. Immunhistologischer Nachweis des renalen IGF-I-R	32
4.6. Immunhistologischer Nachweis des renalen IGFBP-1	33
4.7. Immunhistologischer Nachweis des renalen IGFBP-3	35
5. Diskussion	
5.1. Brenner-Barker-Hypothese und Tiermodell	38
5.2. Bedingungen in utero	39
5.3. IGF-I und IGF-II	42
5.3.1. IGF-I	42
5.3.2. IGF-II	44
5.4. IGF-I-R	45
5.5. IGFBP-1	47
5.6. IGFBP-3	48
5.7. Fehlerdiskussion	49
6. Zusammenfassung und Perspektiven	51
7. Literaturverzeichnis	53
8. Abkürzungsverzeichnis	60
9. Veröffentlichung	61
10. Danksagungen	62
11. Eidesstattliche Erklärung	63
12. Tabellarischer Lebenslauf	64

## 1. Einleitung

### 1.1. Niere, Nephronanzahl und arterieller Hypertonus – Stand der Forschung

Die klinische Erfahrung zeigt, dass sich bei bis zu 95% aller Hypertoniker keine Ursache des arteriellen Bluthochdrucks diagnostizieren lässt [50]. Die Pathogenese der „essentiellen“ Hypertonie ist trotz zahlreicher Hypothesen ungeklärt. Das Spektrum der möglichen Pathomechanismen umfasst sowohl extrarenale Faktoren (wie Überaktivität des Sympathischen Nervensystems [49], zirkulierende  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase Hemmstoffe [11] und Mangel an zirkulierenden Vasodepressoren [81]) als auch renale Ursachen (wie intrarenale Ischämie [28], verminderte Drucknatriurese [32], heterogene Aktivierung des Renin-Angiotensin Systems (RAS) [99], einen genetischen Defekt der Natriumexkretion [63], gesteigerte glomerulotubuläre Balance [56] und eine genetisch oder erworben verminderte Anzahl von Nephronen [13; 78] ).

Der arterielle Hypertonus ist einer der wesentlichen Risikofaktoren kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität. Darüber hinaus ist er nicht nur Ursache und Folge einer chronischen Niereninsuffizienz, sondern auch der Hauptprogressionsfaktor der chronischen Nierenerkrankung [55; 98].

Die Niere spielt eine zentrale Rolle in der Blutdruckregulation. Der Nephronmangel ist durch verschiedene aktuelle Studien als möglicher Pathomechanismus der essentiellen Hypertonie in den Vordergrund gerückt.

Bereits 1988 beschrieben Brenner *et al.*, dass eine umgekehrte Abhängigkeit zwischen der reduzierten Nephronenzahl zum Zeitpunkt der Geburt und der Manifestation eines essentiellen arteriellen Hypertonus besteht und sich damit ein unabhängiger Risikofaktor für die Manifestation des primären Hypertonus darstellt [13]. Barker *et al.* zeigten, dass ein niedriges Geburtsgewicht mit einem erhöhten Risiko für die Manifestation eines arteriellen Hypertonus und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen oder Risikofaktoren (KHK, Diabetes mellitus Typ2) einhergeht [6]. Der kongenitale Nephronmangel ist also möglicherweise ein entscheidender pathogenetischer Faktor der essentiellen Hypertonie. Sie führt zu anhaltend hohen glomerulären Kapillardrücken, die eine Hyperfiltration zur Folge haben und damit das Auftreten einer fokal-segmentalen Glomerulosklerose sowie die Entwicklung eines Hypertonus fördern. Zudem kommt es in Folge dessen zu einem Absterben weiterer Nephrone [71; 72]. Dieser Mechanismus findet sich mit Proteinurie und Glomerulosklerose auch bei Patienten nach ausgedehnter Nierenresektion im Rahmen der Tumor- oder Traumatologie [93].

Der Zusammenhang zwischen einer niedrigen Nephronanzahl und dem essentiellen Hypertonus wurde von Keller *et al.* bestätigt. Sie führten Untersuchungen an zehn erwachsenen Unfallopfern mit essentiellen arteriellem Hypertonus durch. Sie konnten zeigen, dass Patienten mit primärem arteriellem Hypertonus 50% weniger Glomeruli pro Niere hatten als die Kontrollgruppe. Ausserdem zeigte sich in dieser Gruppe ein signifikant erhöhtes glomeruläres Volumen [52].

In einer kubanischen Autopsiestudie wurden bei 35 Neugeborenen die Glomerula gezählt. Es fanden sich weniger, jedoch vergrößerte Glomerula in den Nieren Neugeborener mit niedrigem Geburtsgewicht. Dabei war die Korrelation zwischen Geburtsgewicht und Glomerulaanzahl sehr hoch [74].

Obwohl eine Beziehung zwischen niedrigem Geburtsgewicht und Nephronmangel gut belegt ist [74], gibt es hinsichtlich der von Osmond und Barker postulierten Beziehung zwischen Geburtsgewicht und Bluthochdruck (und einem ausgeprägten kardiovaskulären Risikoprofil) in erwachsenen Individuen noch keine ausreichenden Befunde [6].

In einer britischen Untersuchung an 3600 1946 in Großbritannien geborenen Menschen wurde bei einem Geburtsgewicht von  $> 4000$  g im Alter von 53 Jahren ein mittlerer systolischer Blutdruck von 136 mmHg und bei einem Geburtsgewicht  $< 2500$  g ein systolischer Blutdruck von im Mittel 143 mmHg nachgewiesen [37].

In Guytons Modell des *renal body fluid-pressure control system* gelten die Nieren als das zentrale Regulationsorgan des Langzeitblutdruckes [32]. Pathologische Funktionseinschränkungen der Niere führen nach diesem Konzept zu einer jeweils charakteristischen Nierenfunktionskurve, in der abhängig von der Natrium- und Wasserzufuhr nur ein bestimmter arterieller Blutdruck eine ausgeglichene Natrium- und Wasserbilanz ermöglicht.

Kreuztransplantationen von Nieren zwischen normotonen und hypertensiven Rattenstämmen zeigten, dass der Hypertonus von der Spenderniere abhängt. Die Bedeutung des Empfängerorganismus scheint in dieser Hinsicht irrelevant [10; 17]. Analoge Befunde wurden auch an nierentransplantierten Patienten erhoben [16].

Nach dem Guyton'schen-Modell kann man aus Brenners Hypothese folgern, dass ein Mangel an Nephronen über eine Abnahme der natriuretischen und diuretischen Kapazität zu einem langfristig erhöhten Hypertonus führt, um eine ausgeglichene Natrium- und Wasserbilanz zu ermöglichen. Eine experimentelle Reduktion des Nierengewebes erhöht

über den systemischen Blutdruckanstieg den glomerulären Kapillardruck, der zu einem Anstieg der glomerulären Filtrationsrate und damit zu einer ausgeglichenen Natrium- und Volumenbilanz führt [12]. Ebenso wird eine erhöhte Inzidenz für Hypertonie von Nierenlebenspendern beschrieben [34; 106 ; 112].

Die Hypothese Brenners wird unterstützt durch die Beobachtungen von Barker *et al.*, dass Individuen mit niedrigem Nierengewicht zum Zeitpunkt der Geburt im späteren Leben einen Hypertonus und kardiovaskuläre Erkrankungen entwickeln [6]. Im Gegensatz zu anderen Spezies (Tabelle 1) ist die Bildung der Nephrone beim Menschen mit der Geburt abgeschlossen [31].

Spezies	Gestationsdauer	Dauer der Nephrogenese
Maus	20 Tage	E11 bis D 5-8
Ratte	21 Tage	E12 bis D 8-14
Schwein	16 Wochen	E20 bis D 21-28
Mensch	40 Wochen	5 SSW bis 35-36 SSW

Abkürzungen: E: Embryonaltag; D: postnataler Tag; SSW: Schwangerschaftswoche

Tabelle 1. Gestationsdauer und Dauer der Nephrogenese in verschiedenen Spezies  
(Tabelle modifiziert nach Guron [31])

Die Anzahl der Nephrone in der Normalpopulation schwankt bei sonst unauffälligen Individuen zwischen 400.000 und über 1.100.000. Im Mittel liegt sie bei 600.000 [23]. Dies ist eine ungewöhnlich hohe Varianz im Vergleich zu anderen anthropometrischen Parametern in der Normalpopulation. Laut Brenners Hypothese haben die Individuen am unteren Ende dieser Normalverteilung ein besonders hohes Risiko einen essentiellen Hypertonus zu entwickeln, wohingegen die Individuen am oberen Ende der Verteilung eine gewisse Resistenz gegen das Auftreten eines Hypertonus und einer Nierenschädigung aufweisen [12].

Ein weiterer Parameter scheint ein niedriges Geburtsgewicht zu sein. Bedingt durch eine intrauterine Reifungsstörung geht es mit einer verminderten Nephronzahl einher. Dies lässt sich auch dann beobachten, wenn das Kind zum errechneten Termin geboren wird [42; 61; 74]. Niedriges Geburtsgewicht kann laut der Untersuchungen der letzten Jahre mit einem Hypertonus im Erwachsenenalter und möglicherweise sogar im Kindesalter assoziiert sein [6; 57; 62].

Welcher Art die spezifischen Regulationsstörungen der fetalen Nephrogenese sind, die zu einer angeborenen Reduktion von Nephronen, mit zunehmendem Alter zu einem Hy-



pertonus und schließlich zu einer progredienten Niereninsuffizienz führen, ist nicht geklärt. Es ist schwierig, die Brenner'sche Hypothese am Menschen direkt zu evaluieren, da es augenblicklich noch keine Methode zur spezifischen und sensitiven Bestimmung der Anzahl der Nephrone im lebenden Organismus gibt. Wir entschieden uns für die Untersuchung dieser Mechanismen an der MWF-Ratte, da diese eine starke kongenitale Oligonephronie aufweist.

## 1.2. Nephrogenese

Die meisten parenchymal-epithelialen Organe entwickeln sich nach einem gemeinsamen Schema. Ein epitheliales Blatt oder Tubus, das einem spezifischen Ursprungsgewebe entstammt, tritt in den Prozess der Knospung ein. Die Entwicklung der Nieren vollzieht sich bei höheren Wirbeltieren aus drei fetalen Strukturen. Zuerst wird die Vorniere, Pronephros, angelegt, anschliessend bildet sich die Urniere, Mesonephros, und zum Schluss die Nachniere, Metanephros (Abb. 1A). Alle drei Nierenanlagen entstehen aus dem intermediären Mesoderm, das die Nephrotome bildet. Diese Nephrotome bilden zusammen den nephrogenen Strang, der sich an der dorsalen Wand beidseits als Urogenitalleiste vorwölbt. Pronephros und Mesonephros sind nur vorübergehende Strukturen, die für die Harnbildung bei höheren Wirbeltieren funktionell keine Bedeutung haben. Die Nachniere, Metanephros entwickelt sich zur bleibenden Niere. Die Metanephrogenese (im Folgenden als Nephrogenese bezeichnet) beginnt beim Menschen im Gestationsalter von etwa 5 Wochen und wird *in utero* um die 36. Woche abgeschlossen. Bei Ratten beginnt die Nephrogenese am 12. Embryonaltag (E) und wird am 8.-14. Tag *post partum* abgeschlossen [31; 68] (Tabelle 1).

Die Nachniere entsteht aus zwei Ursprungsgeweben, dem metanephrogenen Gewebe und dem Urnierengang (Wolff-Gang, mesonephritischer Gang), während andere parenchymatöse Organe lediglich aus einem Ursprungsgewebe hervorgehen (Abbildungen 1A und B). Aus dem metanephrogenen Gewebe entstehen die Glomeruli, die proximalen und distalen Tubuli. Aus dem Urnierengang entwickeln sich der Ureter, das Nierenbecken und das Sammelrohrsystem [31; 69].

Der entscheidende Vorgang der Nephrogenese ist die koordinierte Induktion der Mesenchymalzellen des metanephritischen Blastems und der epithelialen Zellen der Ureterknospe. Am distalen Ende des Urnierengangs bildet sich kurz über der Einmündung in die Kloake eine Ureterknospe nach hinten oben aus. Diese wird länger und ihr Ende erweitert sich zu einem Bläschen. Aus dem Stiel entsteht der Ureter und aus dem Bläschen das Nierenbecken (Abb. 1A und C). Nachfolgend kommt es am Ende des Bläschens zur Entstehung von sechs Ausstülpungen, welche als Anlage der Nierenkelche dienen

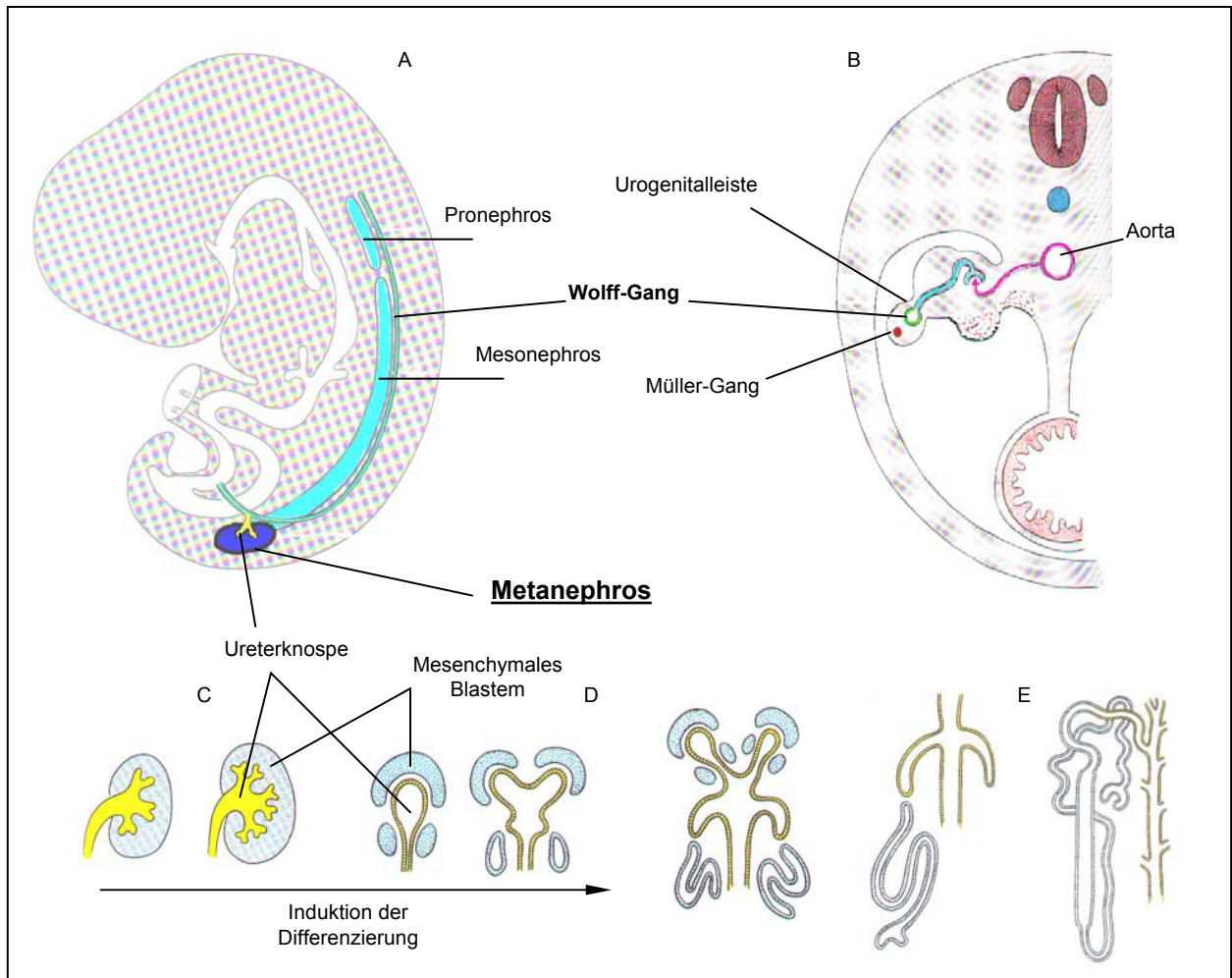


Abb. 1 Nephrogenese

zur Bowman-Kapsel (Abbildung 1E). Die Bildung neuer Nephrene erfolgt zentripetal. Die jüngsten Nephrene finden sich im äusseren Cortex der Niere [31; 69].

Parallel zur Nephrogenese erfolgt die renale Vaskularisierung zum Einen über das Einwachsen präexistenter extrarenaler Gefäße (Angiogenese) in die Bowmann-Kapsel (Abbildung 1B) und zum Anderen durch *in-situ* Bildung neuer Gefäße aus endothelialen Vorläuferzellen im metanephritischen Mesenchym (Vaskulogenese). Das Längenwachstum setzt sich fort und es bilden sich aus dem Tubulus die einzelnen Abschnitte des Nephrons (Abbildung 1E). Wachstum und Reifung der Niere sind bei der Ratte zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht abgeschlossen und 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 sechs Wochen 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.

### 1.3. Regulationsmechanismen der Nephrogenese

#### 1.3.1. Genregulation

Genetische Faktoren haben mit großer Wahrscheinlichkeit einen direkten Einfluß auf die Anzahl der Nephrone zum Zeitpunkt der Geburt und der Manifestation einer arteriellen Hypertonie [20]. Epidemiologische Untersuchungen zeigen, dass einige ethnische Gruppen mit erhöhter Inzidenz für das Auftreten eines Hypertonus weniger Nephrone bzw. kleinere Nieren im Verhältnis zum Körpergewicht aufweisen. So findet man in Japan bei hoher Inzidenz für Hypertonus [104] im Durchschnitt kleinere Nieren als in anderen Nor-

Transkriptionsfaktoren	Literatur
Wilms-Tumor-Suppressor-Gen (WT-1)	44
Bcl 2	40
c-myc	40
Pax-2 (Paired box gen 2)	44
Wnt-4	102
Bmp-7	70
Bf-2 Gen	38
Homeobox (Hox) Genfamilie	88
N-myc Gen	80
C-ret	44
C-ros	101

Tabelle 2 Beispiele für Transkriptionsfaktoren mit Einfluss auf die Nephrogenese

malpopulationen [105]. Auch bei Afro-Amerikanern sind die Nieren durchschnittlich kleiner als bei Kaukasiern und es tritt häufiger ein salz-sensitiver Hypertonus auf [68].

Tabelle 2 zeigt einige Beispiele für Transkriptionsfaktoren mit Einfluss auf die Nephrogenese bzw. die Entstehung eines arteriellen Hypertonus.

### **1.3.2. Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrix**

Neben den Transkriptionsfaktoren haben Wachstumsfaktoren (GF) eine zentrale Bedeutung in der Nephrogenese. Sie bewirken eine Stimulation der Mitose, Migration, Induktion, Differenzierung, Polarisierung, Proliferation und Apoptose. Der Einfluss der verschiedenen Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren bei der Regulation der Organogenese wird in ihrer großen Komplexität bei weitem noch nicht verstanden. Die am besten untersuchten Wachstumsfaktoren der Nephrogenese sind der *Insulin-like Growth Factor* (IGF)-I und -II, *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), *Transforming Growth Factor* (TGF)- $\beta$  und *Basic fibroblast Growth Factor* (FGF). Neben den genannten beeinflussen noch weitere Wachstumsfaktoren die Organogenese der Niere.

In Zellkultur-Experimenten reagieren epitheliale embryonale Nierenzellen sehr unterschiedlich auf spezifische Wachstumsfaktoren. Synergistische Effekte zwischen verschiedenen Wachstumsfaktoren-Familien scheinen eine große Bedeutung zu haben [44]. Noch nicht induziertes metanephritisches Mesenchym reagiert auf keinen der o.g. Wachstumsfaktoren mit einer Tubulogenese [113]. Diese Beobachtung führte zu der Schlussfolgerung, dass nicht nur Interaktionen der verschiedenen Wachstumsfaktoren, 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 Wachstumsfaktoren am besten untersucht [24; 44]. Osteopontin (OPN) ist ein bekannter Mediator entzündlicher Prozesse der renalen Extrazellulären Matrix (ECM) Proteine. Eine OPN-Integrin Interaktion scheint für die Tubulogenese wichtig zu sein. Darüber hinaus hat OPN anti-apoptotische Wirkungen während der Kondensationsphase im metanephritischen Blastem [90]. Es ist bisher nicht untersucht, welche Bedeutung die Expression von ECM Proteinen auf die Anzahl von gebildeten Nephronen hat.

### **1.3.3. Prostaglandine und Renin-Angiotensin-System**

Alle Komponenten des Renin-Angiotensin System (RAS) werden während der Nephrogenese stark exprimiert. Welche Relevanz die Aktivität des RAS und des Prostaglandin Systems für den kongenitalen Nephronmangel hat, ist bisher nicht ausreichend bekannt.

In Zellkulturexperimenten zeigte sich Prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) als ein essentieller Faktor für das Wachstum und die Differenzierung der *Metanephroi* [1]. Während der Gestationsperiode führte bei Mäusen und Ratten die Behandlung mit einem selektiven Hemmstoff der Prostaglandinsynthese, speziell der Cyklooxygenase-2 (Cox-2), nicht jedoch der Cyklooxygenase-1 (Cox-1), zu einer gestörten Bildung des Nierencortex sowie kleineren Glomerula bei den Nachkommen [53].

Eine ACE-Hemmung oder AT<sub>1</sub>-Rezeptor Blockade während der Nephrogenese führte zu ausgeprägten morphologischen Veränderungen der Nieren, die auch nach Beenden der Behandlung fortbestehen. Es kommt dabei zur Atrophie der Papillen, Erweiterung des Nierenbeckens, tubulärer Atrophie und Dilatation. Die Glomerula erscheinen histologisch unauffällig. [31; 84; 87; 88; 89].

## 1.4. Das IGF-System

### 1.4.1. Historischer Überblick

Salmon und Daughady entdeckten 1958, dass das Knorpelwachstum bei Ratten durch einen Serumfaktor stimuliert wird [108]. Zunächst wurde dieser Faktor als Sulfatfaktor bezeichnet, welchen man in der extrazellulären Matrix mittels radioaktiv markierten Sulfats detektierte. Später wurde dieser Faktor mit dem Namen Somatomedin C belegt und schließlich als IGF-I bezeichnet. In den frühen siebziger Jahren beobachteten Pierson und Temin bei der Rattenleber in Zellkulturen eine eigene vermehrungsstimulierende Aktivität, der sie eine mögliche Stimulation der Zellteilung zuschrieben [85]. Die Bezeichnung „insulinähnlicher Wachstumsfaktor“ wurde 1986 festgelegt, um die Verbindungen zum Insulin und die wachstumsfördernde Wirkung deutlich zu machen. Die Struktur der IGF war bereits Ende der siebziger Jahre erforscht.

Mitte der siebziger Jahre wurde ein Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität entdeckt, der mit dem Insulinrezeptor nicht identisch war. Er ist in der Lage, jodiertes IGF zu binden. Hierbei handelte es sich um den IGF-I-R. 1980 wurde neben dem Insulinrezeptor und dem IGF-I-R ein dritter Rezeptor beschrieben, der vor allem mit IGF-II interagiert. Dabei handelt es sich um den IGF-II-R, der auch als Mannose-6-Phosphat- Rezeptor wirkt [46]. Ebenfalls Mitte der siebziger Jahre entdeckte man Serumproteine, die in der Lage sind, IGF zu binden und zu transportieren. Sie wurden als IGF-Bindungsproteine (IGFBP) bezeichnet. Ihnen wurden zwei Funktionen zugeschrieben:

1. die Verlängerung der Halbwertszeit des zirkulierenden IGF
2. die Neutralisierung ihrer metabolischen Effekte [46].

### 1.4.2. Überblick über das IGF- System

Das IGF-System ist gut untersucht. Es wurde eine ausgeprägte Wirkung auf Wachstum und Differenzierung gesunder und maligner Zellen beschrieben. Dieses System zählt zu den wichtigsten Faktoren des fetalen Wachstums und der Nierenentwicklung. Zu den Bestandteilen werden die insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF-I, IGF-II), deren Rezeptoren vom Typ 1 und 2 (IGF-I-R, IGF-II-R), die Bindungsproteine (IGFBP 1-6) und die Proteasen der Bindungsproteine gerechnet.

IGF-I und IGF-II sind proinsulin-ähnliche Peptide, die zu den Wachstumshormonen zählen. Es handelt sich um zentrale Effektorproteine, die unter anderem in der Leber gebildet werden [35; 103]. Darüber hinaus werden IGF-I und -II in sich entwickelnden Organen und auch in der Niere während der Nephrogenese exprimiert [65; 66; 92]. Im strukturellen Aufbau ähneln IGF-I und -II dem Insulin. IGF-I ist ein monomeres Protein bestehend aus 80 Aminosäuren. IGF-II, ebenfalls ein monomeres Protein, besteht aus 68 Aminosäuren. IGF-I und -II sind zu rund 80% identisch. Des Weiteren sind die A- und B- Domänen der IGF zu 50% identisch mit den A- und B- Domänen des humanen Insulins [46 ].

Man geht davon aus, dass die endokrinen Effekte dem zirkulierenden IGF-I zuzuschreiben sind. Das Vorhandensein von IGF-I und IGF-II, ihren Rezeptoren und Bindungsproteinen in den verschiedenen histologischen Strukturen der Niere ist ein Hinweis auf ihre autokrinen, parakrinen und endokrinen Funktionen [19; 26; 46; 96]. Im Kontext der kongenitalen Oligonephronie und der Genese des essentiellen Hypertonus könnten die IGF deshalb eine große Bedeutung haben [7; 111].

IGF-I und IGF-II werden sowohl in adulten als auch embryonalen Nieren gebildet. Für IGF-I postulierten Hammerman *et al.* einen Einfluss auf renale Transportprozesse, metabolische Vorgänge und das Wachstum der embryonalen Niere [35]. Darüber hinaus identifizierte er sie zusätzlich als Apoptosehemmer, die eine Vielzahl von Funktionen in hochdifferenzierten Zellen vermitteln. Diese Wirkungen werden zum grossen Teil über den IGF-I-Rezeptor vermittelt [8]. Weiterhin werden den IGF angiogenetische Einflüsse in Verbindung mit der Entwicklung der Glomeruli zugeschrieben [48].

Zu den Funktionen der IGF-Rezeptoren zählt neben der Bindung der IGF auch die Bindung des Insulins, wenn auch mit geringerer Affinität. Alle drei Rezeptoren besitzen eine Tyrosinkinaseaktivität und ähneln sich in ihrer Struktur. Ihre Aktivierung erfolgt durch Bindung spezifischer Liganden [22; 103].

Bisher wurden in den *Metanephroi* drei Insulinrezeptoren nachgewiesen: der eigentliche Insulinrezeptor, der IGF-I-R und der IGF-II-R, welcher auch als Mannose-6-Phosphat-Rezeptor wirkt. Der IGF-I-R wird während der gesamten Nephrogenese ubiquitär exprimiert, während der Insulinrezeptor in den späteren Entwicklungsstadien der Nierenreifung mit einer erhöhten Expression in den proximalen Tubuli auftritt. Der IGF-II-/ Mannose-6-Phosphat- Rezeptor ist zu Beginn der Nephrogenese hochreguliert und fällt in den späten Entwicklungsstadien rasch ab [22]. Im Nabelschnurserum bleibt seine Konzentration während der gesamten Gestationsperiode konstant [84].

Nach dem heutigen Stand der Forschung existieren sechs IGFBP. Sie besitzen eine hohe Bindungsaffinität zu beiden IGF. Sie treten ubiquitär bei Säugetieren und anderen Lebewesen auf. In vielen Fällen konnten bereits die cDNA und die entsprechenden Gene geklont und charakterisiert werden [46]. Die IGFBP haben sowohl stimulierende als auch hemmende Wirkungen auf die IGF. Stimulierende Effekte wurden vor allem für IGFBP-1, -4 und -5 beobachtet. Inhibitorische Einflüsse auf die Rezeptoraktivierung zeigen dagegen alle 6 Bindungsproteine, was als ihre Hauptfunktion angenommen wird [8].

Die IGFBP werden anhand dreier Grundeigenschaften zu einer Familie zusammengefasst. Erstens besitzen sie strukturelle Ähnlichkeiten. Sie bestehen aus drei Domänen, von denen zwei cysteinreich sind. Es wurden ein N-terminales Drittel (zwölf Cysteine in den IGFBP-1 bis -5, zehn im IGFBP-6) und ein C-terminales Drittel (sechs Cysteine) identifiziert, in denen sich die Proteine nahezu gleichen. Die N- und die C-Domäne sind voneinander durch eine Domäne getrennt, in der sich die IGFBP strukturell unterscheiden. Zweitens haben alle IGFBP eine hohe Bindungsaffinität zu den IGF und besitzen drittens einen ähnlichen Gencode [8; 46; 59].

Neben den hochaffinen IGFBP wurden IGFBP-verwandte Proteine identifiziert, die nur eine niedrige Affinität zu den IGF aufweisen. In dieser Gruppe konnten bis jetzt vier Proteine unterschieden werden. Sie besitzen in der N-terminalen Domäne Ähnlichkeiten mit den IGFBP. Die sechs IGFBP und die vier IGFBP-verwandten Proteine werden auch als IGFBP- Superfamilie bezeichnet. Es wurde die Hypothese erstellt, dass sie alle Produkte einer einzigen Genfamilie sind [8 ; 46].

### **1.4.3. Interaktionen zwischen IGF, IGF-R und IGFBP**

Die molekularen Reaktionen zwischen IGF und IGFBP sind noch nicht bis ins Detail geklärt. Als sicher gilt, dass IGFBP nicht ausschliesslich mit den IGF interagieren. Es wurden auch für andere Proteine, wie das ALS (*acid-label-subunit*) im Serum, Insulin,

Zelloberflächenproteine, Extrazelluläre Matrix (ECM)-Proteine und potentiell auch für intrazelluläre Komponenten, Interaktionen beschrieben.

Dies betrifft überwiegend die IGBP-1, -4 und -5 [8].

Dadurch könnten sie eine wichtige Bedeutung bei biologischen Prozessen wie der Steuerung der Knochenzellproliferation und des Wachstums von Mamma- oder Prostatakarzinomzellen haben [46; 92; 93; 94; 96].

Es gibt IGF-abhängige und -unabhängige Wirkungen. Für IGF-unabhängige Wirkungen werden vor allem die C-Domäne und die mittlere Region verantwortlich gemacht, während dem N-terminalen Drittel ausschliesslich IGF-abhängige Wirkungen zugeschrieben werden. Deshalb nimmt man an, dass die N-Domäne den kritischen Punkt für die IGF-Bindung darstellt [46].

Die IGF interagieren mit den Zelloberflächenrezeptoren vom Typ 1 und 2 und können auch an den Insulin-Rezeptor binden. Die mitogenen Effekte werden vor allem über den IGF-I-R vermittelt. Der IGF-II-R bindet überwiegend IGF-II. Seine Wirkungen sind weniger gut definiert [46].

Im Blut liegen die IGF überwiegend an IGFBP gebunden vor. Die IGFBP haben eine höhere Affinität zu den IGF als der IGF-I-R. Sie dienen als Transportproteine für die IGF und bringen sie in das zirkulierende Blutvolumen sowie vaskularisierte Kompartimente. Zudem präsentieren sie die IGF spezifischen Zelltypen und modulieren wachstumbeeinflussende Vorgänge. Die IGFBP verlängern die Halbwertszeit der IGF und wirken als Modulatoren ihrer Verfügbarkeit und Aktivität [46; 48; 59].

Die Membranbindung der IGFBP wirkt aktivitätssteigernd auf die IGF. Es liegen überwiegend IGFBP-3/IGF-Komplexe vor. Es ist anzunehmen, dass erst diese Komplexe Einfluss auf die Nierenentwicklung nehmen [82].

Auf zellulärer Ebene wird die Bindung der IGF an die IGFBP über Proteolyse durch Endoproteasen und Phosphorylierung reguliert [8; 7; 46]. Limitierte Proteolyse auf zellulärer Ebene muss als wichtiger Regulator der IGF-IGFBP-Interaktion betrachtet werden. Das N- und das C-terminale Ende sind relativ resistent gegenüber Endoproteasen. Dagegen ist die Spaltung der zentralen Domäne durch Endoproteasen allen IGFBP gemein. Die resultierenden Fragmente haben eine deutlich reduzierte Bindungskapazität gegenüber den IGF [8; 46].



Durch die extrazelluläre Abspaltung der IGF von den IGFBP kommt es zu einer Verminderung der Interaktionen zwischen den IGF und den IGF-Rezeptoren. Die verminderte Aktivität für IGF wird durch Proteolyse der IGFBP und eventuell durch Konformationsänderung, zum Beispiel durch Bindung der IGF an extrazelluläre Matrixproteine, erreicht. Die Affinität der IGFBP verringert sich, wenn sie an die Zelloberfläche oder an ECM-Proteine gebunden sind [46].

Vor allem IGFBP-1 scheint verantwortlich für die schnelle Regulation der Bioverfügbarkeit der IGF durch Bindung der freien IGF und daraus resultierender Hemmung des freien IGF in der Zirkulation [7; 8; 59]. Außerdem wurden Interaktionen mit verschiedenen Aminosäuren am N- oder C-terminalen Ende beschrieben, die zu einer abgeschwächten Bindung zwischen IGF und den IGFBP führen [7; 8; 59].

Letztlich steht durch eine verminderte Affinität der Bindungsproteine den Rezeptoren eine grössere Menge an freiem IGF zur Verfügung [8].

IGFBP-3 ist das in der Zirkulation dominierende Bindungsprotein und wird vor allem in der Leber gebildet. Stimuliert wird die Synthese durch ein Wachstumshormon aus der Adenohypophyse, dem Hypophysären Wachstumshormon (HGH) [9; 58]. Sein Einfluss auf die Nephrogenese ist bisher kaum untersucht.

Die Affinität der IGFBP zu den IGF hängt davon ab, ob diese membrangebunden oder in freier Form vorliegen. Dies trifft auch für das IGFBP-3 zu. Es bildet im Plasma gemeinsam mit ALS (*acid-label-subunit*) freiem IGF-I und IGF-II einen ternären Komplex. Dieser ist massgeblich an der Regulation des normalen Wachstums beteiligt. Er ist in der Lage, zirkulierendes IGF-I rasch zu binden und damit akut auf pathophysiologische Änderungen zu reagieren [46].

#### **1.4.4. Intrauterine Entwicklung und Regulation des IGF**

Mangelernährung, Frühgeburt und niedriges Geburtsgewicht sind mit einer erniedrigten Nephronzahl, essentiellen Hypertonus und progredientem Nierenversagen im Erwachsenenalter assoziiert. Charakteristisch für das intrauterine Wachstum ist die Bevorzugung des Zentralnervensystems gegenüber anderen Organen bei vermindertem Nahrungsangebot und daraus resultierender Wachstumsrestriktion. So sind auch Nieren- und Körpergewicht vermindert, um eine ausreichende Versorgung des Zentralnervensystems zu gewährleisten [5].

Ein Zusammenhang zwischen der Bioverfügbarkeit der IGF bzw. der Expression ihrer Bindungsproteine und Rezeptoren und der Anzahl der während der intrauterinen Entwicklung gebildeten Nephrone ist möglich [21]. So beschrieben Ong *et al.* im Rahmen ihrer Untersuchungen an 199 Einlingen positive Korrelationen zwischen dem IGF-I-, Insulin- und IGFBP-1, -3 - Spiegel im humanen Nabelschnurblut und dem Geburtsgewicht [84.]. Sie konnten zeigen, dass mit ansteigendem Schwangerschaftsalter der Insulinspiegel sank, während der IGFBP-1- Spiegel stieg. Dagegen blieben unabhängig vom Schwangerschaftsalter die Nabelschnurkonzentrationen von IGF-I, IGF-II, IGFBP-3 und IGF-II-R konstant [84]. In ihren Untersuchungen stellten sie ausserdem die wichtige Bedeutung des IGF-II-R im Zusammenhang mit dem fetalen Wachstum dar. Die lösliche zirkulierende Form hemmt die durch IGF-II geförderte DNA-Synthese und damit das fetale Wachstum. Daraus folgt, dass die IGF-II/IGF-II-R-Ratio positiv mit dem Geburtsgewicht korreliert ist.

Lee *et al.* fanden durch Untersuchungen an Schafsfeten bei Mangelernährung der Muttertiere die Serumkonzentrationen von IGF-I und -II sowohl im mütterlichen, als auch im fetalen Kreislauf erniedrigt. Gleichzeitig war die hepatische mRNA Expression an IGF-I bei den Feten erhöht [60].

Liu *et al.* zeigten durch Untersuchung der IGF-I-Genexpression bei Schafsfeten eine Hochregulation des IGF-I im fetalen renalen Cortex und einen Abfall nach der Geburt. Es wird die Möglichkeit diskutiert, dass IGF-I und Insulin die Renin-mRNA-Expression durch erhöhte zelluläre cAMP- Konzentrationen stimulieren [65].

Es gibt einen gut dokumentierten Zusammenhang zwischen dem Anstieg des Serum-IGF-I und der hepatischen mRNA-Expression des IGF-I. So scheint die Expression der IGF-I mRNA in der Leber am stärksten auf Veränderungen des *growth hormone* Levels zu reagieren, was zu dem Schluss führt, dass das hepatische IGF-I eine Rolle im *growth hormone*-abhängigen Wachstum spielt [14].

Eine Verminderung der intrahepatischen IGF-I Expression konnte mit einer verminderten Sekretion der Wachstumshormone aus der Hypophyse in Zusammenhang gebracht werden. Interaktionen zwischen der wachsenden Niere und dem Zentralnervensystem wurden bereits durch Barker *et al.* in Betracht gezogen [5].

Die o.g. bisherigen Arbeiten belegen eine Beteiligung des IGF-Systems an der Nephrogenese und renalen Wachstumsprozessen. Sie dienen als Anregung, die Wirkung des IGF-Systems als zentralen Faktor für die fetale Nierenentwicklung zu untersuchen.

## 1.5. Tiermodell

Das Munich Wistar Frömter (MWF) Rattenmodell ist das einzige bisher morphologisch und funktionell ausreichend charakterisierte Rattenmodell mit ausgeprägtem angeborenem Nephronmangel (kongenitaler Oligonephronie). Es vereint in sich die klinisch bedeutsamen Risikofaktoren der Progression der chronischen Niereninsuffizienz: spontaner salz-sensitiver arterieller Hypertonus, und Proteinurie. Der MWF-Stamm entstammt einer Sublinie der Ivanovas-Wistar-Ratten und wurde ursprünglich von Professor Frömter (Frankfurt/Main) und dann ab 1978 im Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover als MWF/Ztm-Stamm über fünf Generationen auf subkapsulär gelegene Glomerula weiterselektiert [33]. Dieser Stamm weist über fünfzig kapselberührende Nierenkörperchen pro Niere auf [51]. Ausgehend von einer primär beobachteten erniedrigten Glomerula-Dichte konnte bei den MWF/Ztm-Ratten eine erniedrigte Glomerula-Anzahl nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Wistar-Cryptorchic-(WC/Ztm-)Ratte war die Glomerulazahl bei MWF/Ztm-Tieren um 27% reduziert [51]. Weiterhin wurde beobachtet, dass männliche Tiere relativ früh eine arterielle Hypertonie und Proteinurie entwickeln, während diese pathologischen Befunde bei weiblichen Tieren verzögert und abgeschwächt auftreten. In den letzten Jahren hat die Arbeitsgruppe um die Dres. Guiseppa und Andrea Remuzzi, Bergamo, wesentliche Untersuchungen bei MWF-Ratten durchgeführt [71; 84; 87; 88; 89; 111]. Fassi *et al.* haben in einer gemeinsamen Arbeit mit der Arbeitsgruppe um Brenner, Boston, auf die Bedeutung der MWF-Ratte zum Studium der Pathogenese des arteriellen Hypertonus und der progredienten chronischen Niereninsuffizienz hingewiesen [25]. Die Anzahl der Glomerula war sowohl in männlichen (-51%) als auch weiblichen (-47%) MWF Ratten im Vergleich zu Wistar Kontrolltieren signifikant erniedrigt.

Aufgrund der Eigenschaften wurde das MWF-Modell für unsere Untersuchungen verwendet. Als Kontrollstamm dienten Wistar-Ratten, da diese genetisch sehr nahe am Ursprungstamm der MWF Ratte liegen und damit die genetische Heterogenität ohne Beziehung zur bearbeiteten Pathologie minimal ist. Sie weisen keinen Nephronmangel und keine Symptome der chronischen Niereninsuffizienz und des arteriellen Hypertonus auf [95].

## 2. Ziele/ Fragestellungen

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es eine mögliche parakrine und autokrine Wirkung des IGF-Systems für die Regulation der Nephrogenese in einem Tiermodell mit angeborenem Nephronmangel zu untersuchen. Dazu wurde das MWF-Rattenmodell ausgewählt.

Mit immunhistologischen Methoden werden im Einzelnen folgende Komponenten des renalen IGF-Systems analysiert: IGF-I, IGF-II, IGF-I-Rezeptor, IGFBP-1 und IGFBP-3. Die Untersuchung erfolgte mit immunhistochemischen Methoden erstens im Zeitgang während der Nierenreifung und zweitens hinsichtlich der Lokalisation in spezifischen renalen Strukturen (Glomeruli und Tubuli).

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Tierhaltung

Die MWF-Ratten wurden aus unserer Züchtung am Campus Benjamin Franklin, Deutschland, gestellt [55]. Die Wistartiere stammen von der Harlan und Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland).

Die Haltung der Ratten erfolgte in den Räumen der Forschungsanstalt für Experimentelle Medizin (FEM) der Freien Universität Berlin. Den Ratten wurde durch eine automatische Lichanlage ein zwölfständlicher Tag-Nacht-Rhythmus vorgegeben. Die Raumtemperatur lag konstant bei 22°C, die Luftfeuchtigkeit bei 50%. Die Ratten wurden mit Pellets ernährt, die 0,2% NaCl und 20% Proteinanteil enthielten (Standardhaltungsfutter für Ratten, Altromin). Sie hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Es lebten maximal sechs Ratten in einem Makrolon - Gemeinschaftskäfig (Typ 4).

Zur exakten Bestimmung des *Plug* wurden männliche und weibliche Tiere für 24 Stunden verpaart. So war die exakte Bestimmung des Embryonalalters möglich.

### 3.2. Organentnahme

Pro Gruppe wurden mindestens vier schwangere Ratten ausgewählt. Pro Wurf wurden drei Junge für die morphologische, histologische und immunhistologische Untersuchung sowie die Analyse auf mRNA-Ebene randomisiert. Letzteres erfolgte innerhalb der Arbeitsgruppe und ist nicht Bestandteil dieser Arbeit.

Die Muttertiere wurden vor Entnahme der Embryos mit Xylocain und Ketanest narkotisiert. Nach Entnahme der Embryos, wurden Leber und Nieren für die Untersuchungen entfernt. Ein Teil der Organe wurde zur weiteren histologischen Nutzung in Metacarne fixiert, der andere Teil wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.3. Gewichtsmessungen

Das Körpergewicht wurde dokumentiert für den Tag 19 (E19) der Embryogenese und postnatal für die Tage 1, 7, 12 und 70 (D1, D7, D12, D70).

Am Tag E19 wurde das Plazentargewicht dokumentiert.

Das Nierengewicht wurde dokumentiert für die Entwicklungstage E19, D1, D7, D12.

### 3.4. Materialien

Als Vorbereitung zur Einbettung wurde das Gewebe in einem Paraffin-Einbettautomaten (Histokinette, British American Optical Co. Ltd. Slough, Bucks.) entwässert und paraffiniert. Hier durchlief es für jeweils zwei Stunden eine aufsteigende alkoholische Reihe mit jeweils 90%igem, 95%igem und zweimal 100%igem Ethylalkohol sowie zweimal 100%igem Isopropylalkohol. Nach dreimal zweistündiger Einlagerung in der Intermediumlösung VulcisM2 (Fina) und einer einstündigen Einlagerung in Paraffin-Vulcis-Lösung im Verhältnis 1:1 wurde das Gewebe für vier Stunden in reines Paraffin gelegt. In frischem Paraffin über Nacht gelagert, konnte das Gewebe am nächsten Tag in Paraffinblöcke gegossen werden. Anschliessend wurden mit dem Mikrotom (HM 355, Firma Microm, Walldorf, Deutschland) auf silanisierten Objektträgern Schnitte mit einer Dicke von 3µm angefertigt.

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
IGF-I- Antikörper (1:100)	GroPep, Adelaide, Australien
IGF-II- Antikörper (1:100)	GroPep, Adelaide, Australien
IGFBP-1- Antikörper (1:100)	GroPep, Adelaide, Australien
IGFBP-3- Antikörper (1:100)	GroPep, Adelaide, Australien
IGF-I-R- Antikörper (1:100)	Neomarkers, Union City, USA
R.T.U. Normal horse serum 2,5%	Vectastain Kit; Vector, Burlingame, USA
R.T.U. Biotinylated anti-rabbit IgG	Vectastain Kit; Vector, Burlingame, USA
R.T.U. Elite ABC reagent	Vectastain Kit; Vector, Burlingame, USA
Diaminobenzidin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Mayer's Hämatoxylin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Goat-Serum (1:50)	HRP-DAKO, Carpinteria, USA
Biotinylated secondary antibody, Mouse IgG	Vimentin-Kit, Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Peroxidase	Vimentin-Kit, Sigma, Deisenhofen, Deutschland
AEC-Chromogen	Vimentin-Kit, Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Antigen-Retrival-Solution	DAKO, Carpinteria, USA
Trypsinlösung (0,625g in 250ml PBS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
BSA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
PBS	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Tabelle 3 Materialien und Hersteller

### 3.5. Messung von Harnvolumen, Kreatininclearance, Albuminexkretion im Urin, systolischem Blutdruck und Gewicht des linken Ventrikels am Tag D 70 *post partum*

#### 3.5.1. Bestimmung von Harnvolumen, Kreatininclearance und Albuminexkretion

Zur Bestimmung der Kreatininclearance, des Harnvolumens und der Albuminexkretion wurden die Tiere am Lebenstag D70 einzeln in Stoffwechselkäfige gesetzt. Das 24-Stunden-Urinvolumen wurde aufgefangen und gemessen. Die Albuminexkretion im Urin wurde mittels ELISA unter Nutzung eines rattenspezifischen Antikörpers (ICN Biomedicals, Eschwege, Deutschland) bestimmt.

Die Kreatininkonzentration im Urin sowie im Plasma wurde im Standardverfahren mittels Autoanalyzer durch die Firma Labor 28 (Berlin) bestimmt.

Die Kreatininclearance wurde anschliessend nach der Standardformel berechnet.

$$\text{Kreatinin-Clearance} = \frac{\text{Urinkonzentration von Kreatinin} \times \text{Harnvolumen}}{\text{Plasmakonzentration von Kreatinin} \times \text{Zeit}}$$

#### 3.5.2. Messung des systolischen Blutdrucks

Die Blutdruckmessung wurde mittels einer nicht-invasiven Tailcuff-Methode an wachen Tieren durchgeführt. Es wurde eine automatisierte, computergestützte, oszillatorische Technik der Firma TSE, Bad Homburg genutzt. Zur Messung des Blutdruckes wurden die Tiere einzeln in eine schmale Kunststoffröhre (Restrainer) gesetzt, welche wiederum in einer auf 35°C aufgeheizten abgeschlossenen Kammer stand. Durch die hohe Umgebungstemperatur erhöht sich die Durchblutung des Rattenschwanzes. Dies ist eine notwendige Voraussetzung für die korrekte Bestimmung des Blutdrucks mittels der Tailcuff-Methode. Über den Schwanz der Ratten wurde eine aufblasbare Druckmanschette sowie ein mit dem Computer verbundener Pulssensor befestigt. Um stressbedingte Blutdruckspitzen zu vermeiden, gingen der eigentlichen Datenermittlung simulierte Messungen voraus, um die Tiere an dieses Procedere zu gewöhnen. An drei aufeinander folgenden Tagen wurden täglich drei Messungen im Abstand von wenigen Minuten bei jedem Tier durchgeführt. Anschließend wurde der Mittelwert dieser neun Messungen ermittelt.

### 3.6. IGF-I Immunhistochemie

Die Immunohistochemie von IGF-I wurde mit der Streptavidin-Biotin-Methode durchgeführt [41].

Zunächst wurden die Schnitte mittels einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und hydriert. Für die Behandlung mit der Antigen-Retrival-Solution (Zitronensäurepuffer pH 6,1) für 20 Minuten wurde eine Mikrowelle mit 200W genutzt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Die Schnitte (3 µm) wurden in 0,3% Hydrogenperoxid inkubiert, um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu eliminieren.

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch R.T.U. Normal horse serum 2,5% für 30 Minuten blockiert.

Anschliessend wurden die Schnitte mit dem spezifischen IGF-I Antikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach gründlichem Spülen mit TBS (10fach TBS-Puffer: 24,2g TrisBase; 80g NaCl; bis auf 1l mit Aqua bidest auffüllen; mit Hcl auf pH 7,6 titrieren) wurden die Schnitte in R.T.U. Biotinylated anti-rabbit IgG für 30 Minuten inkubiert.

Nach einer weiteren Spülung in TBS wurden die Schnitte mit R.T. U. Elite ABC reagent für 30 Minuten behandelt.

Nach wiederholtem Waschen in TBS für 5 Minuten, wurden die Schnitte in Diaminobenzidin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit Hämatoxylin behandelt und abschliessend mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert. Die Einbettung erfolgte mit Entellan.

Alle Schnitte wurden per Lichtmikroskopie ausgewertet.

Die Kontrollen ohne Antikörper waren negativ.



### 3.7. IGF-II Immunhistochemie

Die Immunohistochemie von IGF-II wurde mit der Streptavidin Biotin Methode durchgeführt [41].

Zunächst wurden die Schnitte mittels einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und hydriert. Anschliessend erfolgte eine mehrfache Spülung in PBS. Für die Behandlung mit der Antigen-Retrieval-Solution einmal zwei Minuten und zweimal fünf Minuten wurde eine Mikrowelle mit 200W benutzt. Nach einer 20minütigen Abkühlphase wurden die Schnitte in einer Trypsinlösung (0,625g Trypsin in 250ml PBS) für drei Minuten bei 37°C inkubiert. Anschliessend erfolgte eine Waschung in PBS.

Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine BSA/PBS-Lösung (10% BSA in PBS; 100µl pro Schnitt) für 60 Minuten bei Raumtemperatur blockiert.

Anschliessend wurden die Schnitte mit dem spezifischen IGF-II Antikörper über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer gründlichen Waschung mit PBS wurden die Schnitte in R.T.U. Biotinylated anti-rabbit IgG für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Waschung mit PBS wurden die Schnitte in R.T.U. Elite ABC Reagent für 40 Minuten behandelt. Nach wiederholten Waschungen in PBS für fünf Minuten, wurden die Schnitte in Diaminobenzidin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert.

Anschliessend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin behandelt und abschliessend mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

Die Einbettung erfolgte mit Entellan.

Alle Schnitte wurden per Lichtmikroskopie ausgewertet.

Die Kontrollen ohne Antikörper waren negativ.

### 3.8. IGF-I-R Immunhistochemie

Die Färbung erfolgte mit der Peroxidasemethode. Zunächst wurden die Schnitte (3 µm) mittels einer absteigenden Alkoholreihe hydriert und entparaffiniert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Zunächst erfolgte die Hemmung der endogenen Peroxidase mit 0,3% Hydrogen- Peroxid für fünf Minuten.

Nach einer Spülung mit PBS erfolgte die Inkubation mit Goat-Serum (1:50) für 60 Minuten, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Im Folgenden wurden die Schnitte über Nacht mit dem IGF-I-Rezeptor-Antikörper inkubiert [18; 109].

Nach einer Waschung in PBS für fünf Minuten erfolgte die Inkubation in Biotinylated secondary antibody, Mouse-Immunglobulin für 20 Minuten. Nach nochmaliger Waschung in PBS wurden die Schnitte für 20 Minuten mit Peroxidase behandelt. Nach gründlicher Spülung mit PBS erfolgte die Inkubation mit AEC-Chromogen für fünf Minuten. Anschließend wurden die Schnitte für drei Minuten in Mayer's Hämatoxilin behandelt. Eingedeckelt wurden die Schnitte mit Gelantine.

Alle Schnitte wurden per Lichtmikroskopie ausgewertet.

Die Kontrollen ohne Antikörper waren negativ.

### **3.9. IGFBP-1 und IGFBP-3 Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie von IGFBP-1 und -3 wurde mit der Streptavidin-Biotin-Methode durchgeführt [18].

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und mittels einer absteigenden Alkoholreihe hydriert. Anschliessend wurden sie mehrfach in PBS gewaschen. Für die Behandlung mit der Antigen-Retrieval-Solution einmal zwei Minuten und zweimal fünf Minuten wurde eine Mikrowelle mit 200W benutzt.

Nach einer 20minütigen Abkühlphase wurden die Schnitte in einer Trypsinlösung (0,625g Trypsin in 250ml PBS) für drei Minuten bei 37°C inkubiert. Anschliessend erfolgte wieder eine Spülung in PBS.

Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine BSA/PBS-Lösung (10% BSA in PBS; 100µl pro Schnitt) für 60 Minuten blockiert.

Anschliessend wurden die Schnitte mit den spezifischen IGFBP-1 bzw. -3-Antikörpern für eine Stunde inkubiert. Nach einer gründlichen Spülung mit PBS wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit R.T.U. Biotinylated anti-rabbit IgG behandelt. Nach einer Spülung mit PBS wurden die Schnitte in R.T.U. Elite ABC Reagent für 40 Minuten inkubiert. Nach wiederholten Waschungen in PBS für fünf Minuten wurden die Schnitte in Diaminobenzidin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt.

Anschliessend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin behandelt und zum Schluss mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert. Die Einbettung erfolgte mit Entellan.

Alle Schnitte wurden per Lichtmikroskopie ausgewertet.

Die Kontrollen ohne Antikörper waren negativ.

Aufgrund der geringen Fallzahlen wurden keine Unterschiede zwischen Geschwistern und Nichtgeschwistern gemacht.

### **3.10. Quantifizierung**

Zur Quantifizierung wurde eine Videokamera kombiniert mit einem Videokontrollsystem (Sony MC-3255, AVT-horn GmbH) genutzt, welches mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop verbunden war. Die Bildanalyse erfolgte mittels frei verfügbarer Software (Scion Image 1.62a, Scion Co.) auf einem Power Macintosh 8200/120 Computer.

Die Auswertung erfolgte bei einer 10fach Vergrößerung.

### **3.11. Statistische Analyse**

Die Schnitte wurden per Lichtmikroskopie semiquantitativ ausgewertet.

Für den jeweiligen Untersuchungstag wurden pro Gruppe 5 Nieren und die dazugehörigen Negativkontrollen bewertet.

Je nach Nierengrösse wurden entsprechend die Sichtfelder beurteilt. Am Tag E19 waren es vier, am Tag D1 sechs, D7 acht, D12 neun, D70 zehn Sichtfelder.

Als positiv bewertet wurden alle braun gefärbten Areale im Bereich der Glomeruli und Tubuli. Der Expressionsgrad wurde mit 1-4 bewertet (4=100-76%; 3=75-51%; 2=50-26%; 1=25-0%)

Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Als signifikant wurden Unterschiede  $p < 0,05$  gewertet. Zur Auswertung kamen die Mittelwerte  $\pm$ SEM. Verglichen wurden die Werte der MWF- Gruppe mit denen der Wistarkontrollgruppe an den Tagen E19, D1, D7, D70 sowie innerhalb der Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Werte wurden einseitig getestet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Systolischer Blutdruck, Gewicht des linken Ventrikels, Nierengewicht, Harnvolumen, Kreatininclearance, Albuminexkretion im Urin am Tag D 100 *post partum*

Im Vergleich mit der Wistarkontrollgruppe zeigte sich in der MWF-Gruppe am Tag D100 ein signifikant erhöhter systolischer Blutdruck, ein erhöhtes Gewicht des linken Ventrikels sowie eine gesteigerte Albuminexkretion im 24-Stundenurin (Tabelle 4).

	Wistar D100	MWF D100
SBP (mmHg)	138 ± 8	159 ± 6 *
LV/BW (mg g <sup>-1</sup> )	1,67± 0,04	1.91± 0,02 *
KW/BW (mg g <sup>-1</sup> )	5,7 ± 0,2	6.2 ± 0,1 *
UV (ml 24h <sup>-1</sup> )	12,8± 1,0	11.3± 1,1
Cl <sub>crea</sub> (ml min <sup>-1</sup> )	2,76± 0,17	2.36± 0,14
UAE (mg 24h <sup>-1</sup> )	0,2 ± 0,02	58.1± 5,8 *

Systolischer Blutdruck (SBP), Gewicht des linken Ventrikels in Beziehung zum Körpergewicht (LV/BW), Nierengewicht in Beziehung zum Körpergewicht (KW/BW), Harnvolumen (UV), Kreatininclearance (Cl<sub>crea</sub>), Albuminexkretion im Urin am Tag (UAE) D100 *post partum* n = 8-16, \* p<0.05 vs. Wistar.

Tabelle 4. Systolischer Blutdruck, Gewicht des linken Ventrikels, Nierengewicht, Harnvolumen, Kreatininclearance, Albuminexkretion im Urin am Tag D 100 *post partum* [95]

### 4.2. Gewichte

#### 4.2.1. Körpergewicht

Im Vergleich mit der Wistarkontrollgruppe war das Körpergewicht der MWF-Ratten signifikant ( p<0,05) am Tag E19 der fetalen Entwicklung und an den postnatalen Tagen D1, D7, D12 und D70 erniedrigt (Tabelle 5).

KG (g)	Wistar	MWF
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 *

embryonal Tag E19 sowie postnatal Tag D1, D7, D12, D100 Körpergewicht \* p< 0.05 vs. Wistarstamm, n = 15-30.

Tabelle 5. Körpergewicht (KG) [95]

### 4.2.2. Plazentagewicht

Die Messung der Plazentagewichte am Tag E19 zeigt für die MWF-Gruppe signifikant erniedrigte Werte ( $p < 0,05$ ) im Vergleich mit der Wistargruppe (Tabelle 6).

	Wistar	MWF
E19	$0.658 \pm 0.021$	$0.501 \pm 0.018^*$

Tag E19, fetale Entwicklung Plazentagewicht \*  $p < 0.05$  vs. Wistarstamm, n = 32-39

Tabelle 6. Plazentagewicht (PG) in g

### 4.2.3. Nierengewicht

Der Messung der Nierengewichte zeigt zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant erniedrigte W

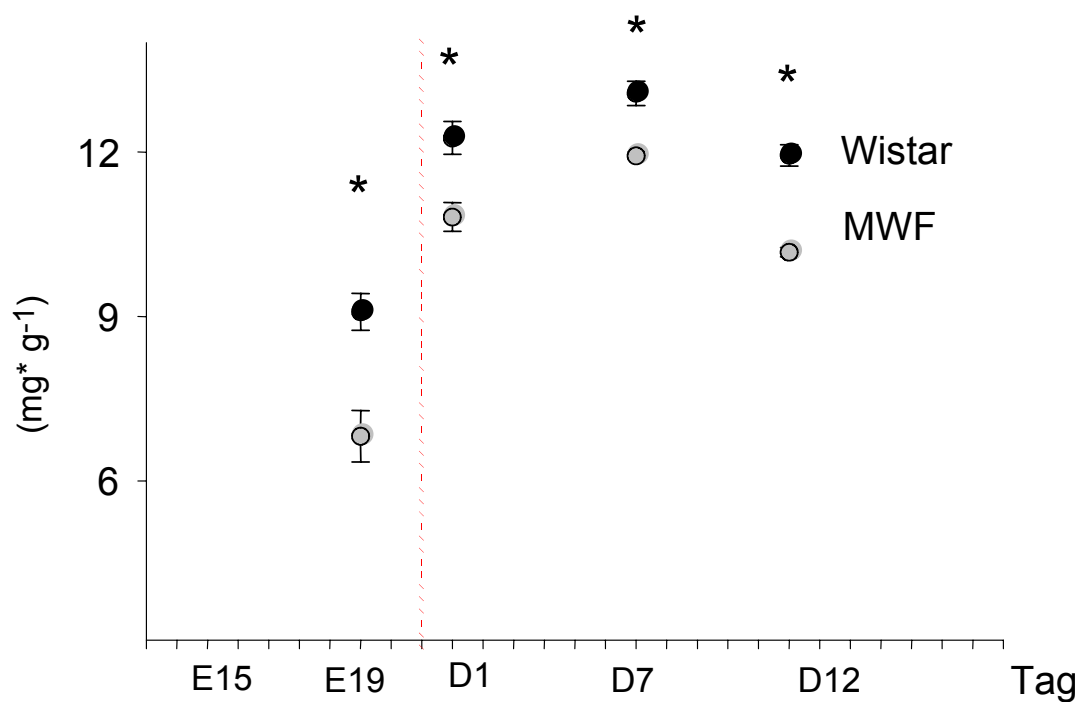


Abb. 2 perinatales Nierengewicht (NG) Embryonal Tag E19 sowie postnatal D1, D7, D12 \*  $p < 0,0001$ , n=20-30

### 4.3. Immunhistologischer Nachweis des renalen IGF-I

Die immunhistologische Analyse ergab eine deutliche Expression von IGF-I in den tubulären Strukturen der sich entwickelnden Niere am Tag E19, D1, D7, D12 und D70. Zusätzlich war IGF-I auch glomerulär am Tag E19, D1, D7, D12 nachweisbar (Abb. 5, 6). Zwischen der MWF-Gruppe und der Wistar-Kontrollgruppe ergaben sich keine quantitativen Unterschiede.

Im Zeitgang verminderte sich in beiden Gruppen die glomeruläre und tubuläre Expression von IGF-I.

In den glomerulären Abschnitten kam es in der Wistarkontrollgruppe im Vergleich E19 gegen D7 zu einem signifikanten Abfall um 65% sowie im Vergleich D7 versus D70 um 96%.

In den glomerulären Anteilen der MWF-Gruppe zeigte sich ein signifikanter Abfall vom Tag E19 zum Tag D1 um 73% sowie vom Tag D1 zum Tag D70 um 86%. (Abb. 3).

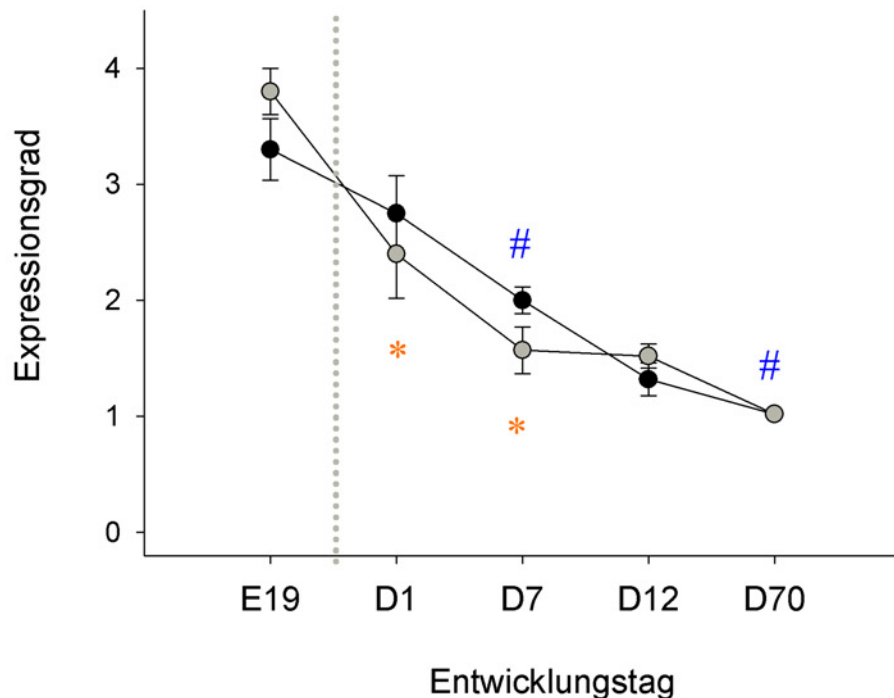
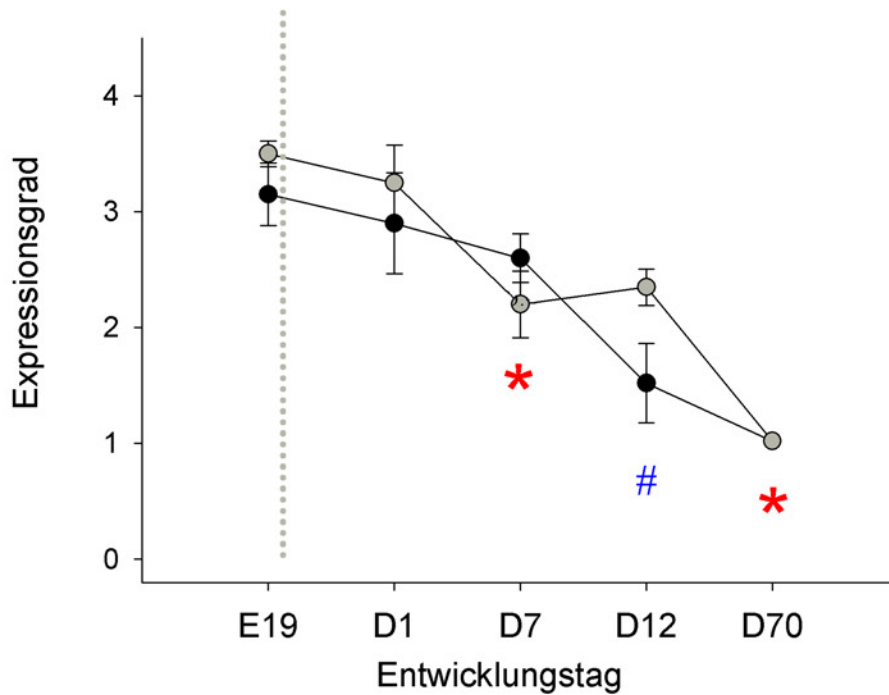


Abb. 3 IGF- I glomerulär: glomeruläre Expression von IGF 1 (schwarz = Wistarkontrollgruppe, grau = MWF- Gruppe), Expression in Abhängigkeit vom Entwicklungstag, # = p < 0,005 Wistargruppe, \* = p < 0,005 MWF-Gruppe, n=5

Die Analyse der tubulären Abschnitte ergab in der MWF-Gruppe einen signifikanten Abfall der Expression vom Tag D1 zum Tag D7 um 37%. Insgesamt kam es vom Tag E19 bis zum Tag D70 zu einer Abnahme um 71% (Abb. 4).



Die Untersuchung der Wistarkontrollgruppe zeigte einen signifikanten Abfall vom Tag D7 zum Tag D12 um 42%. Insgesamt verminderte sich die Expression vom Tag E19 zum Tag D70 um 68%.



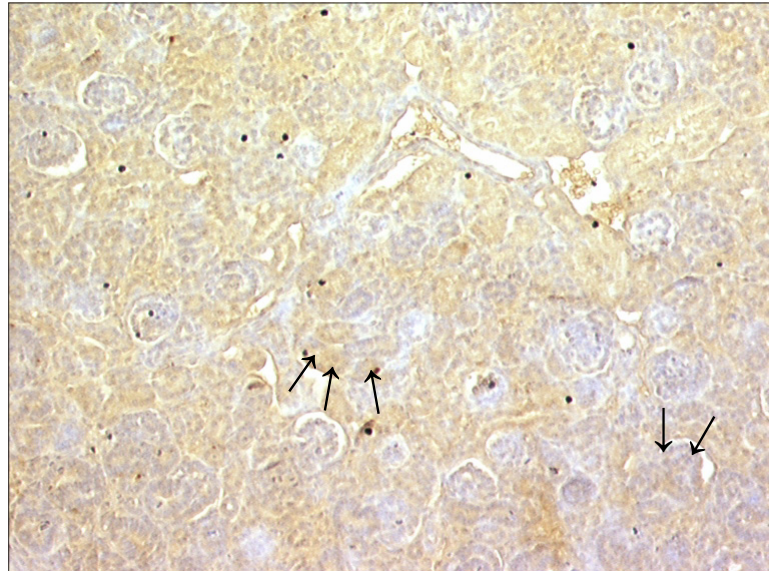


Abb. 5 IGF-I: MWF 10fache Vergrößerung, FD 1, Tubuli und Glomeruli schwach positiv auf IGF-I (siehe Pfeile)

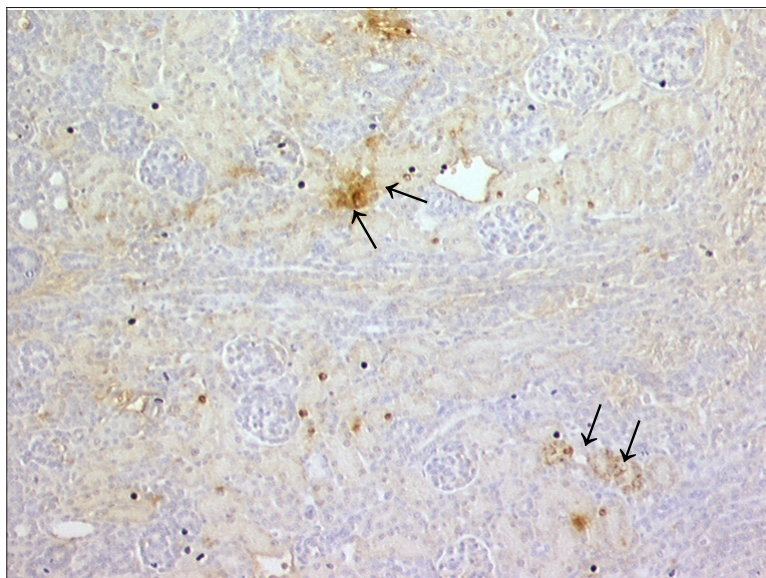


Abb. 6 IGF-I: MWF 10fache Vergrößerung, FD 7 Tubuli und Glomeruli positiv auf IGF-I (braunefärbte Areale, siehe Pfeile)

#### 4.4. Immunhistologischer Nachweis des renalen IGF-II

Die immunhistologische Analyse ergab eine deutliche Expression von IGF-II in den tubulären und glomerulären Strukturen der sich entwickelnden Niere an den Tagen E19, D1, D7, D12 und D70 (Abb. 9,10,11).

Zwischen den Gruppen war in keiner der beiden beurteilten Strukturen ein signifikanter Unterschied zu finden.

Die Expression von IGF-II im glomerulären Bereich nahm im Zeitgang in beiden Gruppen bis zum Tag D7 signifikant ab (MWF-Gruppe 23%, Wistargruppe 24%). Danach kam es sowohl bei den MWF- Tieren als auch in der Wistarkontrollgruppe zu einer nahezu konstanten Expression (Abb. 7).

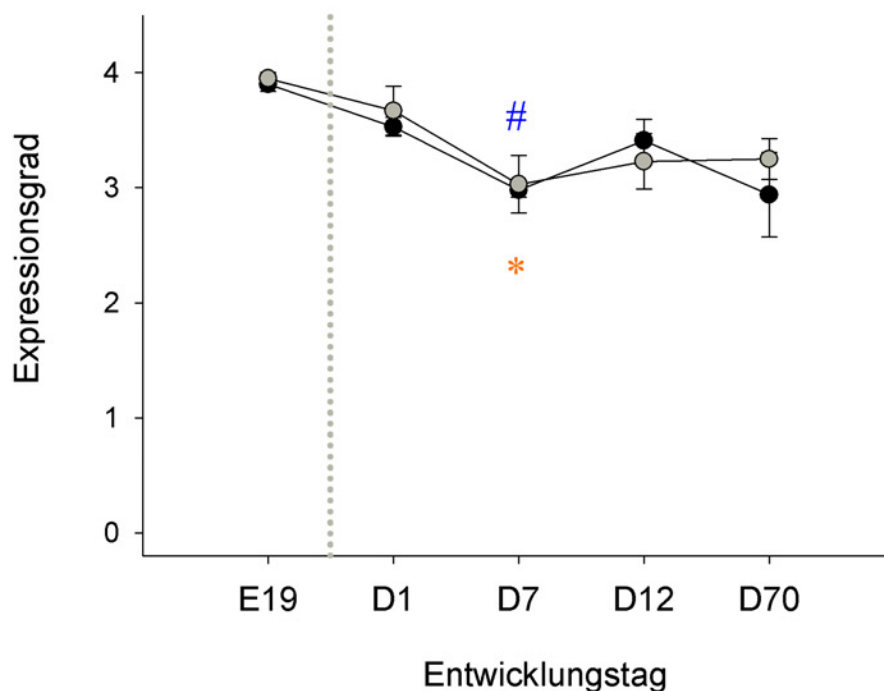


Abb. 7 IGF-II glomerulär: glomeruläre Expression von IGF- II (schwarz = Wistarkontrollgruppe, grau = MWF- Gruppe), Expression in Abhängigkeit vom Entwicklungstag # =  $p < 0,005$  Wistargruppe, \* =  $p < 0,005$  MWF-Gruppe, n=5

Die Expression von IGF-II im tubulären Bereich verlief bis zum Tag D70 in beiden Gruppen konstant (Abb. 8).

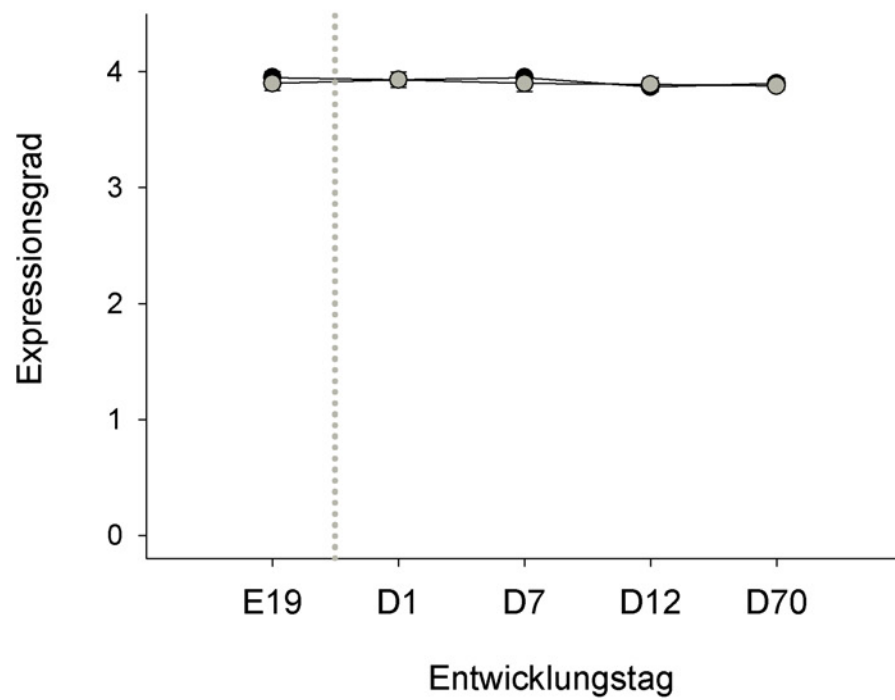


Abb. 8 IGF-II tubulär: tubuläre Expression von IGF- II (schwarz = Wistarkontrollgruppe, grau = MWF-Gruppe), Expression in Abhängigkeit vom Entwicklungstag  
n=5

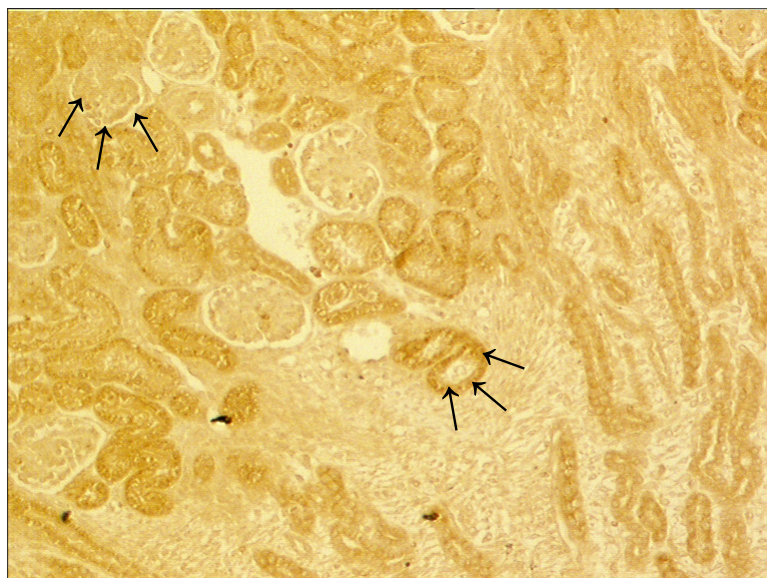


Abb. 9 IGF-II: 10fache Vergrößerung, MWF, FD1, deutliche Expression in Glomeruli und Tubuli (siehe Pfeile)

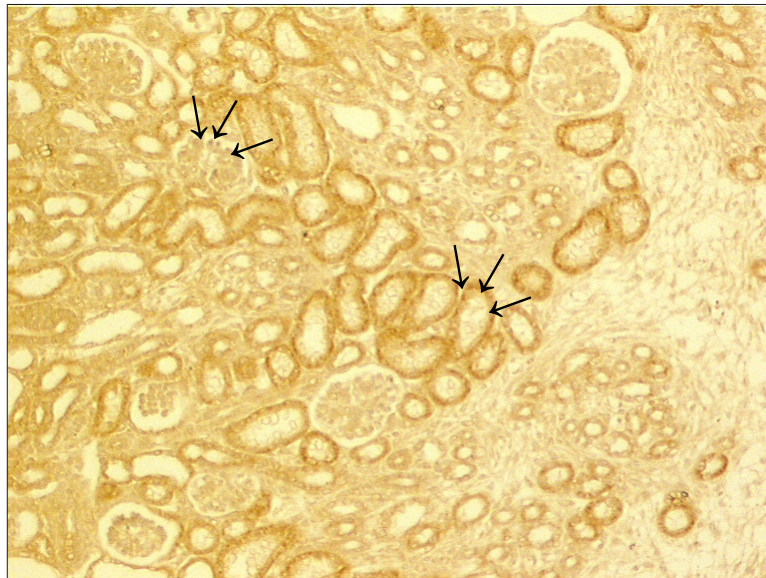


Abb.10 IGF-II: 10fache Vergrößerung WD 1 Tubuli und Glomeruli positiv auf IGF-II  
( braun gefärbte Areale, siehe Pfeile)

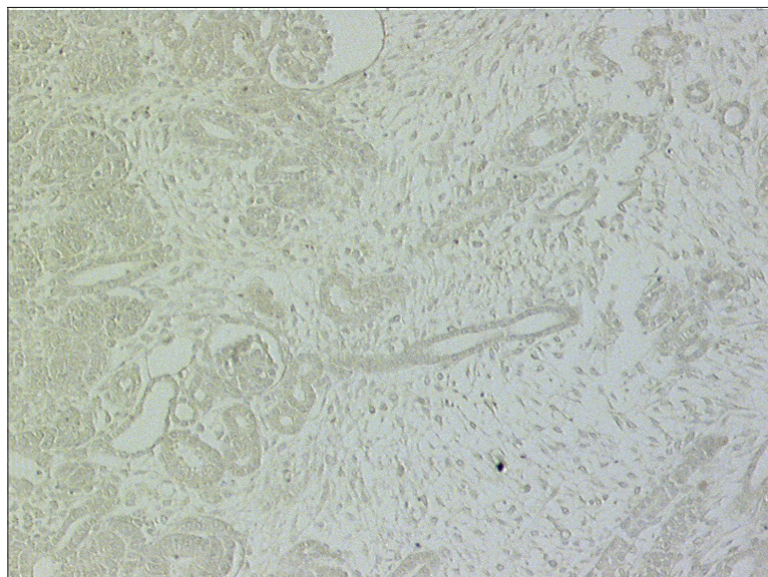


Abb. 11 IGF-II: 10fache Vergrößerung, MWF E19, Negativkontrolle

#### 4.5. Immunhistologischer Nachweis des renalen IGF-I-R

Die immunhistologische Analyse ergab eine deutliche Expression von IGF-I-R ausschliesslich in den tubulären Strukturen der sich entwickelnden Niere an den Tagen E19, D1, D7, D12, D70 (Abb. 13,14). Zwischen den untersuchten Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Im Zeitgang zeigten sich in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg in der Expression des IGF-I-R.

In der MWF-Gruppe konnte man vom Tag E19 zu D1 <sup>#</sup> einen Anstieg um 57%, im Vergleich D1 zu D7 um 17% und vom Tag D7 zu D12 um 21% verzeichnen. Die Wistarkontrollgruppe zeigte einen Anstieg vom Tag E19 zu D1 um 52%, im Vergleich D1 zu D7 um 26% und vom Tag D7 zu D12 um 13%. <sup>#</sup> Im weiteren Verlauf nahm die Expression in beiden Gruppen nicht mehr zu ( Abb. 12).

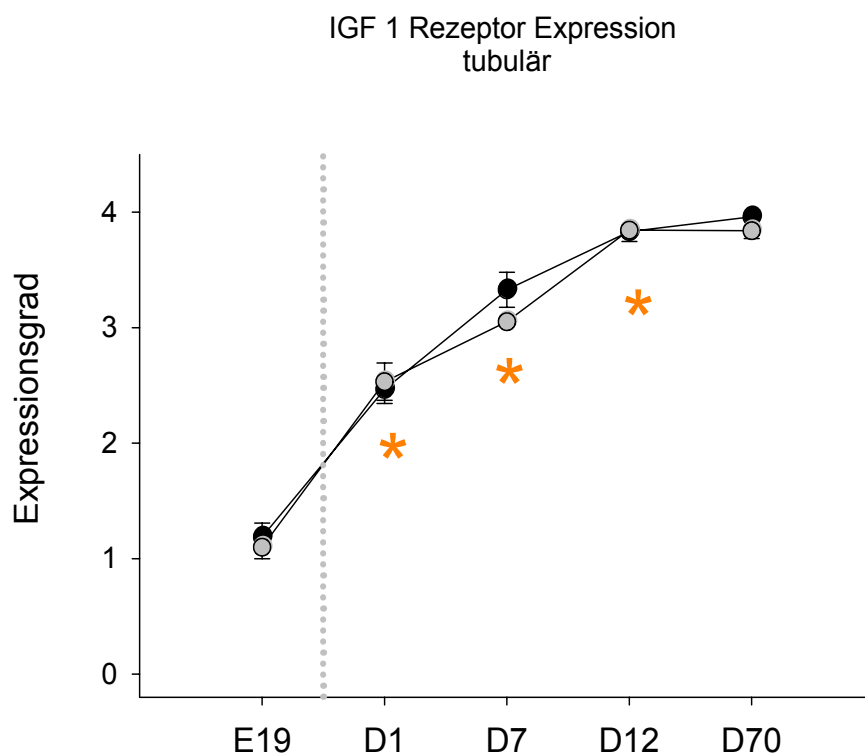


Abb. 12 IGF-I-R tubulär: tubulär (Wistarkontrollgruppe), Expression in Abhängigkeit vom Entwicklungstag, <sup>#</sup> =  $p < 0,005$  Wistargruppe, <sup>\*</sup> =  $p < 0,005$  MWF-Gruppe,  $n=5$

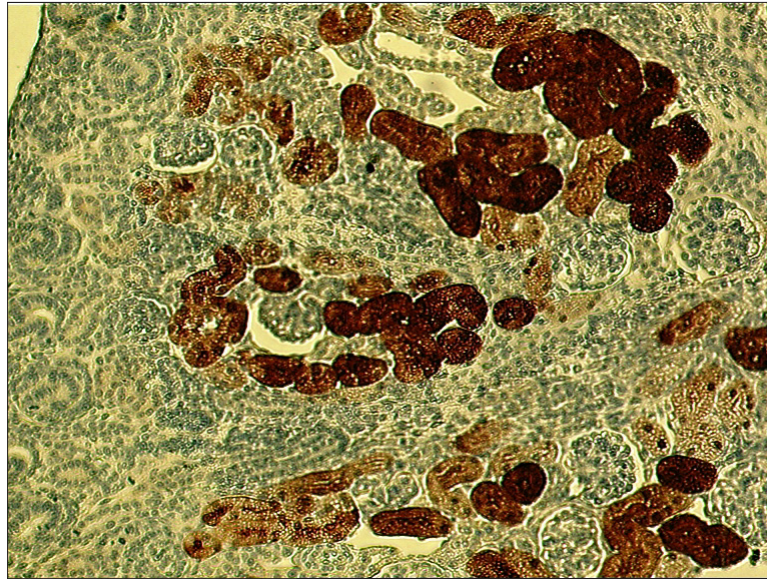


Abb. 13 IGF-I-R: 10fache Vergrößerung, MWF FD1, Tubuli positiv auf IGF-I-R (Braunfärbung), keine Reaktion im Bereich der Glomeruli

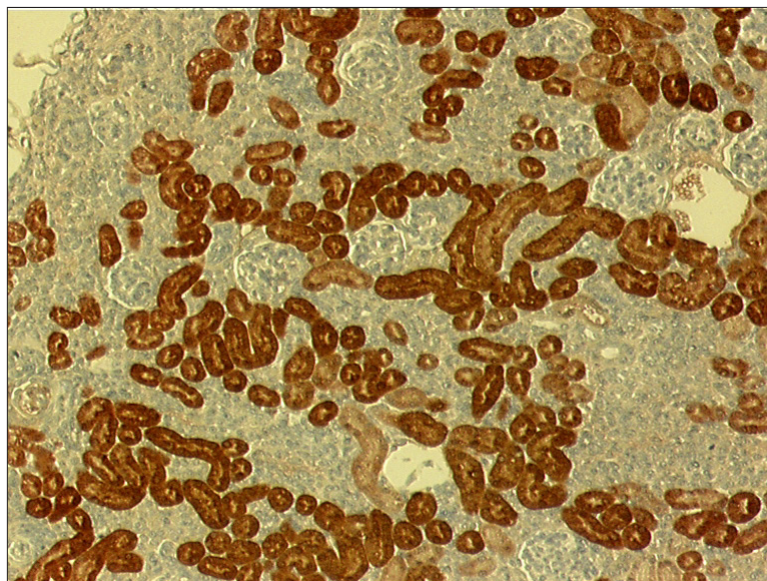


Abb. 14 IGF-I-R: MWF 10fache Vergrößerung FD 12 Tubuli positiv auf IGF-I-R (braungefärbte Areale)

#### 4.6. Immunhistologischer Nachweis des renalen IGFBP-1

Die immunhistologische Analyse ergab eine deutliche Expression von IGFBP -1 in den tubulären und glomerulären Strukturen der sich entwickelnden Niere an den Tagen E19, D1, D7, D12 und D70 (Abb. 17,18).

Zwischen den Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Expression von IGFBP-1 im tubulären und glomerulären Bereich verlief in beiden Gruppen nahezu konstant vom Tag E19 bis zum Tag D70 (Abb. 15, 16).

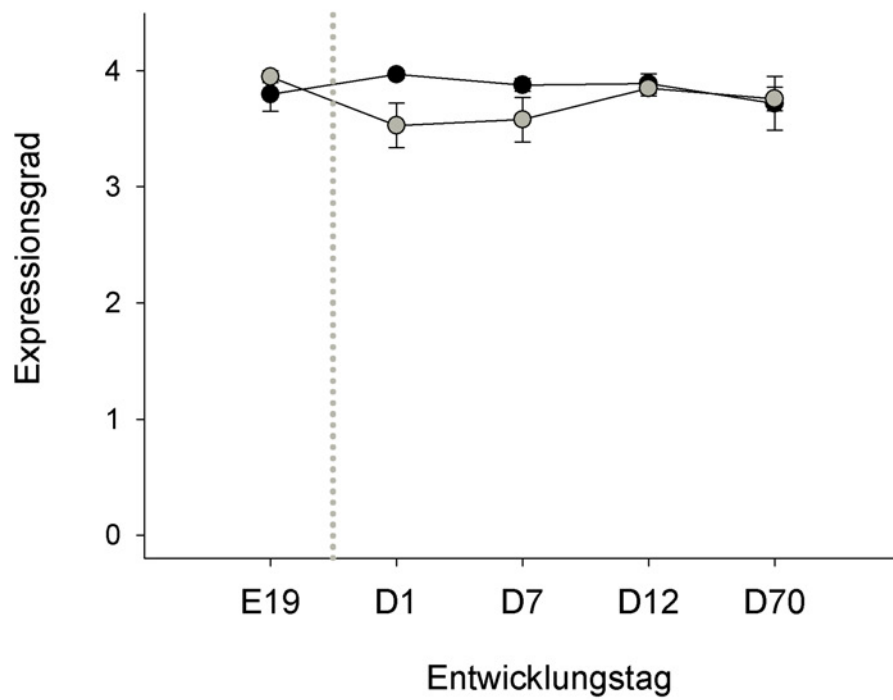


Abb. 15 IGFBP-1 glomerulär: Expression des IGFBP-1 (schwarz= Wistarkontrollgruppe, grau = MWF-Gruppe), Expression im Entwicklungsverlauf, n=5

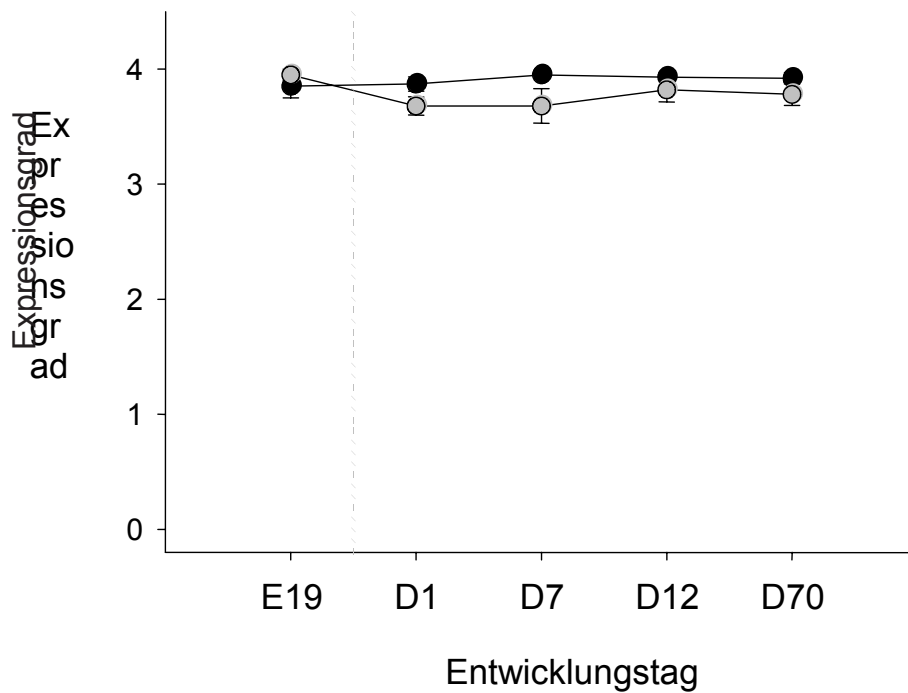


Abb. 16 IGFBP-1 tubulär: Expression des IGFBP-1 (schwarz= Wistarkontrollgruppe, grau = MWF-Gruppe), Expression im Entwicklungsverlauf, n=5

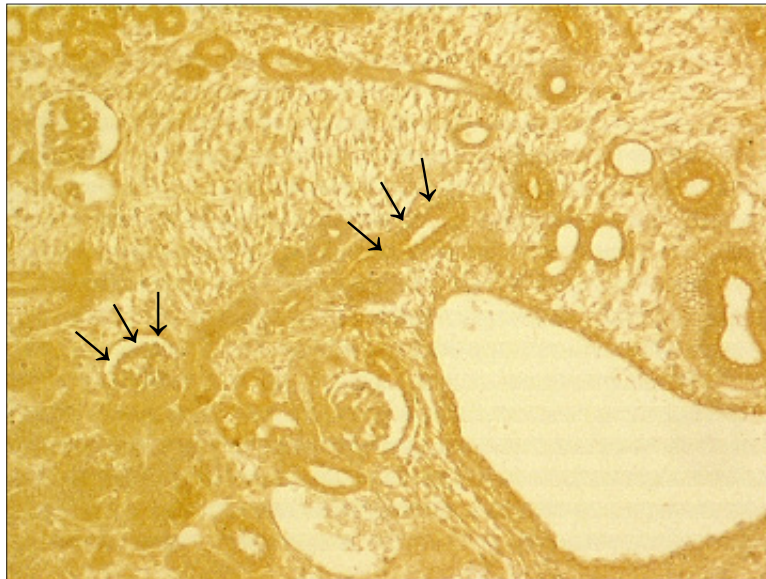


Abb. 17 IGFBP-1: MWF 10fache Vergrößerung, Nachweis von IGFBP-1 tubulär und glomerulär (braun gefärbte Areale, siehe Pfeile)

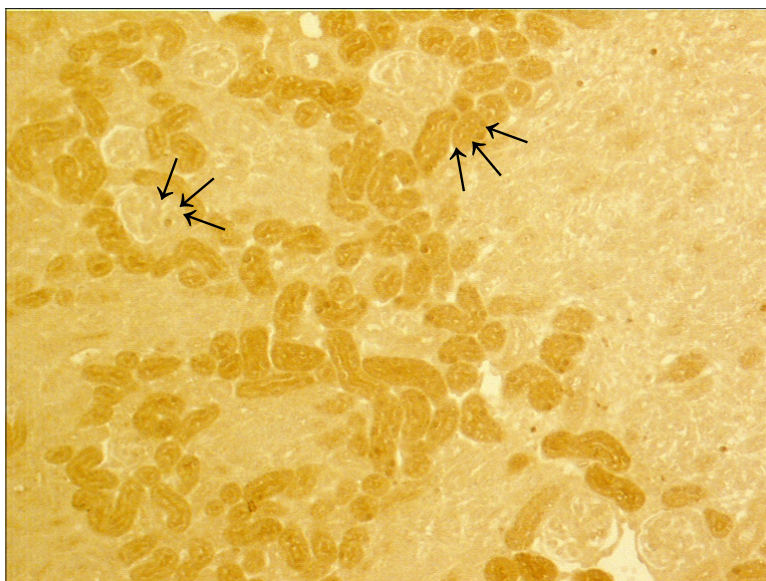


Abb. 18 IGFBP-1: MWF 10fache Vergrößerung D7, glomerulär und tubulär Nachweis von IGFBP-1 (braun gefärbte Areale, siehe Pfeile)

#### 4.7. Immunhistologischer Nachweis des renalen IGFBP-3

Die immunhistologische Analyse ergab eine deutliche Expression von IGFBP-3 in den tubulären und glomerulären Strukturen der sich entwickelnden Niere am Tag E19, D1, D7, D12 und D70 (Abb. 21,22).

Die quantitative Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede in den glomerulären und tubulären Abschnitten zwischen den beiden Gruppen.



Die Beobachtung des Zeitverlaufs zeigte in der Wistarkontrollgruppe eine signifikant abnehmende glomeruläre Expression vom Tag E19 bis zum Tag D12 um 42% und daran anschliessend nochmals einen signifikanten Anstieg bis zum Tag D70 um 23% (Abb. 19).

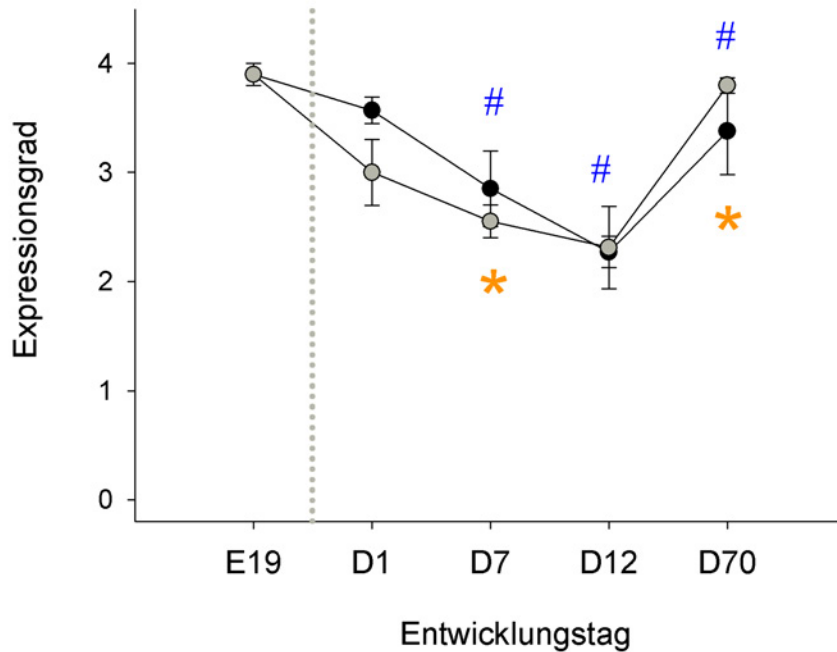


Abb. 19 IGFBP-3 glomerulär: glomeruläre Expression von IGFBP-3 (schwarz = Wistarkontrollgruppe, grau = MWF- Gruppe), Expression in Abhängigkeit vom Entwicklungstag # =  $p < 0,005$  Wistargruppe, \* =  $p < 0,005$  MWF-Gruppe, n=5

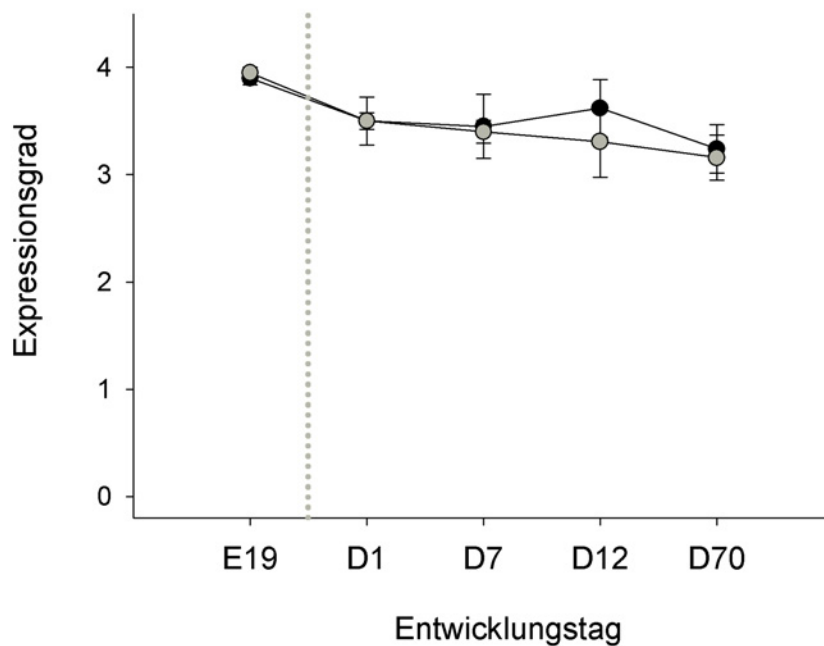


Abb. 20 IGFBP-3 tubulär: tubuläre Expression von IGFBP-3 (schwarz = Wistarkontrollgruppe, grau = MWF- Gruppe), Expression in Abhängigkeit vom Entwicklungstag, n=5

Die Verlaufsbeobachtung der MWF-Gruppe erbrachte eine Abnahme der Expression vom Tag E19 zum Tag D1 um 23%. Anschliessend kam es zu einem weiteren tendenziellen Abfall der Expression bis zum Tag D12. Danach stieg auch in dieser Gruppe die glomeruläre Expression nochmals um 39% bis zum Tag D70 an (Abb. 19).

Die Expression von IGFBP-3 im tubulären Bereich verlief bis zum Tag D70 in beiden Gruppen konstant (Abb. 20). Die Kurven verlaufen annähernd parallel.

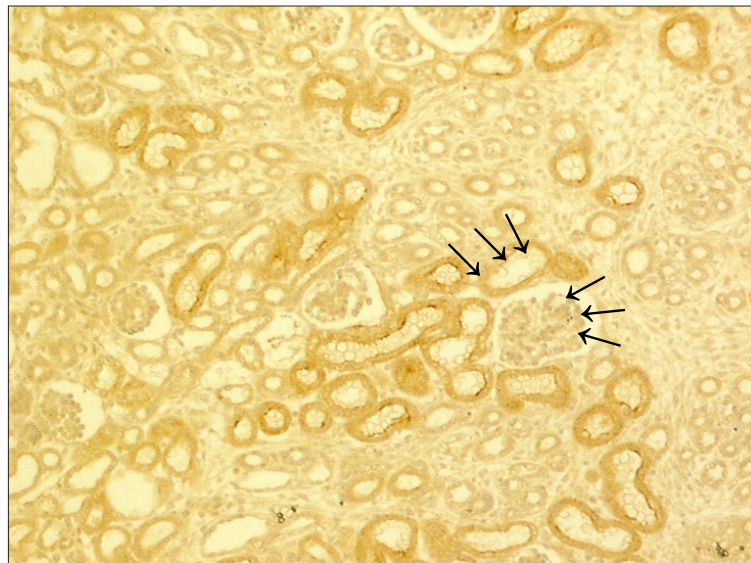


Abb. 21. IGFBP3: 10fache Vergrößerung MWF WD1 Tubulär und glomerulär positiv auf IGFBP3 (dunkel braun gefärbte Areale, siehe Pfeile)

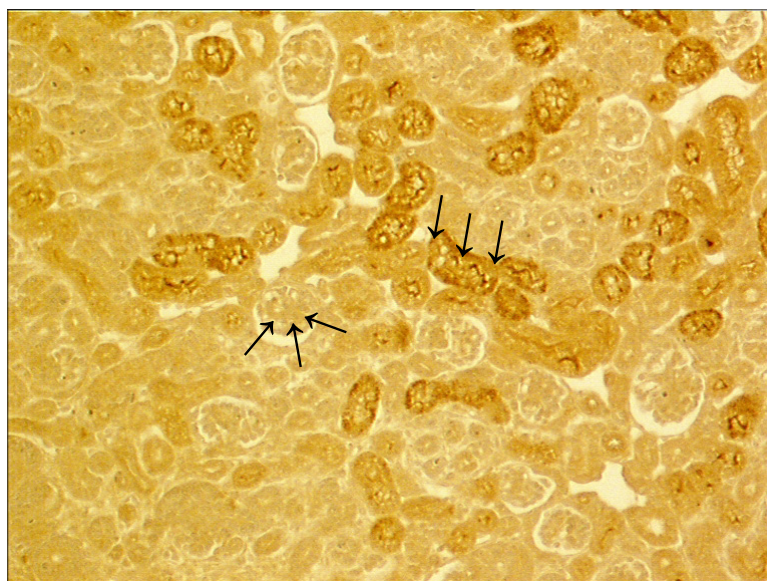


Abb. 22 IGFBP-3: MWF 10fache Vergrößerung,FD1 tubulär und glomerulär positiv auf IGFBP-3 (dunkel braun gefärbte Areale, siehe Pfeile)

## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung des renalen IGF-Systems hinsichtlich einer möglichen autokrinen / parakrinen Regulation der Nephrogenese nachzuweisen, sowie Störungen dieses Mechanismus als möglichen Pathomechanismus bei der Entwicklung eines angeborenen Nephronmangels darzustellen.

### 5.1. Brenner - Barker- Hypothese und Tiermodell

Bereits 1988 wurde von Brenner *et al.* eine umgekehrte Abhängigkeit zwischen der reduzierten Nephronenzahl zum Zeitpunkt der Geburt und der Manifestation eines essentiellen arteriellen Hypertonus beschrieben. Sie stellt sich somit als ein unabhängiger Risikofaktor für die Manifestation des primären Hypertonus dar [13]. Für unsere Untersuchungen zur Charakterisierung der Expression des IGF-Systems während der Nephrogenese wurde ein Tiermodell mit reduzierter Nephronzahl benötigt.

Eine verminderte Anzahl von Nephronen findet sich in verschiedenen genetischen Rattenmodellen mit arterieller Hypertonie und chronisch progredientem Nierenversagen (Tabelle 7).

Hochdruck Stamm	Kontroll Stamm	% Nephrene vs. Kontrolle	Kommentar	Referenz
Dahl salz-sensitiv	Dahl salz-resistent	85%	HT nach Salzbelastung FSGS	[2]
Munich-Wistar-Frömter	Wistar	51%	HT nach Salzbelastung FSGS	[25; 33; 54]
Milan-hypertensiv	Milan-normotensiv	83%	HT und keine FSGS	[3]
PVG/c	Wistar	122%	niedriger Blutdruck Resistenz gegen FSGS	[29]

Abkürzungen: HT, arterieller Hypertonus; FSGS, fokal-segmentale Glomerulosklerose

Tabelle 7. Nephron Anzahl, arterieller Hypertonus und progredientes Nierenversagen  
Tabelle modifiziert nach Brenner (1988 AJH) [13]

Für keines der in Tabelle 7 genannten Modelle gibt es bisher Untersuchungen zur Bedeutung des renalen IGF-Systems für die Nephrogenese.

Für die Untersuchungen der vorgelegten Arbeit wurde der MWF-Stamm ausgewählt, da dieser den ausgeprägtesten angeborenen Nephronmangel aufweist.

Barker *et al.* zeigten, dass ein niedriges Geburtsgewicht mit einem erhöhten Risiko für die Manifestation eines arteriellen Hypertonus und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen oder Risikofaktoren (KHK, Diabetes mellitus Typ2) einhergeht [6]. In Übereinstimmung mit der Barkerhypothese zeigte sich in den Vorarbeiten zu dieser Studie, dass die Geburtsgewichte (Tabelle 5) und Nierengewichte (Abb. 2) im MWF-Stamm signifikant niedriger ausfallen als in der Wistarkontrollgruppe. Auch die Analyse der postnatalen Entwicklung zeigte signifikant niedrigere Werte für das Körpergewicht in der MWF-Gruppe gegenüber der Wistarkontrollgruppe (Tabelle 5).

Die Messung der Nierengewichte zeigte zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant niedrigere Werte in der MWF-Gruppe (Abb. 2).

Der systolische Blutdruck ist am Tag D70 gegenüber der Wistarkontrollgruppe signifikant erhöht. Gleichzeitig lässt sich eine kompensatorische Erhöhung der glomerulären Fläche nachweisen (Tabelle 7).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Vorarbeiten zu dieser Studie, dass in Übereinstimmung mit der Brenner Hypothese die deutlich verminderte Nephronzahl bei Geburt der MWF-Tiere mit einem arteriellen Hypertonus im Erwachsenenalter einhergeht. Gleichzeitig ist in Übereinstimmung mit der Barkerhypothese die Entwicklung eines arteriellen Hypertonus mit einem niedrigen Geburtsgewicht verbunden. Deshalb ist das MWF-Modell das ideale Modell, um die Bedeutung des IGF-Systems während der Nephrogenese im Tiermodell mit angeborenem Nephronmangel zu untersuchen.

## 5.2. Bedingungen *in utero*

Die Anzahl an Nephronen zum Zeitpunkt der Geburt kann neben genetischen Faktoren auch von den Bedingungen *in utero* abhängen.

Neben der verminderten Nephronanzahl bei erniedrigtem Geburtsgewicht war auch das Plazentagewicht in der MWF-Gruppe niedriger als in der Wistarkontrollgruppe (Tabelle 4). Das geringere Plazentagewicht korreliert mit dem Embryonalgewicht (Abb. 23).

Es ist durch eine Vielzahl von Publikationen gut belegt, dass eine verminderte Plazentafunktion zu Entwicklungsstörungen führen kann [39]. Daraus kann gefolgert werden, dass auch im MWF-Modell die niedrigen Plazentagewichte (Tabelle 6) eine Ursache für das geringe Embryonalgewicht bzw. die verminderten Nierengewichte sein kann (Abb. 2).

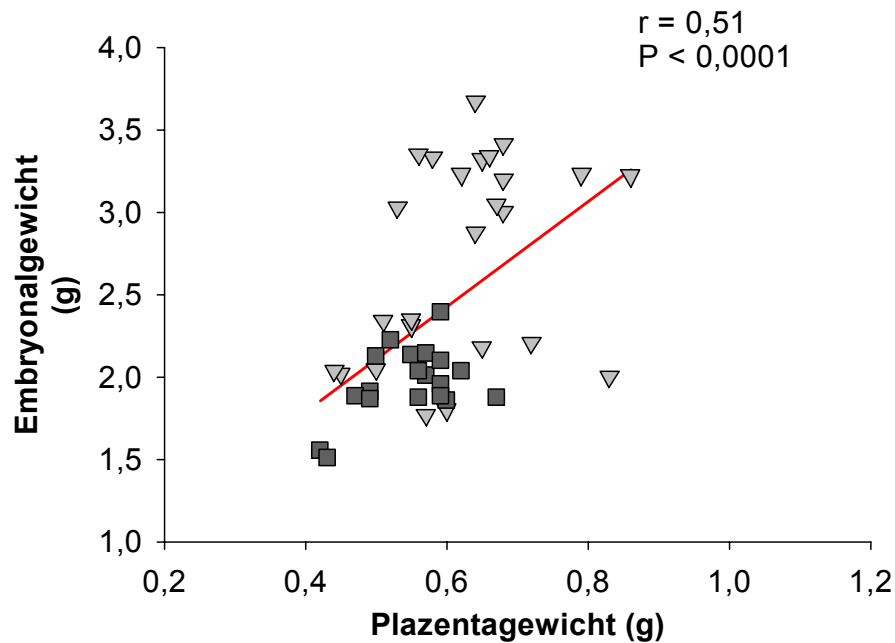


Abb. 23 Embryonalgewicht bezogen auf das Plazentagewicht (hellgraue Dreiecke= Wistarkontrollgruppe, dunkelgraue Vierecke= MWF-Gruppe)

Bei Plazentaperfusionsstörungen muss die Plazentamasse nicht vermindert sein, trotzdem kann es zu einer Abnahme der Nephronanzahl kommen. So konnten Gilbert *et al.* experimentell eine Abnahme der Nephronzahl durch Induktion einer uterinen Ischämie und damit einer Plazentainsuffizienz nach Gabe von Aminoglykosiden erzeugen, wobei schon eine geringe Abnahme der Nephronzahl zur Entwicklung einer Glomerulosklerose im adulten Tier führte [27].

Es ist bekannt, dass Neugeborene mit niedrigem Geburtsgewicht eine Prädisposition für kardiovaskuläre Erkrankungen im Erwachsenenalter haben. Fetale Mangelernährung hat zwei Hauptursachen, zum Einen die mütterliche Mangelernährung und zum Anderen die Plazentainsuffizienz. Eine Unterscheidung dieser Ursachen ist insofern wichtig, da in Populationen, in denen die fetale Wachstumsretardierung untersucht wurden größtenteils eine ausreichende mütterliche Ernährung gewährleistet war. Daher ist die Plazentainsuffizienz der wahrscheinlichere Grund für eine fetale Wachstumsrestriktion in adäquat ernährten Populationen. Die Plazentainsuffizienz ist hauptsächlich durch eine unzureichende uteroplazentare Vaskularisierung an der gemeinsamen Oberfläche bedingt. Frauen mit Plazentainsuffizienz-Syndromen wie Präeklampsie oder idiopathischer intrauteriner Wachstumsretardierung haben selbst eine erhöhte Prävalenz an Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen. Diese maternalen Risikofaktoren erhöhen das Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen bei den Nachkommen im Erwachsenenalter.

Hierbei kommt es zur Überschneidung genetischer Faktoren mit der gestörten uteroplazentaren Vaskularisierung [39; 47].

Ein Zusammenhang zwischen intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR) und einer niedrigen Nephronzahl konnte beim Menschen gezeigt werden (Abb.24) [42; 45; 74 ].

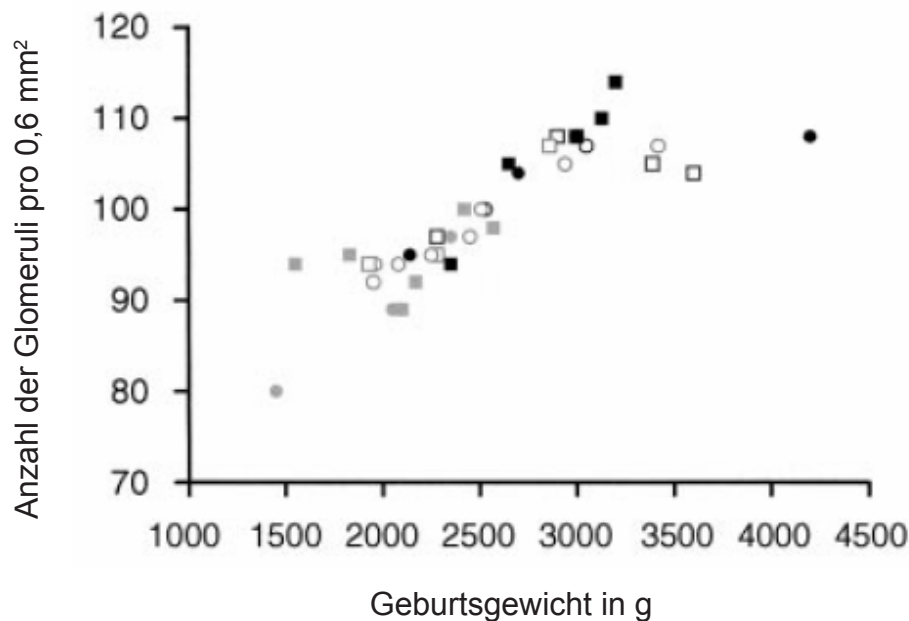


Abb. 24 Anzahl der glomeruli in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht nach Manalich et al. [74]

Eine Reduktion der Nephronzahl wurde in verschiedenen Tiermodellen mit induziertem niedrigem Geburtsgewicht genauso wie mit spontan erniedrigtem Geburtsgewicht beschrieben. Schreuder *et al.* verglichen in Ihrer Studie an verschiedenen Rattenmodellen die Nephronzahl bei natürlich aufgetretener *versus* experimentell induzierter Wachstumsretardierung durch bilaterale Ligatur der Arteriae uterinae. Ergebnis war die Reduktion der Nephronzahl um ca. 20% sowie die Zunahme des glomerulären Volumens assoziiert mit einer zunehmenden Proteinurie in beiden Untersuchungskollektiven [97].

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Brenner-Barker-Hypothese. Sie zeigt, dass eine intrauterine Wachstumsverzögerung mit einem angeborenem Nephronmangel einhergeht.

### 5.3. IGF-I und IGF-II

#### 5.3.1. IGF-I

Die immunhistologische Analyse zeigte in beiden Kollektiven eine deutliche Expression des IGF-I in den tubulären und glomerulären Strukturen der sich entwickelnden Niere, die vom Embryonaltag E19 zum Tag D70 abnahm (Abb. 3, 4, 5, 6).

Zwischen der MWF- und der Wistarkontrollgruppe gab es quantitativ keinen Hinweis auf eine signifikant differente Expression an allen Entwicklungstagen (Abb. 3, 4).

Duong *et al.* wiesen bei Untersuchungen an Ratten eine ubiquitäre Expression des IGF-I in mesenchymalen und epithelialen Strukturen nach, die *post partum* massiv anstieg. Auch fanden sie die Expression von IGF-I und IGF-II in den frühen Stadien der Nephrogenese sowohl in nicht induziertem Mesenchym, als auch in unreifen epithelialen Strukturen stark erhöht [22]. Auch Hirschberg *et al.* konnten IGF-I ab dem Embryonaltag E13 in der Rattenniere nachweisen [43].

Die Bedeutung der IGF für die Nephrogenese wurde über IGF-blockierende-Antikörper an Organkulturen *in vitro* nachgewiesen. Darüber hinaus zeigten knockout-Modelle für IGF-I, IGF-II und den IGF-I-Rezeptor schwere fetale Fehlbildungen [4; 69; 92; 113].

Bei Untersuchungen an Ratten wurde eine ubiquitäre Expression des IGF-I in mesenchymalen und epithelialen Strukturen nachgewiesen, die *post partum* massiv anstieg [64; 76; 75].

Rogers *et al.* konnten die Genexpression von IGF-I in den Sammelrohren nachweisen und zeigen, dass IGF-I bzw. das Zusammenspiel mehrerer Wachstumsfaktoren mit IGF-I für eine längere Zeit Einfluss auf die Nierenentwicklung nehmen [91].

In Kulturmedien wurde nachgewiesen, dass die Produktion von IGF-I und IGF-II für die Entwicklung der Niere bei der Ratte essentiell sind [36; 67; 92].

Shoba *et al.* untersuchten die Expression von IGF-I und den zugehörigen Wachstumsrezeptoren in verschiedenen Geweben an der Ratte. Hierbei zeigte sich auf mRNA-Ebene ein deutlicher Anstieg von IGF-I in der Leber zwischen dem Embryonaltag E17 und dem Tag 45 postnatal. Danach fielen die Werte ab. In der Niere zeigte sich eine leichte Erhöhung von IGF-I zwischen der frühen postnatalen Periode und einem Alter von vier Mona-

ten. Die Veränderungen im Bereich der Rezeptoren waren gewebespezifisch positiv mit den Veränderungen von IGF-I assoziiert [100].

Mehrere Autoren bestätigten anhand unterschiedlicher Methoden, dass die IGF für die Organogenese essentiell sind. In der Rattenniere ist IGF-I bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt, dem Embryonaltag E13 nachweisbar [43]. Die Konzentration steigt postpartal weiter an. IGF-I konnte in allen renalen Strukturen nachgewiesen werden. Es hat sowohl Einfluss auf die Tubulogenese, als auch auf die Nephronzahl. Wie bereits beschrieben weist jede Spezies für die Niere andere Entwicklungszeiten auf (Tabelle 1). Die postpartale Entwicklung der IGF-Konzentration bis zur voll entwickelten Niere ist bisher kaum untersucht.

Entgegen den Befunden von Duong *et al.* und Shoba *et al.* zeigte sich in der immunhistologischen Analyse unserer Untersuchungen *post partum* eine verminderte IGF-I-Expression, die im Untersuchungsverlauf weiter abnahm. Die erhöhte renale Expression an IGF-I konnte durch die immunhistologische Untersuchung am Tag E19 bestätigt werden (Abb.3, 4).

Die frühe Expression des IGF-I zeigt, dass die größte Bedeutung des IGF-I in der Beeinflussung der Tubulogenese und der Entwicklung der glomerulären Strukturen zu liegen scheint. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der oben genannten Autoren, die mit anderen Untersuchungsmethoden ebenfalls erhöhte IGF-I-Level in den frühen Abschnitten der Nephrogenese beschrieben. Auch die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten entgegen dem deutlichen Abfall der hepatischen IGF-I Expression eine erhöhte renale mRNA- und Proteinexpression des IGF-II-Rezeptors und des IGFBP-3 am Tag E19 der fetalen Entwicklung, jedoch nicht *post partum* am Tag D7. Die Ergebnisse weisen auf ein relevantes Defizit in der renalen Bioverfügbarkeit des freien (effektiven) IGF-I und -II nur während der pränatalen Phase der Nephrogenese im MWF-Stamm [95].

Die verminderte Expression in der adulten Rattenniere bei beiden untersuchten Stämmen ist ein Hinweis auf einen feedback-Mechanismus sein, der bei ausgereifter Niere zu einer verminderten Expression des IGF-I führt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Einfluss des IGF-I auf die Nephrogenese im Rattenmodell besteht, da es im untersuchten Zeitgang dynamisch exprimiert wird. Dies konnte anhand unserer Untersuchungen bestätigt werden. Ein direkter Einfluss des para-/autokrinen IGF-I der Niere sowohl im MWF- als auch im Wistarstamm liess sich jedoch in den immunhistologischen Untersuchungen der vorgelegten Arbeit nicht nachweisen. Um



den direkten parakrinen/ autokrinen Einfluss in der Nephrogenese aufzuklären, sind weitere Untersuchungen z.B. mit einer IGF-Applikation während der Gestation notwendig.

### **5.3.2. IGF-II**

In der vorgelegten Arbeit findet sich bei der immunhistologischen Untersuchung im Zeitgang vom Tag E19 bis zum Tag D70 eine gleichbleibende IGF-II-Expression in den tubulären Abschnitten der Rattenniere (Abb. 6).

Die Analyse der Glomeruli zeigte eine signifikante Minderung der Expression bis zum Tag D7 und im weiteren Verlauf konstante Werte. (Abb. 5).

Der Vergleich der beiden Tiermodelle zeigte zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikante quantitative Unterschiede. (Abb. 7, 8, 9, 10).

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an Ratten zeigten eine Verminderung der IGF-II-mRNA bei fortschreitender Nierenreifung. Dabei beschränkte sich die IGF-II-Expression auf die parietalen Epithelzellen und Podozyten während der späten Stadien der Nephrogenese [64; 76].

Bei Mäusen kommt es im Verlauf der Nephrogenese zunächst zu einem isolierten Anstieg des IGF-II am Gestationstag E11 und 13,5. Erst ab dem Embryonaltag 13,5 steigen auch IGF-I und der IGF-I-R an. Die Ursache für diesen versetzten Anstieg der Wachstumsfaktoren ist bisher ungeklärt [4].

Die Untersuchung der mRNA-Expression von IGF-II bei Rhesusaffen ergab ein erhöhtes Level an IGF-II in der sich entwickelnden Niere im Bereich des Interstitiums, der tubulären Strukturen und der Bowman-Kapsel. Mit fortschreitender Trächtigkeitsdauer verminderte sich der Anteil des IGF-II. So zeigten sich zum Ende der Tragzeit deutlich niedrigere IGF-II-Werte in parietalen Epithelzellen und Tubuluskonvoluten [58].

Zur intrauterinen Expression des IGF-II in menschlichen Nieren sind in der gängigen Literatur bisher keine Angaben verfügbar. Postnatal konnte IGF-II nachgewiesen werden [83].

Es zeigt sich also in den Untersuchungen verschiedenener Säugetierspezies (Rhesusaffen, Mäuse und Ratten) eine Abnahme der renalen IGF-II-Expression mit fortschreitender Nierenreifung. Bei den Rhesusaffen und den Ratten wurde die Untersuchung auf mRNA-Ebene durchgeführt, was die Ergebnisse vergleichbar macht.

Auch die immunhistologische Analyse in der vorgelegten Arbeit ergab in den Glomeruli einen signifikanten Abfall der Expression bis zum Tag D7. Dies bestätigt damit die Ergebnisse von Lee *et al.* und Lindenbergh Kortleve *et al.* [58, 64].

Zusammenfassend bestätigt die abnehmende glomeruläre Expression des IGF-II sowohl im Wistar- als auch im MWF-Stamm (Abb. 7) die Untersuchungsergebnisse anderer Säugetierspezies. Dies ist ein Hinweis auf die Bedeutung des IGF-II in der frühen glomerulären Reifung. Immunhistologisch ergaben sich keine Unterschiede in der glomerulären/ tubulären Expression des IGF-II zwischen Wistar- und MWF-Tieren. Somit ist ein direkter Einfluss des para-/autokrinen IGF-Systems der Niere sowohl im MWF- als auch im Wistarstamm als Ursache für den angeborenen Nephronmangels im MWF-Stamm immunhistologisch nicht nachzuweisen.

#### 5.4. IGF-I-R

Der IGF-I-R ist bisher wenig untersucht. Er ist Bindungsstelle für freies IGF-I und IGF-II. Es handelt sich um einen Zelloberflächenrezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität.

Die immunhistologische Untersuchung zeigt eine starke Expression des IGF-I-R ausschliesslich in den tubulären Strukturen (Abb. 12, 13, 14). Die tubuläre Expression konnte vor allem in den corticalen Nierenabschnitten beobachtet werden. Im Verlauf der Nephrogenese wurde er als einziger der untersuchten Parameter zunehmend exprimiert (Abb. 12). Dabei bestand kein quantitativer Unterschied zwischen Wistar- und MWF-Stamm (Abb. 12).

In der menschlichen Niere und auch bei Mäusen wird der IGF-I-R vor allem in den Glomeruli, in den corticalen Tubuli und in den ableitenden Harnwegen, aber auch im Nierenmark und in den renalen Gefässen exprimiert [30; 84; 109].

Bei Mäusen wurde für den IGF-I-R in der frühen Entwicklungsphase am Embryonaltag E13 mittels Northern blot die stärkste Expression nachgewiesen. Danach fiel sie im Laufe der Entwicklung ab. In einem Gegenexperiment wurden *Antisense-oligodeoxynucleotide* in Organkultursystemen verabreicht. Daraus resultierte eine Hemmung des Nierenwachstums, eine verminderte Nephronenzahl und Fehlbildungen im Bereich der ableitenden Harnwege. Die Immunpräzipitation zeigte nach dieser Behandlung eine deutlich verminderte Biosynthese verschiedener Extrazellulärer-Matrix-Proteine, die als physiologische Regulatoren der Morphogenese dienen [66; 109].

Shoba *et al.* zeigten in der Niere eine leichte Erhöhung von IGF-I zwischen der frühen postnatalen Periode und einem Alter von vier Monaten. Die Veränderungen im Bereich der Rezeptoren waren gewebespezifisch positiv mit den Veränderungen von IGF-I assoziiert [100].

Entgegen den Ergebnissen von Grone, Ong und Wada konnte der IGF-I-R mittels Immunhistochemie ausschliesslich tubulär nachgewiesen werden. In den genannten Arbeiten war der Nachweis des IGF-I-R jedoch an ausgereiften Nieren von Mäusen und Menschen erfolgt [30, 84, 109]. Die Ergebnisse dieser Arbeit gehen mit den Beobachtungen Shobas konform, die ebenfalls einen Anstieg des IGF-I-R in der Niere befundete. In Shobas Arbeit war keine Unterscheidung zwischen den spezifischen Strukturen erfolgt [100]. Allerdings zeigte unsere immunhistochemische Analyse bereits einen Anstieg um den Geburtszeitpunkt und nicht wie bei Shoba erst in der postnatalen Phase. Die Ursache kann in der unterschiedlichen Auswahl der Methode und der Untersuchungszeitpunkte ( Shoba: frühe postnatale Periode und Tag 45, Immunhisto: präpartal Tag E19, Postnatal D1, D7, D12, D70) liegen. Die Beurteilung des weiteren Zeitverlaufs zeigte mittels Immunhistochemie in beiden Gruppen einen kontinuierlichen Anstieg des IGF-I-R im Verlauf der Nierenentwicklung bis zum 12. Lebenstag. Im weiteren Verlauf kam es bis zum Tag D70 zu keiner weiteren Veränderung der Expression. Dagegen beschrieben Shoba *et al.* eine Abnahme der Expression nach dem Tag 45 postnatal.

Da die Nierenentwicklung bei der Ratte erst am 13.Tag *post partum* abgeschlossen ist, spricht der Kurvenverlauf für einen deutlichen Einfluss des IGF-I-R auf die Tubulogenese.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein sicherer Einfluss des IGF-I-R auf die Nephrogenese im Rattenmodell besteht. Ein direkter Einfluss des IGF-I-R der Niere sowohl im MWF- als auch im Wistarstamm liess sich im Rahmen der immunhistologischen Untersuchungen der vorgelegten Arbeit nicht nachweisen. Ein theoretischer Untersuchungsansatz wäre die selektive pharmakologische Blockade des IGF-I-R.

Die erhobenen Daten in beiden untersuchten Gruppen gehen mit den erhobenen Daten der oben genannten Autoren konform und sind ein deutlicher Hinweis auf eine Beteiligung des IGF-I-R an der Nephrogenese.

## 5.5. IGFBP-1

Die immunhistologische Analyse ergab in beiden untersuchten Kollektiven sowohl tubulär als auch glomerulär eine konstante Expression im gesamten Untersuchungszeitraum (Abb. 15, 16, 17, 18).

Zwischen den untersuchten Gruppen zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in der Expression des IGFBP-1 (Abb. 15, 16).

Die Untersuchung des Zeitverlaufs ergab in beiden Gruppen keine signifikanten Veränderungen (Abb. 15, 16).

IGFBP-1 hemmt die Wirkungen des IGF-I und zählt damit zu den wichtigen Faktoren der Wachstumsretardierung und des verminderten Geburtsgewichts. Unterman *et al.* bestätigten diese Ergebnisse durch Immunoblot an Ratten [107].

Untersuchungen an Schafsfeten zeigten bei langanhaltender Hypoxie eine verminderte IGF-I-, -II- und IGFBP-1-mRNA Expression in Leber und Nieren [77].

Ein transgenes Mausmodell mit Überexpression des humanen IGFBP-1 (niedrige IGF-Wirkspiegel) zeigte eine intrauterine Wachstumsretardierung, eine Reduktion der Nephronzahl und eine Glomerulosklerose in den adulten Tieren. Tatsächlich ist in diesem Modell die Nephronzahl sogar von nicht-transgenen Nachkommen heterozygoter Mütter erniedrigt [21].

In der Literatur gibt es bisher keine Angaben zum Verlauf der IGFBP-1-Expression während der Nephrogenese. Es gibt jedoch, wie oben gezeigt, Untersuchungen, die den Einfluss des IGFBP-1 auf Wachstum und Organogenese bestätigen. Die immunhistologischen Untersuchungen zeigten entgegen den Ergebnissen von Mc Lellan *et al.* und Doublier nicht den zu erwartenden Anstieg der Expression des IGFBP-1 bei den adulten Tieren der MWF-Gruppe als Hinweis auf die fortschreitende Nierenschädigung.

Nach den Untersuchungen von Untermann [107] wäre aufgrund der Wachstumsretardierung und des verminderten Geburtsgewichts auch ein vermehrter Nachweis des IGFBP-1 pränatal in der MWF-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erwarten gewesen. Dies konnte mittels Immunhistochemie nicht nachgewiesen werden.

Als Ergebnis unserer Untersuchungen war die Expression von IGFBP-1 in den tubulären und glomerulären Abschnitten der Niere vom Tag E19 bis zum Tag D70 nicht dynamisch reguliert. Damit bleibt die Bedeutung des IGFBP-1 während der Nephrogenese ungeklärt.

## 5.6. IGFBP-3

Die immunhistologische Analyse zeigte eine Expression von IGFBP-3 in den tubulären Abschnitten der Niere vom Tag E19 bis zum Tag D70 mit nahezu konstantem Verlauf (Abb. 20). Dagegen kam es postnatal in den glomerulären Abschnitten zu einer wechselnden Expression des IGFBP-3. Vom Tag E19 bis zum Tag D12 fiel in beiden Gruppen die Expression signifikant ab. Anschliessend zeigte sich ein erneuter Anstieg bis zum Tag D70 (Abb.19).

Zwischen den Untersuchungskollektiven zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede (Abb. 19, 20).

Lee *et al.* zeigten an fetalen Nieren von Rhesusaffen hohe IGFBP-3-Level im zweiten Drittel der Tragzeit im Bereich der sich entwickelnden Nephrone, dem umgebenden Parenchym und dem sich entwickelnden Ureter. Diese Werte nahmen im dritten Trimester der Tragzeit ab [58].

Auch Matsell *et al.* konnten IGFBP-3-mRNA im Ureter, in menschlichen Sammelrohrepi-thelien und im Nierenbeckenkelchsystem nachweisen [75].

Beide Autoren beschrieben den Nachweis von IGFBP-3 in den renalen Anteilen, die sich aus dem Urnierengang entwickeln. Lee *et al.* konnten zudem zeigen, dass auch im metanephrogenen Gewebe IGFBP-3 exprimiert wird.

Die Nierenentwicklung ist bei Rhesusaffen ähnlich der beim Menschen mit der Geburt abgeschlossen [58]. Dies erklärt die bereits im letzten Drittel der Tragzeit sinkende IGFBP-3-Expression. Der postnatale Verlauf des IGFBP-3-Spiegels wurde von Lee *et al.* nicht untersucht. Damit ist die Vergleichbarkeit der Experimente eingeschränkt.

Die Daten der vorgelegten Arbeit zeigten bei der Ratte im Rahmen der immunhistologischen Untersuchungen *post partum* eine deutliche Expression des IGFBP-3 bis hin zum Erwachsenenalter, wobei die Nephrogenese hier erst am postnatalen Tag D13 abgeschlossen ist. Die persistierende Expression darüber hinaus kann Hinweis auf die Beteiligung des ternären Komplex aus IGF-I, ALS und IGFBP-3 an den Umbauprozessen der

chronischen Niereninsuffizienz sein. Dafür spricht der hier gezeigte temporäre Abfall der glomerulären Expression bis zum Tag D12 (Abb. 19), an dem die Nephrogenese weitgehend abgeschlossen ist. Dies entspricht also dem physiologischen Verlauf. Bis zum Tag D70 kam es zum erneuten Anstieg in den Glomeruli. Da sich die Folgen der chronischen Umbauvorgänge vor allem in den Nephronen finden, kann dies ein Hinweis auf die Beteiligung des Komplexes an diesem Pathomechanismus sein. Allerdings wäre in diesem Fall eine deutlich höhere Expression am Tag D70 in der MWF-Gruppe zu erwarten, da die MWF-Tiere eine deutliche Proteinurie und Glomerulosklerose aufweisen.

Die molekularbiologische Analyse des renalen IGFBP-3 in unserer Arbeitsgruppe am Embryonaltag E19 ergab eine signifikante Erhöhung des renalen IGFBP-3 in der MWF-Gruppe im Vergleich mit der Wistarkontrollgruppe, nicht jedoch postpartal. Die Ergebnisse weisen auf ein relevantes Defizit in der renalen Bioverfügbarkeit des freien (effektiven) IGF-I and -II nur während der pränatalen Phase der Nephrogenese im MWF-Stamm (Real-Time-PCR, ELISA) hin [95].

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich auch mittels Immunhistochemie ein möglicher Einfluss des IGFBP-3 auf die Entwicklung renaler Strukturen nachweisen lässt. Die Unterschiede in der Expression auf mRNA-Ebene am Tag E19 zugunsten der MWF-Gruppe legen die Vermutung nahe, dass IGFBP-3 an der Entwicklung des Hypertonus und der progredienten Niereninsuffizienz beteiligt sind [95]. Welche Rolle ihnen dabei genau zukommt, bleibt noch in weiteren Experimenten zu klären.

Ein direkter Einfluss des IGFBP-3 der Niere sowohl im MWF- als auch im Wistarstamm liess sich jedoch in den immunhistologischen Untersuchungen der vorgelegten Arbeit nicht nachweisen.

## 5.7. Fehlerdiskussion

Die Verfahren der immunhistochemischen Färbungen zur Identifizierung von Histogenese und speziellen Differenzierungsrichtungen können durch Spezifität und Sensitivität charakterisiert werden. Dies sind die Kenngrößen für die Eigenschaften der verwendeten Tests. Sie sind abhängig vom Paraffinmaterial, dem Erhaltungszustand der Gewebe, der Vorbehandlung der Schnitte, den verwendeten Antikörpern, dem Detektionssystem und den Auswertungskriterien. Diese Faktoren sind wenig standardisiert, so dass in verschiedenen Laboren unterschiedliche Sensitivitäten und Spezifitäten ermittelt werden können. Aufgrund dieser Probleme entstehen widersprüchliche, nicht immer miteinander zu vergleichende Literaturangaben zu bestimmten Markern.

Auch der immunhistologische Vergleich von Gewebeschnitten ist mit Problemen behaftet. So finden sich am Objektrand häufig Artefakte, die das Ergebnis falsch positiv beeinflussen können. Aufgrund der geringen Oberfläche vor allem der embryonalen Nieren wurden Färbungen am Objektrand bis zum Tag D1 mit bewertet.

## 6. Zusammenfassung und Perspektiven

Der angeborene Nephronmangel ist ein zentraler Faktor für die Pathogenese der essentiellen arteriellen Hypertonie und kardiovaskulärer Erkrankungen.

Ein wichtiger Mediator des fetalen Wachstums und der Nephrogenese ist das IGF-System.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Bedeutung des renalen IGF-Systems für die parakrine und autokrine Regulation der Nephrogenese in einem Tiermodell mit angeborenem Nephronmangel zu untersuchen. Dazu wurde das MWF-Rattenmodell ausgewählt. Es ist charakterisiert durch einen arteriellen Hypertonus, eine Proteinurie, eine progrediente chronische Niereninsuffizienz und zunehmende Glomerulosklerose.

Mit immunhistologischen Methoden wurden im Einzelnen folgende Komponenten des renalen IGF-Systems analysiert: IGF-I, IGF-II, IGF-I-R, IGFBP-1 und IGFBP-3. Die Untersuchungen erfolgten im Zeitgang während der Nierenreifung und hinsichtlich der Lokalisation in spezifischen renalen Strukturen (Glomeruli, Tubuli).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass alle untersuchten Parameter deutlich in der sich entwickelnden Niere exprimiert werden. Zwischen dem oligonephronen MWF-Modell und dem gesunden Wistarmodell zeigten sich bei keinem der Parameter des IGF-Systems zu den verschiedenen untersuchten Zeitpunkten signifikante quantitative Stammunterschiede.

Im Gegensatz zu den fehlenden Stammunterschieden konnte in dieser Arbeit erstmalig die Dynamik der Proteinexpression der Komponenten des IGF-Systems während der Nephrogenese dargestellt werden. IGF-I zeigt mit zunehmendem Entwicklungsalter tubulär eine kontinuierlich abnehmende Expression. Das unterscheidet sich von IGF-II, IGFBP-1 und IGFBP-3. Diese Parameter sind tubulär konstant hochreguliert. Dagegen zeigte die Untersuchung des IGF-I-R im Zeitverlauf eine zunehmende Expression in den Tubuli.

Glomerulär zeigte sich für IGF-I eine signifikante Abnahme der Expression im Zeitverlauf. Die Expression von IGF-II im glomerulären Bereich nahm im Zeitgang in beiden Gruppen bis zum Tag D7 signifikant ab. Danach kam es sowohl bei den MWF-Tieren als auch in der Wistarkontrollgruppe zu einer nahezu konstanten Expression. Der IGF-I-R wurde in den Glomeruli nicht nachgewiesen. IGFBP-1 blieb im gesamten Untersuchungsverlauf



konstant hochreguliert. IGFBP-3 zeigte bis zum Tag D12 eine abnehmende Expression, die bis zum Tag D70 nochmals anstieg.

Die vorliegende Arbeit gibt Hinweise auf mögliche Wechselwirkungen innerhalb des IGF-Systems während der Nephrogenese. Welche spezifischen Wechselwirkungen Einfluss auf glomeruläre und tubuläre Reifung nehmen, bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären.

In dieser Arbeit wurde die dynamische Regulation der Expression des renalen IGF-Systems während der Nephrogenese dargestellt. Zukünftigen Studien bleibt es vorbehalten das mögliche therapeutische Potential einer Stimulation des IGF-Systems (zum Beispiel durch eine IGF-I-Applikation) während der kritischen Phase der Nierenentwicklung (Gravidität, postnatale Reifungsperiode) zu belegen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Avner ED, Sweeney WEJ, Piesco NP, Ellis D: Growth factor requirements of organogenesis in serum-free metanephric organ culture. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1985;21: 297-304.
2. Azar S, Johnson MA, Hertel B, Tobian L: Single-nephron pressures, flows, and resistances in hypertensive kidneys with nephrosclerosis. *Kidney Int.* 1977; 12: 28-40.
3. Baer PG, Bianchi G, Liliana D: Renal micropuncture study of normotensive and Milan hypertensive rats before and after development of hypertension. *Kidney Int.* 1978; 13: 452-466.
4. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, *et al.*: Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell.* 1993 Oct 8;75(1):73-82.
5. Barker DJ.: The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl* 2004 Dec;93(446):26-33.
6. Barker DJ, Osmond C, Golding J, *et al.*: Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ.* 1989 Mar 4;298(6673):564-7.
7. Baxter RC.: Insulin-like growth factor binding proteins as glucoregulators. *Metabolism.* 1995 Oct;44(10 Suppl 4):12-7.
8. Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000 Jun;278(6):E967-76.
9. Baxter RC.: Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review. *Horm Res.* 1994;42(4-5):140-4.
10. Bianchi G, Fox U, Di Francesco GF, *et al.*: Blood pressure changes produced by kidney cross-transplantation between spontaneously hypertensive rats and normotensive rats. *Clin Sci Mol Med.* 1974 Nov;47(5):435-48.
11. Blaustein MP, Hamlyn JM: Pathogenesis of essential hypertension. A link between dietary salt and high blood pressure, *Hypertension* 1991; 184-195.
12. Brenner BM.: Nephron adaption to renal injury or ablation. *Am J Physiol.* 1985; 249: F324- F337.
13. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S.: Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens.* 1988 Oct;1(4 Pt 1):335-47.
14. Butler AA, LeRoith D: Minireview: Tissue-Specific *Versus* Generalized Gene Targeting of the *igf1* and *igf1r* Genes and Their Roles in Insulin-Like Growth Factor Physiology. *Endocrinology* 142: 1685-1688, 2001.
15. Cowley AW Jr, Mattson DL, Lu S, Roman RJ.:The renal medulla and hypertension.*Hypertension.* 1995 Apr;25(4 Pt 2):663-73. Review.
16. Curtis JJ, Luke RG, Dustan HP, *et al.*: Remission of essential hypertension after renal transplantation. 1983. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Dec;11(12):2404-12.
17. Dahl LK, Heine M, Thompson K.: Genetic influence of the kidneys on blood pressure. Evidence from chronic renal homografts in rats with opposite predispositions to hypertension. *Circ Res.* 1974 Jan;40(4):94-101.

18. Dean RG, Bach LA, Burrell LM.: Upregulation of cardiac insulin-like growth factor-I receptor by ACE inhibition after myocardial infarction: potential role in remodeling. *J Histochem Cytochem.* 2003 Jun;51(6):831-9.
19. DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ.: A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature.* 1990 May 3;345(6270):78-80.
20. Deutscher Circ 1966, Grim J Lab Clin Med 1979, Falkener B, Onesti G, Hayes P.: The role of sodium in essential hypertension in genetically hypertensive adolescents. In Onesti G, Kim KE (Editoren): *Hypertension in the Young and the Old.* New York, NY, Grune & Stratton, 1981, 29-35.
21. Doublier S, Amri K, Seurin D, Moreau E, Merlet-Benichou C, Striker GE, Gilbert T.: Overexpression of human insulin-like growth factor binding protein-1 in the mouse leads to nephron deficit. : *Pediatr Res.* 2001 May;49(5):660-6.
22. Duong Van Huyen JP, Amri K, *et al.*: Spatiotemporal distribution of insulin-like growth factor receptors during nephrogenesis in fetuses from normal and diabetic rats. *Cell Tissue Res.* 2003 Dec;314(3):367-79. Epub 2003 Oct 2.
23. Dunnill MS, Halley W.: Some observations on the quantitative anatomy of the kidney. *J Pathol.* 1973 Jun;110(2):113-21.
24. Ekblom M, Klein G, Mugrauer G, *et al.*: Transient and locally restricted expression of laminin A chain mRNA by developing epithelial cells during kidney organogenesis. *Cell* 1990;60: 337-346.
25. Fassi A, Sangalli F, Maffi R, Colombi F, Mohamed EI, Brenner BM, Remuzzi G, Remuzzi A.: Progressive glomerular injury in the MWF rat is predicted by inborn nephron deficit. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Aug;9(8):1399-406.
26. Feld S, Hirschberg R.: Growth hormone, the insulin-like growth factor system, and the kidney. *Endocr Rev.* 1996 Oct;17(5):423-80.
27. Gilbert T, Lelievre-Pegorier M, Merlet-Benichou C.: Immediate and long-term renal effects of fetal exposure to gentamicin. *Pediatr Nephrol.* 1990 Jul;4(4):445-50.
28. Goldblatt H: The renal origin of hypertension. *Physiol. Rev.* 1947; 27:120-65.; Cowley AW Jr, Mattson DL, Lu S, Roman RJ. The renal medulla and hypertension. *Hypertension.* 1995 Apr;25(4 Pt 2):663-73. Review.
29. Grond J, Beukers JY, Schilthuis MS, Weening JJ, Elema JD: Analysis of renal structural and functional features in two rat strains with a different susceptibility to glomerular sclerosis. *Lab. Invest.* 1986; 54: 77-83.
30. Grone HJ, Neumann P, Fuchs E.: Localization and characterization of IGF-I receptors in fetal and adult human kidneys. *Miner Electrolyte Metab.* 1992;18(2-5):256-63.
31. Guron G, Marcussen N, Nilsson A, *et al.*: Postnatal time frame for renal vulnerability to enalapril in rats. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Jul;10(7):1550-60.
32. Guyton AC, Coleman TG, Cowley AV Jr, Scheel KW, Manning RD Jr, Norman RA Jr.: Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med.* 1972 May;52(5):584-94.
33. Hackbarth H, Buttner D, Jarck D, Pothmann M, Messow C, Gartner K.: Distribution of glomeruli in the renal cortex of Munich Wistar Fromter (MWF) rats. *Ren Physiol.* 1983;6(2):63-71.

34. Hakim RM, Goldszer RC, Brenner BM.: Hypertension and proteinuria: long-term sequelae of uninephrectomy in humans. *Kidney Int.* 1984 Jun;25(6):930-6.
35. Hammerman MR, Ryan G, Miller SB.: Expression of insulin-like growth factor in adult and embryonic kidney. *Miner Electrolyte Metab.* 1992;18(2-5):253-5.
36. Hammerman MR, Rogers SA, Ryan G.: Growth factors and kidney development. *Pediatr Nephrol.* 1993 Oct;7(5):616-20.
37. Hardy R, Kuh D, Langenberg C, Wadsworth ME.: Birthweight, childhood social class, and change in adult blood pressure in the 1946 British birth cohort. *Lancet.* 2003 Oct 11;362(9391):1178-83. *Lancet.* 2005 May;365(9471):1620.
38. Hatini V, Huh SO, Herzlinger D, *et al.*: Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev.*1996;10:1467-1478.
39. Henriksen T, Clausen T.: The fetal origins hypothesis: Placental insufficiency and inheritance versus maternal malnutrition in well-nourished populations. *Acta Obstet Gynecol Scand* 81 : 112 –114, 2002.
40. Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, *et al.*: Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res.*1995;55: 5386-5389.
41. Hill DJ, Hogg J, Petrik J, Arany E, Han VK. Cellular distribution and ontogeny of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding protein messenger RNAs and peptides in developing rat pancreas. *J Endocrinol.* 1999 Feb;160(2):305-17.
42. Hinchliffe SA, Lynch MR, Sargent PH, Howard CV, Van Velzen D.: The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons. *Br J Obstet Gynaecol.* 1992 Apr;99(4):296-301.
43. Hirschberg R, Adler S.: Insulin-like growth factor system and the kidney: physiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Am J Kidney Dis.* 1998 Jun;31(6):901-19.
44. Horster MF, Braun GS, Huber SM.: Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev.* 1999 Oct;79(4):1157-91.
45. Hughson M, Farris AB, Douglas-Denton R, *et al.*: Glomerular number and size in autopsy kidneys: The relationship to birth weight. *Kidney Int* 63 : 2113 –2122, 2003.
46. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG.: The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev.* 1999 Dec;20(6):761-87.
47. Ingelfinger JR, Woods LL.: Perinatal programming, renal development, and adult renal function. *Am J Hypertens,* 2002 Feb;15(2 Pt 2):46S-49S.
48. Jones JI, Clemmons DR.: Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995 Feb;16(1):3-34.
49. Julius S, Schork MA.: Predictors of hypertension. *Ann N Y Acad Sci.* 1978 Mar 30;304:38-58.
50. Kaplan NM.: *Clinical Hypertension.* Williams and Wilkins, Baltimore USA 5<sup>th</sup> Edition, 1994.

51. Kaufmann K, Hackbarth H.: Quantitative vergleichende Untersuchungen zur Bestimmung der Nierenkörperchenzahl bei der Munich- Wistar- Frömter- Ratte und der Wistar- cryptorchic- Ratte. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 1990; 265- 304.
52. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K.: Nephron number in patients with primary hypertension. N Engl J Med. 2003 Jan 9;348(2):101-8.
53. Komhoff M, Wang JL, Cheng HF, *et al.*: Cyclooxygenase-2-selective inhibitors impair glomerulogenesis and renal cortical development. Kidney Int.2000;57: 414-422.
54. Kreutz R, Kovacevic L, Schulz A, Rothermund L, Ketteler M, Paul M.: Effect of high NaCl diet on spontaneous hypertension in a genetic rat model with reduced nephron number. J Hypertens.2000;18: 777-782.
55. Kreutz R, Struk B, Rubattu S, *et al.*: Role of the alpha-, beta-, and gamma-subunits of epithelial sodium channel in a model of polygenic hypertension. Hypertension. 1997 Jan;29(1 Pt 1):131-6.
56. Kurokawa K.: Kidney, salt, and hypertension: how and why. Kidney Int Suppl. 1996 Jun;55:S46-51.
57. Langley SC, Jackson AA.: Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. Clin Sci (Lond). 1994 Feb;86(2):217-22; discussion 121.
58. Lee CI, Goldstein O, Han VK, Tarantal AF.: IGF-II and IGF binding protein (IGFBP-1, IGFBP-3) gene expression in fetal rhesus monkey tissues during the second and third trimesters. Pediatr Res. 2001 Mar;49(3):379-87.
59. Lee PD, Giudice LC, Conover CA, Powell DR.: Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions. Proc Soc Exp Biol Med. 1997 Dec;216(3):319-57.
60. Lee WH, Gaylord TD, Bowsher RR, Hlaing M, Moorehead H, Liechty EA.: Nutritional regulation of circulating insulin-like growth factors (IGFs) and their binding proteins in the ovine fetus. Endocr J. 1997 Feb;44(1):163-73.
61. Lelievre-Pegorier M, Merlet-Benichou C.: The number of nephrons in the mammalian kidney: environmental influences play a determining role. Exp Nephrol. 2000 Mar-Apr;8(2):63-5.
62. Levine RS, Hennekens CH, Jesse MJ.: Blood pressure in prospective population based cohort of newborn and infant twins. BMJ. 1994 Jan 29;308(6924):298-302.
63. Lifton RP.: Molecular genetics of human blood pressure variation. Science 1996;272: 676-680.
64. Lindenbergh-Kortleve DJ, Rosato RR, van Neck JW, Nauta J, van Kleffens M, Groffens C, *et al.*: Gene expression of the insulin-like growth factor system during mouse kidney development. Mol Cell Endocrinol. 1997 Sep 19;132(1-2):81-91.
65. Liu J, Rose JC.: Effects of insulin and insulin-like growth factor-I on renin gene expression in the renal cortical cells of ovine fetuses. : Arch Physiol Biochem. 2003 Feb;111(1):70-6.
66. Liu ZZ, Wada J, Alvares K, *et al.*: Distribution and relevance of insulin-like growth factor-I receptor in metanephric development. Kidney Int. 1993 Dec;44(6):1242-50.
67. Liu ZZ, Kumar A, Wallner EI, Wada J, Carone FA, Kanwar YS.: Trophic effect of insulin-like growth factor-I on metanephric development: relationship to proteoglycans. Eur J Cell Biol. 1994 Dec;65(2):378-91.

68. Luft FC, Rankin LI, Bloch R, Weyman AE, et al.: Cardiovascular and humoral responses to extremes of sodium intake in normal black and white men. *Circulation*. 1979 Sep;60(3):697-706.
69. Lumbers ER, Yu ZY, Gibson KJ.: The selfish brain and the barker hypothesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001 Nov;28(11):942-7.
70. Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, et al.: BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev*. 1995;9: 2808-2820.
71. Macconi D, Ghilardi M, Bonassi ME, et al.: Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular basement membrane permeability and distribution of zonula occludens-1 in MWF rats. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Mar;11(3):477-89.
72. Mackenzie HS, Lawler EV, Brenner BM.: Congenital oligonephropathy: The fetal flaw in essential hypertension? *Kidney Int Suppl*. 1996 Jun;55:S30-4.
73. Madden SL, Cook DM, Morris JF, et al.: Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product. *Science* 1991;27. 253: 1550-1553.
74. Manalich R, Reyes L, Herrera M, et al.: Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney Int*. 2000 Aug;58(2):770-3.
75. Matsell DG, Bennett T.: Evaluation of metanephric maturation in a human fetal kidney explant model. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1998 Feb;34(2):138-48.
76. Matsell DG, Delhanty PJ, Stepaniuk O, et al.: Expression of insulin-like growth factor and binding protein genes during nephrogenesis. *Kidney Int*. 1994 Oct;46(4):1031-42.
77. McLellan KC, Hooper SB, Bocking AD, et al.: Prolonged hypoxia induced by the reduction of maternal uterine blood flow alters insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) and IGFBP-2 gene expression in the ovine fetus. *Endocrinology*. 1992 Oct;131(4):1619-28.
78. Merlet-Benichou C, Gilbert T, Muffat-Joly M, Lelievre-Pegorier M, Leroy B.: Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. *Pediatr Nephrol*. 1994 Apr;8(2):175-80.
79. Merlet-Benichou C, Gilbert T, Vilar J, et al.: Nephron number: variability is the rule. Causes and consequences. *Lab Invest* 1999 May;79(5):515-27.
80. Mugrauer G, Ekblom P.: Contrasting expression patterns of three members of the myc family of protooncogenes in the developing and adult mouse kidney. *J Cell Biol*. 1991;112: 13-25.
81. Muirhead EE.: Renal vasodepressor mechanisms: the medullipin system. *J Hypertens Suppl*. 1993 Dec;11(5):S53-8.
82. Nissley P, Lopaczynski W.: Insulin-like growth factor receptors. *Growth Factors*. 1991;5(1):29-43.
83. O'Dell SD, Day IN.: Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int J Biochem Cell Biol*. 1998 Jul;30(7):767-71.
84. Ong K, Kratzsch J, Kiess W, et al.: Size at birth and cord blood levels of insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-1 (IGFBP-1), IGFBP-3, and the soluble IGF-II/mannose-6-phosphate receptor in term human infants. The ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Nov;85(11):4266-9.

85. Pierson RW Jr., Temin HM.: The partial purification from calf serum of a fraction with multiplication-stimulating activity for chicken fibroblasts in cell culture and with non-suppressible insulin-like activity. *J Cell Physiol.* 1972 Jun;79(3):319-30.
86. Raji L, Azar S, Keane WF.: Role of hypertension in progressive glomerular immune injury. *Hypertension* 1985; 7: 398-404.
87. Rajah R, Valentinis B, Cohen P.: Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem.* 1997 May 2;272(18):12181-8.
88. Rauchman M.: The role of homeobox genes in kidney development. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2000;9: 37-42.
89. Remuzzi A, Fassi A, Bertani T, Perico N, Remuzzi G.: ACE inhibition induces regression of proteinuria and halts progression of renal damage in a genetic model of progressive nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 1999 Oct;34(4):626-32.
90. Remuzzi A, Puntorieri S, Battaglia C, Bertani T, Remuzzi G.: Angiotensin converting enzyme inhibition ameliorates glomerular filtration of macromolecules and water and lessens glomerular injury in the rat. *J Clin Invest.* 1990 Feb;85(2):541-9.
91. Rogers SA, Miller SB, Hammerman MR. Insulin-like growth factor I gene expression in isolated rat renal collecting duct is stimulated by epidermal growth factor. *J Clin Invest.* 1991 Jan;87(1):347-51.
92. Rogers SA, Powell-Braxton L, Hammerman MR. Insulin-like growth factor I regulates renal development in rodents. *Dev Genet.* 1999;24(3-4):293-8.
93. Rogers SA, Ryan G, Hammerman MR.: Insulin-like growth factors I and II are produced in the metanephros and are required for growth and development in vitro. *J Cell Biol.* 1991 Jun;113(6):1447-53.
94. Rosenfeld R.: Somatomedin action and tissue growth-factor receptors. In: Robbins R, Melmed S(eds) *Acromegaly*. Plenum Press, New York, 1987, pp 45-53.
95. Rothermund L, Nierhaus M, Fialkowski O 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.* 2006 Sep;24(9):1857-64.
96. Rotwein P.: Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors.* 1991;5(1):3-18.
97. Schreuder MF, Nyengaard JR, Fodor M *et al.*: Glomerular number and function are influenced by spontaneous and induced low birth weight in rats. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Oct;16(10):2913-9. Epub 2005 Aug 10.
98. Schulz A, Standke D, Kovacevic *et al.*: A major gene locus links early onset albuminuria with renal interstitial fibrosis in the MWF rat with polygenetic albuminuria. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Dec;14(12):3081-9.
99. Sealey JE, Blumenfeld JD, Bell GM, et al.: On the renal basis for essential hypertension: nephron heterogeneity with discordant renin secretion and sodium excretion causing a hypertensive vasoconstriction-volume relationship. *J Hypertens.* 1988 Oct;6(10):763-77. Review.

100. Shoba L, An MR, Frank SJ *et al.*: Developmental regulation of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor gene expression. *Mol Cell Endocrinol.* 1999 Jun 25;152(1-2):125-36.
101. Sonnenberg E, Godecke A, Walter B, *et al.*: Transient and locally restricted expression of the *ros1* protooncogene during mouse development. *EMBO J* 1991;10: 3693-3702.
102. Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP.: Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 1994;372: 679-683.
103. Stewart CE, Rotwein P.: Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev.* 1996 Oct;76(4):1005-26.
104. Takahashi E, Sasaki N, Takeda J, *et al.* : The geographic distribution of cerebral hemorrhage and hypertension in Japan. *Hum Biol.* 1957 May;29(2):139-66.
105. Tonshoff B, Kiepe D, Ciarmatori S.: Growth hormone/insulin-like growth factor system in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol.* 2005 Mar;20(3):279-89. Epub 2005 Feb 4.
106. Torres VE, Offord KP, Anderson CF, *et al.*: Blood pressure determinants in living-related renal allograft donors and their recipients. *Kidney Int.* 1987 Jun;31(6):1383-90.
107. Unterman TG, Simmons RA, Glick RP, Ogata ES.: Circulating levels of insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding proteins in the small for gestational age fetal rat. *Endocrinology.* 1993 Jan;132(1):327-36.
108. Van den Brande JL.: A personal view on the early history of the insulin-like growth factors *Horm Res.* 1999;51 Suppl 3:149-75.
109. Wada J, Liu ZZ, Alvares K, Kumar A, Wallner E, Makino H, Kanwar YS.: Cloning of cDNA for the alpha subunit of mouse insulin-like growth factor I receptor and the role of the receptor in metanephric development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Nov 1;90(21):10360-4.
110. Wang HS, Lee CL, Chard T.: Levels of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 in pregnancy with preterm delivery. *Br J Obstet Gynaecol.* 1993 May;100(5):472-5.
111. Wang ZY, Madden SL, Deuel TF, Rauscher FJ.: The Wilms' tumor gene product, WT1, represses transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene. *J Biol.Chem.*1992;267: 21999-22002.
112. Watnick TJ, Jenkins RR, Rackoff P, *et al.*: Microalbuminuria and hypertension in long-term renal donors. *Transplantation.* 1988 Jan;45(1):59-65.
113. Weller A, Sorokin L, Illgen EM, Ekblom P.: Development and growth of mouse embryonic kidney in organ culture and modulation of development by soluble growth factor. *Dev Biol.* 1991 Apr;144(2):248-61.



## 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ALS	Acid label subunit
AT	Angiotensin
COX	Cyclooxygenase
D	Untersuchungstag
E	Embryonaltag
ECM	Extrazelluläre Matrix
FD	Untersucher Entwicklungstag MWF-Gruppe
FEM	Forschungsanstalt für experimentelle Medizin
FGF	Fibroblast Growth Factor
HGF	Hepatocytelike Growth Factor
HGH	Hypophysis Growth Hormone
IGF	Insulinlike Growth Factor
IGFBP	Insulinlike Growth Factor Binding Protein
IGF-R	Insulinlike Growth Factor Receptor
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
MET	Mesenchymal epithelialer Übergang
MWF	Munich-Wistar-Frömter
NG	Nierengewicht
OPN	Osteopontin
PG	Plazentagewicht
PGE	Prostaglandin E
RAS	Renin-Angiotensin-System
TGF	Transforming Growth Factor
WD	Untersucher Entwicklungstag Wistar-Gruppe

## 9. Veröffentlichung

Rothermund L, Nierhaus M, Fialkowski O, Freese F, Ibscher R, Mieschel S, Kossmehl P, Grimm D, Wehland M, Kreutz R, Genetic low nephron number hypertension is associated with dysregulation of the hepatic and renal insulin-like growth factor system during nephrogenesis. *J Hypertens.* 2006 Sep;24(9):1857-64.

## 10. Danksagungen

Vor allem danke ich meinem Doktorvater PD Dr. med. Lars Rothermund für die freundliche Überlassung des Themas und die gute wissenschaftliche Betreuung inklusive nie endendem Optimismus.

Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz und seinen Mitarbeitern im Institut für Klinische Pharmakologie danke ich für die wissenschaftliche Hilfe in den diversen Besprechungen.

Danken möchte ich besonders Prof. Dr. med. Daniela Grimm, Dr. med. Peter Kossmehl, Marc Nierhaus, Olaf Fialkowski und Dr. med. Shideh Faramazi für die gute Betreuung, fachliche Hilfestellungen und die gute Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gebührt meiner Familie und vor allem meiner Mutter dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben und all meine Projekte psychologisch und finanziell unterstützt haben.

Auch ohne die Unterstützung meiner Freunde wäre diese Arbeit wohl kaum zustande gekommen. Besonders nennen möchte ich meinen Partner Francis Cinna, Alexander Blank und Anne Vorbringer.

## Erklärung

„Ich, Susanne Mieschel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Bedeutung des renalen IGF-Systems für einen angeborenen Nephronmangel im Munich-Wistar-Frömter Rattenstamm“ 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.“

Datum

Unterschrift

## Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.