

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

DISSERTATION

**Bedeutung des IGF-Systems als Regulationsfaktor der  
Nephrogenese im Modell der hypertensiven Munich-Wistar-  
Frömter Ratte mit angeborenem Nephronmangel**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Florian Freese  
aus Freiburg

Gutachter/in:     1. ...PD Dr. med. Lars Rothermund..  
                          2. ...PD Dr. med. J. Beige.....  
                          3. ...Prof. Dr. med. H. Peters.....

Datum der Promotion: ..... 09.09.2011 .....

meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1 Nephrogenese.....	6
1.2 Arterieller Hypertonus und Anzahl der Nephrone.....	8
1.3 Faktoren der Fetalen Programmierung der Oligonephronie.....	11
1.3.1 Proteinmangel in der Schwangerschaft .....	12
1.3.2 Chirurgische Reduktion der Nephronenanzahl .....	12
1.3.3 Tierexperimentelle Hinweise .....	12
1.4 Genetische determinierte Faktoren .....	12
1.5 Regulationsmechanismen der Nephrogenese .....	13
1.5.1 Genregulation.....	13
1.5.2 Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrix .....	15
1.5.3 Prostaglandine und Renin-Angiotensin-System.....	16
1.5.4 Retinoide .....	16
1.5.5 Insulin-ähnliche Wachstums Faktoren, IGF-Rezeptoren und IGF- Bindungsproteine .....	17
1.5.5.1 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I (IGF-I) .....	17
1.5.5.2 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor II (IGF-II) .....	17
1.5.5.3 IGF–Rezeptor I und II .....	18
1.5.5.4 Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-Bindungsproteine (IGF-BP 1-7) .....	18
1.5.5.5 Stand der Wissenschaft zum IGF-System.....	18
<b>2 Aufgabenstellung</b> .....	<b>21</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
3.1 Material.....	22
3.1.1 Geräte .....	22
3.1.2 Instrumente .....	22
3.1.3 Futtermittel .....	23
3.1.4 Medikamente und Arzneimittel.....	23
3.1.5 Verbrauchsmaterial .....	23
3.1.6 Reagenzien .....	23
3.1.7 Kits .....	24
3.1.8 Oligonukleotide .....	25
3.1.9 Tierstämme .....	26
3.2 Methoden .....	28
<b>3.2.1 Tierexperimentelle Untersuchungen</b> .....	<b>28</b>
3.2.1.1 Haltung der Tiere .....	28
3.2.1.2 Organentnahme .....	28
<b>3.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen</b> .....	<b>29</b>
3.2.2.1 Expressionsanalyse des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Systems.....	29

3.2.2.2 RNA-Isolierung .....	30
3.2.2.3 Gelelektrophorese und optische Konzentrationsmessung .....	31
3.2.2.4 Reverse Transkription.....	32
3.2.2.5 Polymerasekettenreaktion .....	32
3.2.2.5.1 <i>Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion</i> .....	33
3.2.2.5.2 <i>Die Taq-Man-Polymerasekettenreaktion</i> .....	33
3.2.2.6 Statistische Analyse.....	39
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
4.1 Plazentagewicht-, relative Nieren- und Körpergewichte.....	40
4.1.2 relative Nierengewichte.....	40
4.1.3 Körpergewichte .....	41
4.2 Blutdruck, linksventr. Gewicht, Urinvolumen, Kreatininclearance und Albuminurie .....	42
4.3 Expression des Insulin-ähnlichen Wachstums Faktor Systems .....	43
4.3.1 Die hepatische mRNA Expression des IGF-Systems .....	43
4.3.1.1 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I mRNA Expression .....	43
4.3.1.2 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I Rezeptor mRNA-Expression.....	44
4.3.1.3 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor II mRNA-Expression .....	44
4.3.1.4 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I Rezeptor mRNA-Expression.....	45
4.3.1.5 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Bindungsprotein 1 mRNA-Expression ....	46
4.3.1.6 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Bindungsprotein 3 mRNA-Expression ....	46
4.3.2 Die renale mRNA Expression des IGF-Systems.....	48
4.3.2.1 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I mRNA Expression .....	48
4.3.2.2 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I Rezeptor mRNA-Expression.....	48
4.3.2.3 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor II mRNA-Expression .....	49
4.3.2.4 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor II Rezeptor mRNA-Expression.....	50
4.3.2.5 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Bindungsprotein 1 mRNA-Expression ....	51
4.3.2.6 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Bindungsprotein 3 mRNA-Expression ....	52
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>53</b>
5.1 Die Oligonephronie – Bedeutung für die Pathogenese der Hypertonie .....	53
5.2 Auswahl des Tiermodells .....	54
5.3 Herabregulation der hepatischen Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor I Expression.....	59
5.4 Reduzierte Bioverfügbarkeit der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren I und II .....	61
5.5 Zusammenfassung und Perspektive .....	63
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>64</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>8 Eidestättliche Erklärung .....</b>	<b>75</b>
<b>9 Danksagung.....</b>	<b>76</b>
<b>10 Curriculum Vitae.....</b>	<b>77</b>
<b>11 Liste der Publikationen .....</b>	<b>79</b>

## **1 Einleitung**

Der arterielle Hypertonus (HT) ist einer der wesentlichen Risikofaktoren kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität. Darüber hinaus ist der HT nicht nur Ursache und Folge einer chronischen Niereninsuffizienz, sondern der Hauptprogressionsfaktor der chronischen Nierenerkrankung [63]. Die klinische Erfahrung zeigt, dass sich bei bis zu 95% aller Hypertoniker keine pathophysiologische Ursache des arteriellen Bluthochdrucks diagnostizieren lässt [59]. Die Pathogenese der „essentiellen“ Hypertonie ist trotz zahlreicher Hypothesen weiterhin ungeklärt. Das Spektrum der möglichen Pathomechanismen umfasst sowohl extrarenale Faktoren wie eine Überaktivität des Sympathischen Nervensystems [58], zirkulierende  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase Hemmstoffe [9] und einen Mangel an zirkulierenden Vasodepressoren als auch renale Faktoren wie die intrarenale Ischämie [19], die verminderte Drucknatriurese [38], die heterogene Aktivierung des Renin-Angiotensin Systems (RAS) [107], einen genetischen Defekt der Natriumexkretion [77], eine gesteigerte glomerulotubuläre Balance [69] und eine genetische oder erworbene verminderte Anzahl von Nephronen [14, 84].

Der Zusammenhang zwischen einer angeborenen oder einer erworbenen verminderten Gesamtanzahl an Nephronen in den Nieren des Menschen und dem späteren Auftreten eines arteriellen Hypertonus kann genetisch determiniert oder durch exogene Faktoren ausgelöst sein. Die Oligonephronie ist durch verschiedene aktuelle Studien (epidemiologisch, human- und tierexperimentell) als möglicher Pathomechanismus des essentiellen Hypertonus in den Vordergrund der Diskussion gerückt. Welche spezifischen Regulationsstörungen der fetalen Nephrogenese zu einer angeborenen Reduktion von Nephronen und mit zunehmendem Alter zu einem HT und schließlich zu einer progredienten Niereninsuffizienz führen können, ist bisher nicht bekannt.

### **1.1 Nephrogenese**

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

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

Die Metanephrogenese (im Text als Nephrogenese bezeichnet) beginnt beim Menschen im Gestationsalter von etwa 5 Wochen und wird *in utero* um die 36. Woche abgeschlossen (Tabelle 1). Bei Ratten beginnt die Nephrogenese am 12. Embryonaltag (E12) und wird am 7.-13. Tag *post partum* vollendet (D7-D13) [61] (Tabelle 1).

Tabelle 1: Gestationsdauer und Dauer der Nephrogenese in verschiedenen Spezies

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

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

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

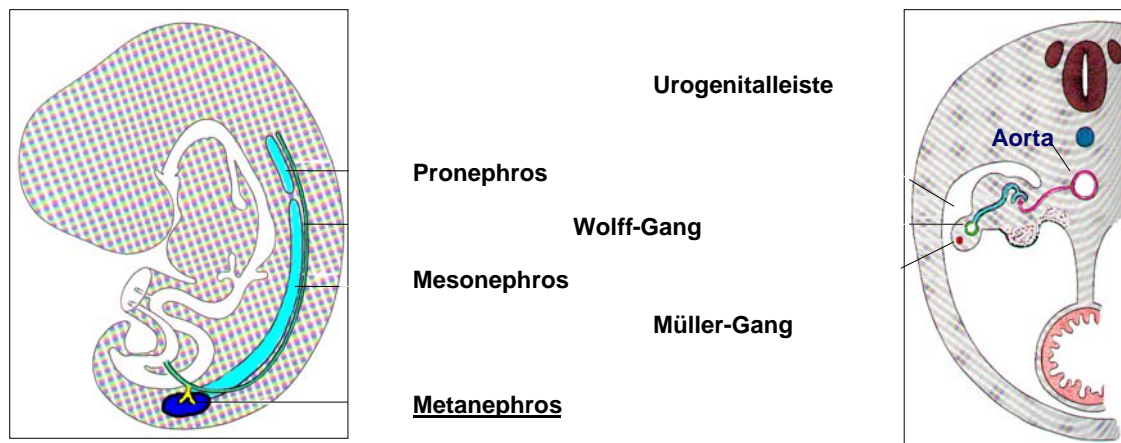


Abbildung 1: Nephrogenese-Übersicht

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

Die renale Vaskularisierung erfolgt parallel zur Nephrogenese über das Einwachsen prä-existenter extrarenaler Gefäße (Angiogenese) in die Bowman-Kapsel (Abb. 2) und durch die *in-situ* Bildung neuer Gefäße aus endothelialen Vorläuferzellen im metanephritischen Mesenchym (Vaskulogenese) [12]. Wachstum und Reifung der Niere setzen sich auch nach Abschluss der Nephrogenese postnatal fort. So wird die Fähigkeit zur Konzentrierung des Urins bei der Ratte erst im Alter von 6 Wochen und beim Menschen im Alter von 18 Monaten vollständig 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.

## 1.2 Arterieller Hypertonus und Anzahl der Nephrone

Die Oligonephronie kann sowohl genetisch determiniert als auch durch exogene Faktoren verursacht sein. Sie ist durch verschiedene aktuelle Studien als mögliche patho-anatomische und damit funktionelle Ursache eines Teils des essentiellen Hypertonus in den Vordergrund gerückt. Bisher ist nur in Ansätzen bekannt, welche spezifischen Regulationsstörungen der fetalen Nephrogenese zu einer angeborenen,



reduzierten Anzahl an Nephronen und daran anschließend, mit zunehmendem Alter zu einem Hypertonus (HT) mit progredienter Nephropathie führen können.

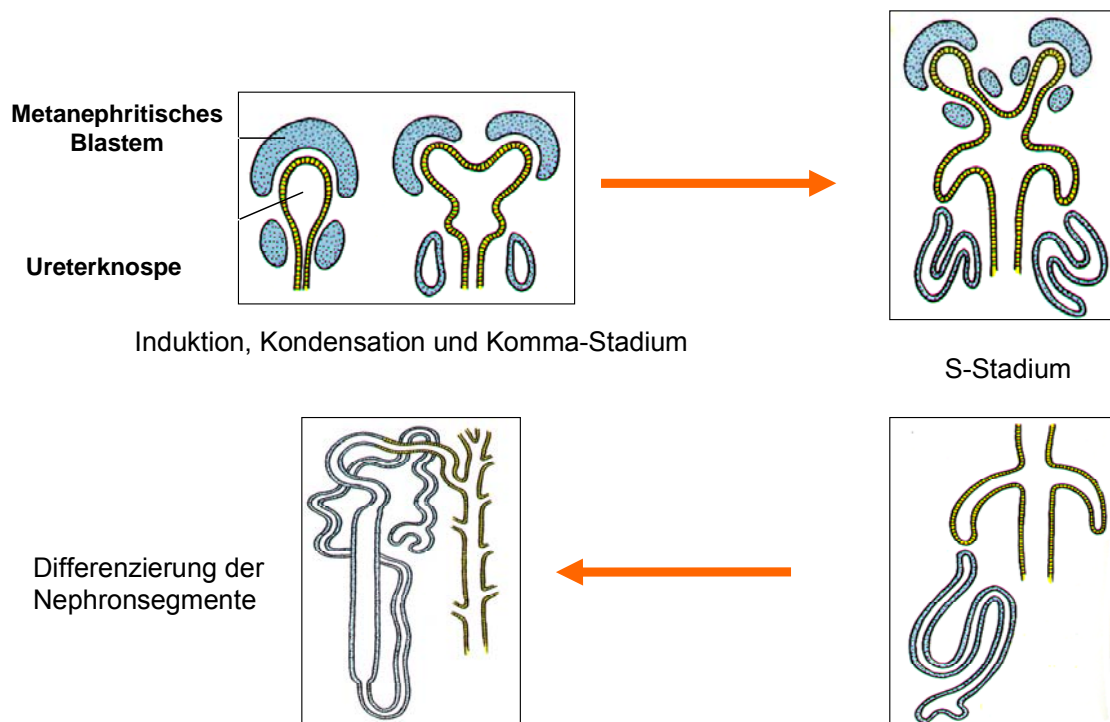


Abbildung 2: mesenchymal-epithelialer Übergang

Erstmals wurde 1988 von Brenner die Hypothese formuliert, dass eine umgekehrt proportionale Abhängigkeit zwischen der Anzahl der Nephronen und dem Risiko der Manifestation eines HT besteht [14]. Danach kann ein Mangel an Nephronen zum Zeitpunkt der Geburt das spätere Auftreten eines HT verursachen. Die kongenitale Oligonephronie ist somit möglicherweise bereits pathognomonisch für eine im Erwachsenenalter folgende essentielle Hypertonie.

Die These, dass das spätere Auftreten eines Hypertonus eine pathophysiologische Eigenschaft der Niere sein kann, wird durch den tierexperimentellen Befund unterstützt, dass bei Überkreuztransplantationen von Nieren zwischen normotonen und hypertensiven Rattenstämmen der HT von der Spenderniere und nicht vom Empfängerorganismus abhängt [8] [22]. Interessant ist dabei, dass die Nieren einiger der hypertensiven Rattenstämmen eine angeborene reduzierte Nephronenzahl aufweisen. Analoge Befunde wurden auch an nierentransplantierten Patienten erhoben [20].

Nach dem Guyton'schen-Modell der renalen Volumen-Druck Balance [38] folgt aus Brenners Hypothese, dass ein Mangel an Nephronen über eine Abnahme der natriuretischen und diuretischen Kapazität zu einem langfristig erhöhten HT 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 einem Ausgleich der Natrium- und Volumenbilanz führt [13]. Anhaltend hohe glomeruläre Kapillardrücke fördern das Auftreten einer fokal-segmentalen Glomerulosklerose, und es kommt zum Untergang von Nephronen [51] und damit zum weiteren Anstieg des Hypertonus. Ein *circulus vitiosus* entsteht. Dieser Mechanismus, einhergehend mit Proteinurie und Glomerulosklerose, findet sich auch bei Patienten nach ausgedehnter Nierenresektion im Rahmen der Tumor- und Traumatologie [92]. Ebenso wird eine erhöhte Inzidenz des HT bei Nierenlebenspendern berichtet [41, 113, 122].

Im Gegensatz zu anderen Spezies (Tabelle 1) ist die Bildung der Nephrone beim Menschen zum Zeitpunkt der Geburt abgeschlossen [43]. Interessant ist, dass die Anzahl der Nephrone in der Normalpopulation bei sonst unauffälligen Individuen erhebliche Unterschiede aufweist. So werden in der Literatur zwischen 300.000 und über 1.100.000 Nephrone, im Mittel 600.000 Nephrone, angegeben [93]. Dies ist eine ungewöhnlich hohe Varianz im Vergleich zu anderen anthropometrischen Parametern einer Normalpopulation.

Nach Brenners Hypothese haben Individuen, deren Nephronenzahlen sich am unteren Ende dieser Normalverteilung befinden, ein besonders hohes Risiko, einen essentiellen HT zu entwickeln, wohingegen die Individuen mit Nephronenzahlen am oberen Ende der Verteilung eine gewisse Resistenz gegen das Auftreten eines HT und einer progredienten Nierenschädigung aufweisen [15].

Da es bisher noch keine nicht-invasive Methode zur spezifischen und sensitiven Bestimmung der Anzahl der Nephrone im lebenden Organismus gibt, kann Brenners Hypothese am Menschen noch nicht direkt überprüft werden.

Insofern ist bemerkenswert, dass kürzlich die Verbindung zwischen einer niedrigen Anzahl an Nephronen und dem menschlichen primären Hypertonus bestätigt werden konnte. In einer Studie besaßen Patienten mit primärem Hypertonus 46% weniger

Glomerula pro Niere als die Mitglieder der normotensiven Kontrollgruppe [61]. Diese Befunde wurden 2007 von Hoy bestätigt und ergänzt [54].

Die Nephrogenese ist beim Menschen mit den Wochen 32-34 abgeschlossen, und ein in der Nephrogenese begründetes glomeruläres Defizit persistiert ein Leben lang. Somit könnte eine erniedrigte Nephronenanzahl die pathoanatomische und pathophysiologische Ursache für das Auftreten des primären Hypertonus bei einem Teil der betroffenen Bevölkerung sein. Brenners Hypothese wird durch Beobachtungen Barkers unterstützt [6]. Ein niedriges Geburtsgewicht korreliert mit dem späteren Auftreten eines hohen diastolischen Blutdrucks und in der Folge mit dem Auftreten von kardiovaskulären Krankheiten und der durch diese Krankheiten hervorgerufenen Sterberate. Dieses Phänomen wird als *Fetale Programmierung* bezeichnet. Beim Menschen korrelieren das Geburtsgewicht und die Nephronenanzahl direkt, das glomeruläre Volumen und der Bluthochdruck indirekt [55] [85] [54].

Die bei Geburt vorhandene Anzahl an Nephronen scheint sowohl durch genetische Faktoren als auch durch externe intrauterine Bedingungen bestimmt zu werden. So geht ein niedriges Geburtsgewicht, bedingt durch eine intrauterine Reifungsstörung, mit einer Verminderung der Nephronenanzahl einher, auch dann, wenn das Kind zum Termin geboren wird [85, 123]. Ein niedriges Geburtsgewicht ist mit einem HT im Erwachsenenalter assoziiert [6], möglicherweise auch im Kindesalter [75]. Ein direkter Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und dem salz-sensitiven HT ist jedoch noch nicht belegt.

### **1.3 Faktoren der Fetalen Programmierung der Oligonephronie**

Wintour postulierte 2003, dass Konzepte wie „*life before birth*“ oder „*first environment*“ wichtig bei der Determinierung des fortschreitenden Risikos für die Entwicklung kardiovaskulärer und metabolischer Krankheiten seien. Alle Faktoren, die die Nephrogenese während ihrer aktiven Phase unterbrechen oder moderieren und die Nephronenanzahl vermindern, führen zu maladaptiven Veränderungen im späteren Leben, die sowohl den Beginn des adulten Hypertonus (HT) als auch die Nierenfunktion beeinflussen können [124].

### **1.3.1 Proteinmangel in der Schwangerschaft**

Mehrere Autoren haben beschrieben, dass der Nachwuchs von Muttertieren, die während der Schwangerschaft einer Proteinmangeldiät ausgesetzt waren, relativ klein ist und mit hoher Wahrscheinlichkeit im Erwachsenenalter einen HT entwickelt. Ungeachtet postpartaler Einflüsse und Faktoren persistiert der Bluthochdruck ein Leben lang [88] [70] [98] [126]. Umgekehrt verfügt der Nachwuchs proteinreich ernährter oder von vor der Gestation einseitig nephrektomierten Muttertieren über eine erhöhte Anzahl von Nephronen und eine relative Resistenz gegen das Auftreten einer Hypertonie mit progressiver Niereninsuffizienz im Erwachsenenalter.

### **1.3.2 Chirurgische Reduktion der Nephronenanzahl**

Dieser Befund wird auch durch die Beobachtung, dass es nach der chirurgischen, postpartalen Reduktion der Nephronenanzahl im weiteren Verlauf zu einem Hypertonus kommt [14] [83] [84], gestützt.

### **1.3.3 Tierexperimentelle Hinweise**

Experimentell lässt sich durch die Induktion einer uterinen Ischämie nach Gabe von Aminoglykosiden eine Abnahme der Nephronenanzahl erzeugen, die schon in geringem Maße zur Glomerulosklerose im adulten Tier führt [34].

Desweiteren konnte am Tiermodell gezeigt werden, dass sowohl hohe Konzentrationen synthetischer und natürlicher Glukokortikoide, als auch zu hohe Blutzuckerwertewährend kritischer Perioden der embryonalen Nephrogenese zu einer Reduktion der Nephronenanzahl führten [26] [124].

## **1.4 Genetische determinierte Faktoren**

Mit hoher Wahrscheinlichkeit haben genetische Faktoren einen direkten Einfluss auf die Anzahl der Nephrone und die Nierengröße zum Zeitpunkt der Geburt. Darüber hinaus sind sowohl der Hypertonus (HT) als auch eine verstärkte Retention von Natrium nach akuter Salzbelastung genetisch determiniert [54] [25] [35] [55] [128]. Bereits vor mehreren Jahrzehnten ergaben sich erste Hinweise darauf, dass die Zahl der funktionstüchtigen Nephrone für das spätere Auftreten einer Hypertonie von entscheidender Bedeutung ist. Epidemiologische Untersuchungen zeigten, dass einige ethnische Gruppen mit erhöhter Inzidenz für das Auftreten eines HT weniger

Nephronen bzw. ein geringeres Nierengewicht im Verhältnis zum Körpergewicht aufweisen. So findet man bei Japanern, mit hoher Inzidenz für einen HT, im Durchschnitt kleinere Nieren als in anderen Populationen. Auch bei Afro-Amerikanern sind die Nieren durchschnittlich kleiner und es tritt häufiger ein salzsensitiver HT [54] [55] [52] [81] auf als bei Kaukasiern.

Ebenso sind verschiedene Rattenmodelle mit genetisch determiniertem HT und chronisch progredientem Nierenversagen durch eine angeborene verminderte Anzahl an Nephronen charakterisiert [14] (Tabelle 5). Genaue pathologische Regulationsmechanismen, die während der Nephrogenese zu einer Oligonephronie führen, sind noch wenig erforscht.

Es gibt Hinweise einer Vielzahl von Autoren und aus Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe, dass während der Nephrogenese das insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-System (IGF-System) eine wichtige Rolle im physiologischen Ablauf einer ungestörten Nephrogenese spielen könnte.

In der vorliegenden Arbeit wird aus diesem Grund ein Teil des IGF-Systems an zwei genetisch eng verwandten Rattenstämmen untersucht, die während der Nephrogenese unterschiedliche Nephronenanzahlen entwickeln und klinisch normo- bzw. hypertensiv sind.

## **1.5 Regulationsmechanismen der Nephrogenese**

### **1.5.1 Genregulation**

Verschiedene Regulationsgene der Nephrogenese sind bereits identifiziert. Viele dieser Transkriptionsfaktoren sind physiologisch während der Organogenese aktiviert und haben pathophysiologisch als Onkogene bei der Tumorentstehung im reifen Organismus eine wichtige Bedeutung.

Das Wilms Tumor Suppressor Gen (*WT-1*) wurde als ein zentraler Transkriptionsfaktor der frühen Nephrogenese identifiziert. *WT-1* interagiert und steuert zu einem großen Teil die komplexen Interaktionen des mesenchymal-epithelialen Übergangs (*mesenchymal-epithelial transformation* (MET)) [50] und kontrolliert die Expression verschiedener anderer Gene und Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren [106, 121]. In homozygoten *WT-1 Knockout*-Mäusen kommt es zu keiner Ausknospung des Ureters, es fehlt dadurch die Induktion des Mesenchyms, und eine renale

Agenease ist die Folge [66]. *WT-1* unterdrückt die Expression des Protoonkogens *bcl-2*, das eine zentrale Bedeutung für die Apoptose hat und kontrolliert über die transkriptionelle Regulation von *c-myc* multiple Proliferationsprozesse [47]. *WT-1* steuert im metanephritischen Blastem die Expression des insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors (IGF) und dessen Rezeptors (IGF-R) [57].

Das *Bf-2* Gen wird in mesenchymalen Zellen exprimiert. Nach der Induktion wird *Bf-2* in Stammzellen der Medulla und des äußeren Kortex exprimiert. *Bf-2-Knockout* führt zu Nieren mit großen mesenchymalen Kondensaten, ohne dass eine weitere Differenzierung stattfindet [42].

Die *Homeobox (Hox)* Genfamilie spielt für die Regulation verschiedener Stadien der Nephrogenese vom frühen intermediären Mesoderm bis zur terminalen Differenzierung der glomerulären und tubulären Epithelien eine Rolle [97]. Es haben aber nur wenige der gezielten Mutationen in der *Hox*-Genfamilie zu Entwicklungsdefekten der Niere geführt [68]

Die Hepatozytenkernfaktoren (*hepatocyte-nuklear factors*) Faktoren *HNF-1 $\alpha$*  und *HNF-1 $\beta$*  werden während der Organogenese der Nieren unterschiedlich exprimiert. Über die funktionelle Bedeutung der *HNF* ist wenig bekannt [71].

Auch die Protoonkogene der *myc* Familie spielen in der Nephrogenese eine Rolle. Das *N-myc* Gen wird generell in Epithelien exprimiert, in denen auch eine Induktion stattfindet, und steuert somit die Proliferation, Ausknospung und weitere Differenzierung [48]. Die Transkription des *C-myc* Gens findet bereits in nicht induzierten Mesenchymalzellen und in frühen Differenzierungsstadien statt, nicht aber in reifem Epithel [90]. Das *Mesonephros N-myc*-transgener Mäuse ist durch eine mesenchymale Hypoplasie sowie weniger und kleinere Tubuli charakterisiert [110].

Die Protoonkogene *C-met*, *C-res* und *C-ros* kodieren jeweils unterschiedliche Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden und spezifische Expressionsmuster während der Nephrogenese aufweisen.

Das „*circadian clock gene Timeless*“ (*Tim*) hat die Funktion eines zirkadianen Zeitgebers in *Drosophila melanogaster* Fliegen. Das homologe Gen in Säugetieren, „*mTimeless*“ (*mammalian timeless, mTim*), scheint keine Zeitgeberfunktion zu haben, ist aber bei der embryonalen Entwicklung verschiedener Organsysteme

aktiviert. Während der Knospung wird *mTim* in den Zellen der Ureterknospe (UB) exprimiert. Eine Hemmung der *mTim* mRNA Expression in kultivierten embryonalen Nierenexplantaten durch *antisense* Oligonukleotide stört das Ausknospen der Sammelrohre und führt zu einer Wachstumshemmung der Nieren [76]. Ob eine veränderte Wirkung von Transkriptionsfaktoren und Regulator-Genen zu einer kongenitalen Oligonephronie führt, ist nicht bekannt.

### **1.5.2 Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrix**

Neben den Transkriptionsfaktoren haben Wachstumsfaktoren (*Growth Factors* (GF)) eine zentrale Bedeutung in der Nephrogenese. Sie vermitteln eine Stimulation der Mitose, Migration, Induktion, Differenzierung, Polarisierung, Proliferation und Apoptose. Die Interaktion der verschiedenen GF und ihrer Rezeptoren bei der Regulation der Organogenese wird in ihrer großen Komplexität bei weitem noch nicht verstanden. Die am besten untersuchten GF der Nephrogenese sind die *Insulin-ähnlichen* Wachstumsfaktoren (IGF)-I und -II, der *Hepatozytenwachstumsfaktor* (*hepatocyte GF* (HGF)), der transformierende Wachstumsfaktor beta (*transforming GF* (TGF- $\beta$ )) und Fibroblastenwachstumsfaktor (*basic fibro-blast GF* (bFGF)). Neben diesen beeinflussen auch andere Wachstumsfaktoren die Organogenese der Niere.

In Zellkultur-Experimenten reagieren epitheliale embryonale Nierenzellen sehr unterschiedlich auf spezifische Wachstumsfaktoren und synergistische Effekte zwischen verschiedenen Wachstumsfaktorfamilien scheinen eine große Bedeutung zu spielen [50]. Noch nicht induziertes metanephritisches Mesenchym reagiert auf keinen der o.g. Wachstumsfaktoren mit einer Tubulogenese [123]. Das hat zu dem Schluss geführt, 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 Wachstumsfaktoren am besten untersucht [50]. Mit der Induktion und dem Beginn des mesenchymal-epithelialen Übergangs (MET) setzt eine tiefgreifende Änderung des epithelialen Phänotyps ein. Wird die Laminin- oder Integrin-Expression experimentell blockiert, so bleibt eine weitere Zelldifferenzierung aus [29].

Osteopontin (*OPN*) ist ein bekannter Mediator entzündlicher Prozesse der renalen ECM. Es enthält die Peptid Sequenz „RGD“, die verschiedenen Integrinen als Bindungsstelle dient. OPN wird im *Metanephros* der Ratte exprimiert und eine *OPN*-

Integrin Interaktion scheint für die Tubulogenese wichtig zu sein. Darüber hinaus hat *OPN* eine anti-apoptotische Wirkung während der Kondensationsphase im metanephritischen Blastem [102]. Es ist bisher nicht untersucht, welche Bedeutung die Expression von ECM Proteinen auf die Anzahl der sich bildenden Nephronen hat.

### 1.5.3 Prostaglandine und Renin-Angiotensin-System

Behandlung mit nichtsteroidalen Antiphlogistika während der Schwangerschaft kann im Neugeborenen zur renalen Dysgenese führen [115, 119]. In Zellkulturexperimenten ist Prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) ein essentieller Faktor für das Wachstum und die Differenzierung der *Metanephroi* [2]. Während der Gestationsperiode führt bei Mäusen und Ratten die Behandlung mit einem selektiven Hemmstoff der Cyklooxygenase-2 (Cox-2), nicht jedoch der Cyklooxygenase-1 (Cox-1), zu einer gestörten Bildung der Nierenrinde sowie zu kleineren Glomerula bei den Nachkommen [65].

Alle Komponenten des Renin-Angiotensin System (RAS) werden organständig während der Nephrogenese stark exprimiert. Eine ACE-Hemmung oder AT1-Rezeptor Blockade während der Nephrogenese führt zu ausgeprägten morphologischen Veränderungen der Nieren, die auch nach Beendigung der Behandlung fortbestehen [37]. Es kommt dabei zur Atrophie der Papillen, der Erweiterung des Nierenbeckens, der tubulären Atrophie und zur deren Dilatation. Die Glomerula erscheinen histologisch unauffällig. Welche Relevanz die Aktivität des RAS und des Prostaglandin Systems für die kongenitale Oligonephronie hat ist ebenfalls nicht bekannt.

### 1.5.4 Retinoide

Von den bekannten Regulationsfaktoren der Nephrogenese ist für die Retinoide ein Einfluss auf die Anzahl gebildeter Nephrone nachgewiesen. In Organkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass durch Gabe von Retinoiden das Wachstum und die Differenzierung von *Metanephroi* stimuliert wird. Dabei wird sowohl die Induktionsphase als auch die Ausknospung der Ureteranlage stimuliert. Dieser Effekt schien um so ausgeprägter zu sein, je früher in der Nephrogenese eine Retinoid-Applikation erfolgte [118]. Zu einem großen Teil wird die Wirkung der Retinoide dosisabhängig über das Protoonkogen *c-ret* vermittelt [89]. Interessanterweise führt sogar eine milde fetale Vitamin A Mangelversorgung im Rattenmodell zu einer kongenitalen Oligonephronie [73]. Dies könnte eine zentrale Bedeutung der Vitamin-



A Spiegel für die intrauterine Programmierung der arteriellen Hypertension und der chronisch progressiven Niereninsuffizienz nahelegen. Es ist bisher aber noch nicht nachgewiesen, dass eine kongenitale Oligonephronie durch Gabe von Retinoiden während der Nephrogenese *in vivo* moduliert werden kann.

### **1.5.5 Insulin-ähnliche Wachstums Faktoren (IGFs), IGF-Rezeptoren (IGF-R) und IGF-Bindungsproteine (IGF-BPs)**

Die IGFs, ihre Bindungsproteine und Rezeptoren sind wichtige Regulationsfaktoren des fetalen Wachstums in Säugetieren. Zwei IGF Peptide (IGF-I und IGF-II) und ihre Rezeptoren (*IGF-I-R* und *IGF-II-R*) sowie sieben Bindungsproteine (IGF-BP 1-7) sind bekannt [49].

Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren I und II sind Polypeptide, die anabol wirken und deren Transkription über Wachstumshormone (GH) stimuliert wird. Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren wirken über eine Bindung an spezifische Rezeptoren (IGF-I-Rezeptor und IGF-II-Rezeptor) [46, 74]. Mehr als 99% des IGF liegt im Serum gebunden an spezifische Bindungsproteine (IGF-BP 1-7) [5, 95, 108] vor. Der Hauptsyntheseort des IGF-I und -II, sowie des IGF-BP3 ist die Leber. Aber auch in der Niere und in anderen Organen findet sich deren Synthese [10, 21].

#### **1.5.5.1 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I (IGF-I)**

IGF-I ist auch als Somatomedin C [10, 64] bekannt, ein basisches Polypeptid, das beim Menschen auf Chromosom 12 lokalisiert ist. Es besteht aus 70 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 7,649 kDa [101]. Es ist in seiner Struktur dem Proinsulin sehr ähnlich. Die Wirkung von IGF ist anabol und ähnelt der des Insulins. IGF-I stimuliert die Glykogen-, Glykosaminoglykan- und Proteinbiosynthese. Ebenso werden sekundäre Wachstumseigenschaften bei Heranwachsenden beeinflusst. Man vermutet, dass die anabole Wirkung des Wachstumshormons (GH) über erhöhte Serumkonzentrationen von IGF-I vermittelt wird. IGF-I ist vom Tag E13 der Embryogenese in der Ratte nachweisbar [103].

#### **1.5.5.2 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor II (IGF-II)**

IGF-II, auch als Somatomedin A bekannt (67 Aminosäuren, 7,5 kDa), scheint bisher nur in frühen Stadien der embryonalen Entwicklung aktiv zu sein. Die Rolle von IGF-II im Prozess der Alterung ist bisher ungeklärt und leitet sich bisher hauptsächlich von seiner Verbindung zu IGF-I und der IGF-I / GH Achse bei der Regulierung des

Alterungsprozesses ab. Ein Polymorphismus auf dem menschlichen IGF-II Gen wurde mit dem BodyMass Index in Verbindung gebracht[32].

Ihre Bedeutung für die Nephrogenese wurde über IGF blockierende Antikörper an Organkulturen *in vitro* nachgewiesen. Darüber hinaus zeigen *knockout* Tiermodelle für IGF-I, IGF-II und den IGF-I-Rezeptor schwere fetale Fehlbildungen [4, 24].

#### **1.5.5.3 IGF–Rezeptor I und II**

Die IGF-Rezeptoren (I und II) sind dem Insulinrezeptor nahe verwandt. Sie gehören zu der Familie der Tyrosinkinaserzeptoren, sind heterotetramere Glykoproteine, die aus einer extrazellulären, hormonbindenden (IGF-I und IGF-II)  $\alpha$  –Untereinheit und zwei transmembranären  $\beta$  – Untereinheiten, welche die Kinase Domäne enthalten, bestehen. Nach Triggerung der  $\beta$ -Untereinheit erfolgt deren Kreuzphosphorylierung und damit die Triggerung nachgeschalteter Signalkaskaden wie der Ras-Raf-mitogen-aktivierten Proteinkinase (Ras-Raf-MAPK) oder der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K). Sie werden in allen Zelltypen und Geweben exprimiert und durch unterschiedliches Splicing in zwei Expressionsformen (I und II) unterteilt.

#### **1.5.5.4 Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-Bindungsproteine (IGF-BP 1-7)**

Bisher sind sieben verschiedene Bindungsproteine bekannt [95, 108]. Diese binden etwa 99% [46] des IGF und schützen ihn auf diese Weise vor einem raschen, enzymatischen Abbau und verlängern so die Wirkungsdauer des IGF. Als Beispiel sei hier das IGF-BP3 näher beschrieben. Es ist ein aus zwei Komponenten bestehendes Glykoprotein. Eine Untereinheit ist säurelabil und hat ein Gewicht von 85kD, die andere Untereinheit ist säurestabil und hat ein Molekulargewicht von ca. 50kD. Das IGF-BP3 bestimmt nach der Geburt maßgeblich die Konzentration des freien IGF-I und –II im Serum [10]

#### **1.5.5.5 Stand der Wissenschaft zum IGF-System**

Die vorher beschriebenen toxischen Effekte der ACE Hemmung auf die Nephrogenese werden zumindest teilweise über IGF vermittelt, da eine exogene Gabe von IGF-I bei gleichzeitiger neonataler ACE-Hemmung zu komplett funktionstüchtigen und morphologisch unauffälligen Nieren in ausgewachsenen Ratten führt [91].

Im Kontext der kongenitalen Oligonephronie (insbesondere bei niedrigem Geburtsgewicht) und der Genese des essentiellen HT könnten die IGF eine

herausragende Bedeutung haben. Niedrige Serumkonzentrationen von IGF-I und hohe Konzentrationen von IGFBP-1 finden sich im dritten Trimester bei Schwangeren mit Frühgeburten im Vergleich zu Schwangeren mit termingerechter Geburt (geringes Angebot an freiem IGF-I) [7, 94, 120]. Es wurden positive Korrelationen zwischen dem Serumspiegel von IGF-I und Geburtsgewicht gefunden [94]. Darüber hinaus sind, mit hoher Signifikanz, die mütterliche Serumkonzentration und die Fruchtwasserkonzentration von IGFBP-1 umgekehrt proportional mit dem Geburtsgewicht korreliert [18, 120].

Im Tiermodell sind nach Mangeler-nährung die Serumkonzentrationen von IGF-I und -II sowohl im mütterlichen als auch im fetalen Kreislauf signifikant erniedrigt [72].

In einer Arbeit über Feten diabetischer Mütter wurde bereits beschrieben, dass der IGF-II-Rezeptor in der Pathogenese der gestörten Nephrogenese eine wichtige Rolle spielt.[28]

Da Mangeler-nährung, Frühgeburt und niedriges Geburtsgewicht mit einer erniedrigten Nephronenanzahl, einem essentiellen HT und progredientem Nierenversagen im Erwachsenenalter assoziiert sind, ist ein Zusammenhang zwischen IGF und der Anzahl der gebildeten Nephrone sehr wahrscheinlich. Ein transgenes Mausmodell mit Überexpression des humanen IGFBP-1 (niedrige freie IGF-I Konzentrationen) ist durch eine progrediente Glomerulosklerose in den adulten Tieren charakterisiert [27]. Tatsächlich ist in diesem Modell die Nephronenanzahl sogar von nicht-transgenen Nachkommen heterozygoter Mütter erniedrigt [27].

Auch ist IGF-I an Differenzierung, Proliferation und Matrixformation in Osteoblasten beteiligt. IGFBP-5 bindet an die extrazelluläre Matrix (ECM) und kann die Wirkung von IGF-I potenzieren.[62]

Während IGF-I und IGFBP-5 zusammen signifikant das Zellwachstum erhöhen, wurde gleichzeitig die Synthese der extrazellulären Proteine Osteopontin (OPN) und Thrombospondin (TSP-1), die auf Zelloberflächen an den alpha5beta3-Integrinrezeptor(IR) binden, erhöht. Der stimulatorische Effekt des IGFBP-5 wurde über die Aktivierung der extrazellulären signalregulierten Kinase 1 und 2 (ERK1/2) in die Wege geleitet. Das Besetzen des alpha5beta3-IR mit seinen Liganden OPN und TSP-1 induzierte die IGF-I stimulierte Phosphorylierung des IGF-I-R als Zeichen seiner Aktivierung.[62]

Fasst man die bestehenden Befunde zusammen, so scheinen die IGF unter den Regulationsfaktoren der Nephrogenese eine herausragende Bedeutung für die kongenitale Oligonephronie zu haben. Der direkte Nachweis eines Zusammenhangs zwischen der Anzahl der in der Nephrogenese gebildeten Nephrone und der Wirkung von IGF steht jedoch noch aus.

## **2 Aufgabenstellung**

Es ist das Ziel dieser Arbeit ontogenetische Regulationsmechanismen der Nephrogenese zu identifizieren, die zur kongenitalen Oligonephronie mit arterieller Hypertonie, Albuminurie und progredienter Niereninsuffizienz im Erwachsenenalter führen. Dazu führten wir eine vergleichende Untersuchung der Nephrogenese in einem Tiermodell mit verminderter Anzahl von Nephrone, spontanem salz-sensitiven Hypertonus, Proteinurie und chronisch progredientem Nierenversagen mit einem gesunden Kontrolltiermodell durch.

Da es keine Daten zum Verlauf der Regulationen des IGF Systems während der Nephrogenese der Ratte gibt, wurden in dieser Arbeit die Expressionen verschiedener Komponenten des IGF Systems an dem embryonalen Entwicklungstag E19 sowie am postpartalen Tag D7 untersucht.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Geräte**

Homogenisator Ultra Turrax T25, Jahnke und Kunkel, Deutschland

Kühlzentrifuge Eppendorf 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Photometer, Shimadzu, Duisburg, Deutschland

Gelkammer (90 Volt) Biorad, München, Deutschland

Fotogerät und -drucker für Gele, SONY

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

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

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

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

Eppendorf Tischzentrifuge 5402, Hamburg, Deutschland

Präzisionswaage, Satorius Laboratory, Göttingen, Deutschland

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

Messzylinder, Brand Duran, USA

Szintillationsgefäße aus Glas 20 ml, Packard, Göttingen, Deutschland

Stoffwechselfäße für Ratten, Ehret, Emmendingen, Deutschland

##### **3.1.2 Instrumente**

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

Pinzette chirurgisch, Aesculap Standard BD 557, Melsungen, Deutschland

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

Präparierschere fein , Aesculap BC 2, Melsungen, Deutschland

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

Wundspreizer, Aesculap Mellinger OA 241, Melsungen, Deutschland

Haken, Werkstatt Lorenz

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

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

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

### **3.1.3 Futtermittel**

Standardhaltungsfutter für Ratten, Altromin, Laage, Deutschland

### **3.1.4 Medikamente und Arzneimittel**

Desinfektionsmittel für Instrumente, Braun, Melsungen, Deutschland

Xylazin 2% (0,065mg/100g KG), Intervet, Schweiz

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

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

### **3.1.5 Verbrauchsmaterial**

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

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

Falcon Gefäße gross, mittel, klein, Sarstedt, Deutschland

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

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

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

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

Untersuchungshandschuhe M, Kimberly-Clark, Safeskin PFE

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

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

### **3.1.6 Reagenzien**

Flüssiger Stickstoff

Trizol™Reagenz, Gibco Life Technologies, Mannheim, Deutschland

Chloroform

Ethanol 75%, Braun, Melsungen, Deutschland

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

2 - Propanol 70%, Braun, Melsungen, Deutschland

Agarosegel 2% Biozym, Oldendorf, Deutschland

TAE-Puffer (Trisacetat + EDTA)

Ethidiumbromid, Sigma, Steinheim, Deutschland

Ficoll, Firma Fluka, Taufkirchen, Deutschland

Master Mix für Taqman, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Aqua dest.

### **3.1.7 Kits**

Rneasy mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

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

QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland



### 3.1.8 Oligonukleotide

**Tabelle 2:** Primer für die quantitative *real time* PCR und Taqmansonden

Gene	Name	Sequence
IGF-I	IGF-I-F	CAACCTTGTCAAGCACCTAATTGT
	IGF-I-R	TCACTCCTGTAAGGTGGATGGA
	IGF-I probe	CCATCCGTGCGATGCCAGCC
<b>IGF-II</b>	<b>IGF-II-F</b>	<b>TCCTGCGCATAACATCGATATC</b>
	<b>IGF-II-R</b>	<b>GTGTCCGGTGCGTGTTTG</b>
	<b>IGF-II probe</b>	<b>TCACTTCTCCTACGGTGTCCCAGCG</b>
IGF-I receptor	IGF-I-rec-F	CTGTGTGGACCGGGATTCT
	IGF-I-rec-R	ACTCGCCATCGTGGATGAC
	IGF-I-rec probe	ATCCCCAACGCCGAGAGCAGTGA
<b>IGF-II receptor</b>	<b>IGF-II-rec-F</b>	<b>GAATGCACCGTGCGGAAT</b>
	<b>IGF-II-rec-R</b>	<b>GTGTCGTCCTCACTCTCATCGTAT</b>
	<b>IGF-II-rec probe</b>	<b>CTCATCCACCGCACTGGTGGTTATGA</b>
IGFBP-1	IGFBP-1-F	TGCTGGATAGCTTCCACCTCAT
	IGFBP-1-R	TGCTGTAGGTGCTAATGGCATT
	IGFBP-1 probe	CCCATCCCGTGAGGACCAGCC
<b>IGFBP-3</b>	<b>IGFBP-3-F</b>	<b>TGCTGGGAGTGTGGAAAGC</b>
	<b>IGFBP-3-R</b>	<b>TGGAGTGGATGGA ACTTGAA</b>
	<b>IGFBP-3 probe</b>	<b>CCCAGCACACATCGCGTGACTGA</b>
PBGD	PBGD-F	TGAAAACCTTGTACCCTGGCATA
	PBGD-R	TCCAATCTTAGAGAGTGCAGTATCAAGA
	PBGD probe	TTGAAATCATTGCTATGTCCACCACAGG

Forward (F) und Reverse (R) für die Polymerase Kettenreaktion Amplifikation und die fluoreszierenden Proben für die Analyse des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors I (IGF-I), des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors II (IGF-II), des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor I Rezeptors (IGF-I R), des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor II Rezeptors (IGF-II rec), des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Bindungsproteins I (IGFBP-1), des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Bindungsproteins 3 (IGFBP-3) und der Porphobilinogen Desaminase (PBGD). Alle Proben wurden mit 6FAM an ihrem 5'- und TAMRA an ihrem 3'-Ende markiert.

### 3.1.9 Tierstämme

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

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

Die Munich-Wistar-Frömter-Ratte, kurz MWF-Ratte, ist ein Rattenmodell mit ausgeprägter kongenitaler Oligonephronie, deren Nephronenzahl nach unveröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe um 51% verringert ist (Tabelle 5). Es vereint in sich die klinisch bedeutsamen Risikofaktoren der Progression der chronischen Niereninsuffizienz: die Entwicklung eines spontanen arteriellen Hypertonus sowie einer Proteinurie (Tabellen 5 und 6). Das Tiermodell eignet sich daher hervorragend zur Identifizierung genetischer Faktoren, die an der Entwicklung einer kongenitalen Oligonephronie beteiligt sind. Der Stamm wurde 1996 am UKBF, FU-Berlin, durch Inzucht etabliert. Die Tiere stammten aus der ursprünglichen Kolonie des MWF/Ztm- Stammes des zentralen Tierlaboratoriums der Medizinischen Hochschule Hannover.

Die Wistar-Ratte ist ein gesundes Rattenmodell, das sich im Alter von 12-14 Wochen bei gesunder Niere normoton und ohne Proteinurie darstellt und regelmäßig als Referenzstamm bei Untersuchungen an MWF-Tieren genutzt wird. Die Wistar-Ratten liegen genetisch sehr nahe am Ursprungsstamm der MWF-Ratte, wodurch genetische Unterschiede - von der Nephronenzahl abgesehen – minimiert werden [105].

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

Für unsere Untersuchungen wurden insgesamt 12 MWF-Ratten und 12 Wistar-Ratten verwendet.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Tierexperimentelle Untersuchungen**

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

#### **3.2.1.1 Haltung der Tiere**

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

#### **3.2.1.2 Organentnahme**

Für die Organentnahme der embryonalen Nieren am Embryonaltag 19 wurden die schwangeren Ratten mit Ketanest S25 (01,175mg / 100g KG) plus Xylazin (0,065mg / 100g KG) intraabdominell narkotisiert und in Rückenlage gelagert. Bei unzureichender Narkosetiefe wurde jeweils die Hälfte der Initialdosis nachappliziert, bis eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war. Nach jeweils medianer Laparotomie wurde der Uterus entnommen und die Muttertiere wurden durch Entfernung des Herzens getötet. Die Embryonen wurden durch Dekapitation getötet. Es folgte die Präparation der jeweils vorhandenen Embryonen zur Entnahme der Nieren. Der Zugang zur Freilegung der retroperitonealen Nieren erfolgte ebenfalls mittels medianer Laparotomie.

Die Organentnahme bei den Jungtieren am postpartalen Tag D7 erfolgte ebenfalls nach intraabdomineller Narkotisierung mittels Ketanest und anschließender Tötung

durch Dekapitation. Nach medianer Laparotomie wurden die Nieren retroperitoneal freipräpariert und entnommen.

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

### **3.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen**

#### 3.2.2.1 Expressionsanalyse des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Systems

Aus Leber- und Nierengewebe wurde RNA isoliert und die Reverse Transkription von 1µg RNA durchgeführt. Um die Expressionskonzentrationen zu quantifizieren wurde eine Echtzeit Polymerase Kettenreaktionsmethode („real-time polymerase chain reaction“, rt-PCR) verwendet. Dazu stand ein ABI PRISM 7000 SDS Instrument in Verbindung mit dem ABI TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) zur Verfügung. Das Reaktionsvolumen hatte 25µl mit einer endgültigen Konzentration von 200nmol für die Primer wie auch die Proben. Die PCR wurde nach den Richtlinien des Herstellers durchgeführt. Passende Primer und fluoreszente Proben wurden mit Hilfe der Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) entworfen (Tabelle 4). TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) synthetisierte die fluoreszenten Proben, die Primer wurden von Prologo (Paris, Frankreich) synthetisiert. Die Relative Quantifizierung wurde mittels der Methode der *Standard Kurve* ermittelt. Für jedes Gen wurde ein PCR Fragment kreiert, welches die Sequenz des Taqman Systems enthielt. Sieben Serien von 1:10 Verdünnungen dieses Fragments dienten als Standard Kurve, die zusammen mit den korrespondierenden unbekanntem Proben auf jeder Platte untersucht wurden. Jede Probe wurde im Triplet gemessen. Um die Expressionsdaten zu normalisieren nutzten wir die Porphobilinogendesaminase (PBGD) als „housekeeping“ Gen. Die DANN-Sequenzen der Oligonukleotide, welche für IGF-I, IGF-II, IGF-I receptor, IGF-II receptor, IGFBP-1, IGFBP-3, and PBGD verwendet wurden sind in Tabelle 2 angeführt.

### 3.2.2.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus dem bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen Nierengewebe erfolgte über die Trizol-Methode. Dazu wurden 100 mg Gewebe in 1 ml eisgekühltem Trizol ca. 2x 30 sec mit dem Sono-Stab Polytron auf Eis homogenisiert und bei 5.000 Upm für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zur Entfernung grober Partikel zentrifugiert. (Alle Zentrifugationsschritte erfolgten mit der Eppendorf Tischzentrifuge 5402, Hamburg, Deutschland). Der abpipettierte Überstand wurde zur kompletten Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe für ca. 1h bei Raumtemperatur gelagert und zur Phasenseparation mit 200  $\mu\text{l}$  Chloroform/1 ml Trizol vermischt, für 2-3 min bei RT inkubiert und bei 12.000 Upm für 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die RNA, die sich in der oberen durchsichtigen Phase befand, wurde mit 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol/1 ml Trizol präzipitiert und für 10 min bei RT gelagert. Anschließend wurde die RNA bei 12.000 Upm für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml 75%igem,  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Ethanol/1 ml Trizol gewaschen und bei 4.900 Upm für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet 5 min luftgetrocknet und in 50  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  bei  $60^{\circ}\text{C}$  in 5 min gelöst. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte über eine 1:200-Verdünnung mit DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  im Photometer bei 260-280 nm. Zur Überprüfung der Integrität der RNA wurden 1  $\mu\text{l}$  (ca. 500 ng) der RNA und 0,5  $\mu\text{l}$  Laufpuffer in einem Gesamtvolumen von 6 ml auf ein 1%iges Agarose/Ethidiumbromid-Gel, bestehend aus 30 ml 1x TAE und 3  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid (10 mg/ml), aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von ca. 5 V/cm Elektrodenabstand und einer Stromstärke von ca. 200 mA über ungefähr 35 min. Die extrahierte RNA wurde anschliessend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.2.3 Gelelektrophorese und optische Konzentrationsmessung (Photometrie)

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

**Abbildung 3: Nachweis der extrahierten RNA mittels Gelelektrophorese.**

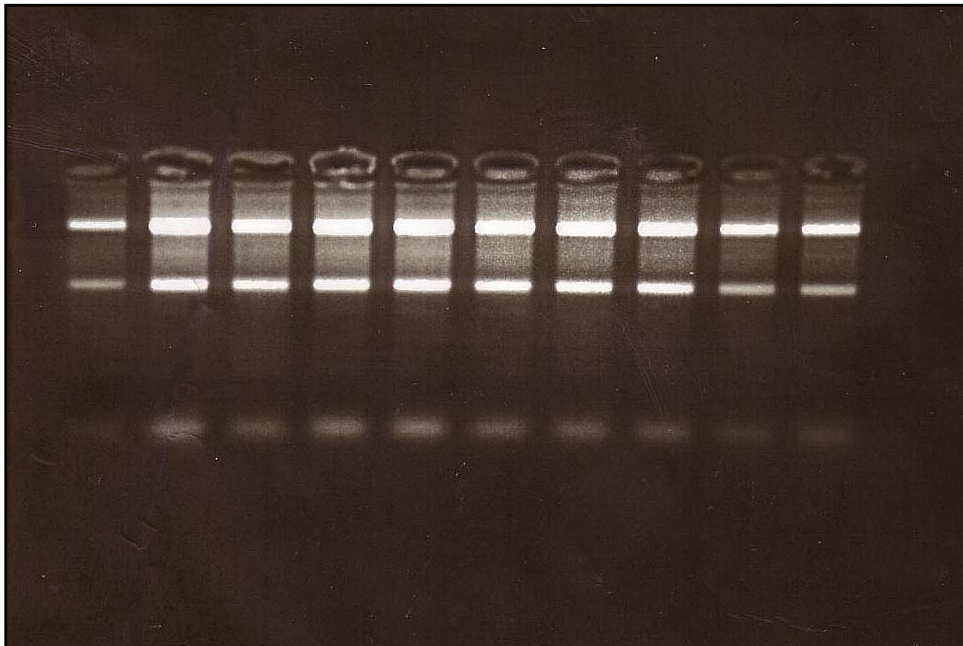


Abb. 3: Elektrophorese mit den rRNA-spezifischen Banden der 28S und der 18S-Untereinheit.

Waren die Banden in allen Proben gut zu identifizieren, wurde anschließend die genaue RNA-Konzentration mit dem Photometer bestimmt. Dazu wurden 4µl der RNA mit 96µl DEPC versetzt und nach vorheriger Leerkontrolle wurde die Dichte der Probe bei 260 (A1) und bei 280 (A2) nm Wellenlänge gemessen. Zur optimalen Qualität der Probe sollte der Quotient A1/A2 zwischen 1,5 und 2 liegen, da sonst von einer Proteinverunreinigung oder einer Degradation der RNA ausgegangen werden musste. Die Konzentration wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet.

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

Die errechnete Konzentration stellte die Grundlage für die weiteren quantitativen Analysen mittels Taqman-PCR dar.

#### 3.2.2.4 Reverse Transkription

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

##### 1. *Annealing der random hexamer primer*

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

##### 2. *Reverse Transkription*

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

#### 3.2.2.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine schnelle und sensitive Methode der DNA-Analytik. Sie ist eine *primerdefinierte*, enzymatische Replikation, mit deren Hilfe man eine annähernd exponentielle Amplifikation einer bestimmten Zielsequenz erreicht. Zur weiteren Quantifizierung der mRNA waren bisher Methoden wie *Northern Blot* oder *dot blot* notwendig, die viel Zeit sowie große Mengen an RNA erforderten. Mittels der PCR lassen sich definierte Abschnitte der DNA vervielfältigen. Die Probenansätze durchlaufen dabei die Phasen der Denaturierung, der spezifischen Anlagerung durch Hybridisierung („*Annealing*“) und der Elongation. Durch Temperaturerhöhung auf 95°C werden in der Denaturierungsphase die



Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren gelöst, so dass sich in der anschließenden Hybridisierungsphase bei 55°C, (Schmelztemperatur der Primer (T<sub>m</sub>)) die sequenzspezifischen Oligonukleotide vorwärts („*forward*“) und rückwärts („*reverse*“) an ihre Komplementärsequenz anlagern können. Anschließend wird in der Elongationsphase die von den Primern markierte Sequenz amplifiziert.

#### 3.2.2.5.1 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion

Die quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (rt-PCR), wie z.B. die Taq-man PCR, ist eine Methode, die es ermöglicht, während der PCR die Bildung des Produktes direkt zu verfolgen. Der Verlauf der Akkumulation des PCR Produktes über die Zeit lässt Rückschlüsse auf die Menge der enthaltenen Probe (*templates*) zu. Die quantitative *rt*-PCR basiert auf der kontinuierlichen Messung der Fluoreszenz, welche proportional zu der Quantität der amplifizierten DNA zunimmt. Eine quantitative Aussage der während der PCR gebildeten DNA wird somit möglich. In der vorgelegten Arbeit wurden die Technik der Taq-Man PCR verwendet, die nachfolgend genauer beschrieben wird.

#### 3.2.2.5.2 Die Taq-Man-Polymerasekettenreaktion

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

Die Taq-Man-rt-PCR ist eine robuste Technik, die ein akkumulierendes PCR- Produkt in „Echtzeit“ über den Gebrauch einer zweifach TaqMan fluorogen markierten cDNA Sequenz (*reporter* und *quencher fluorophore*) misst. Der fluorogene 5'-Nuklease Ansatz macht sich die endogene 5'-3'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase zunutze, um die TaqMan Sequenz abzubauen, die während der PCR an die Ziel cDNA-Sequenz hybridisiert. Ist die Taq-Man-Sequenz intakt, so wird das fluorophore Signal des Taq-Man-*Reporters* durch die fluorophore Emission des Taq-Man-Quenchers unterdrückt („*quenched*“)..

Während der PCR lagert sich die TaqMan-Sequenz am Ziel-cDNA-Strang an und die 5'-3'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase trennt das fluorophore Reportersignal vom fluorophoren Quenchersignal ab. Der Wegfall des Quenchers führt dem entsprechend zum Anstieg der *Reporter* Fluoreszenz. Die verbleibende Taq-Man-Sequenz dissoziiert von der Ziel-Sequenz, so dass sich die PCR ungehindert

fortsetzen kann. Die Intensität der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge der eingesetzten Ziel-cDNA.

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

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

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

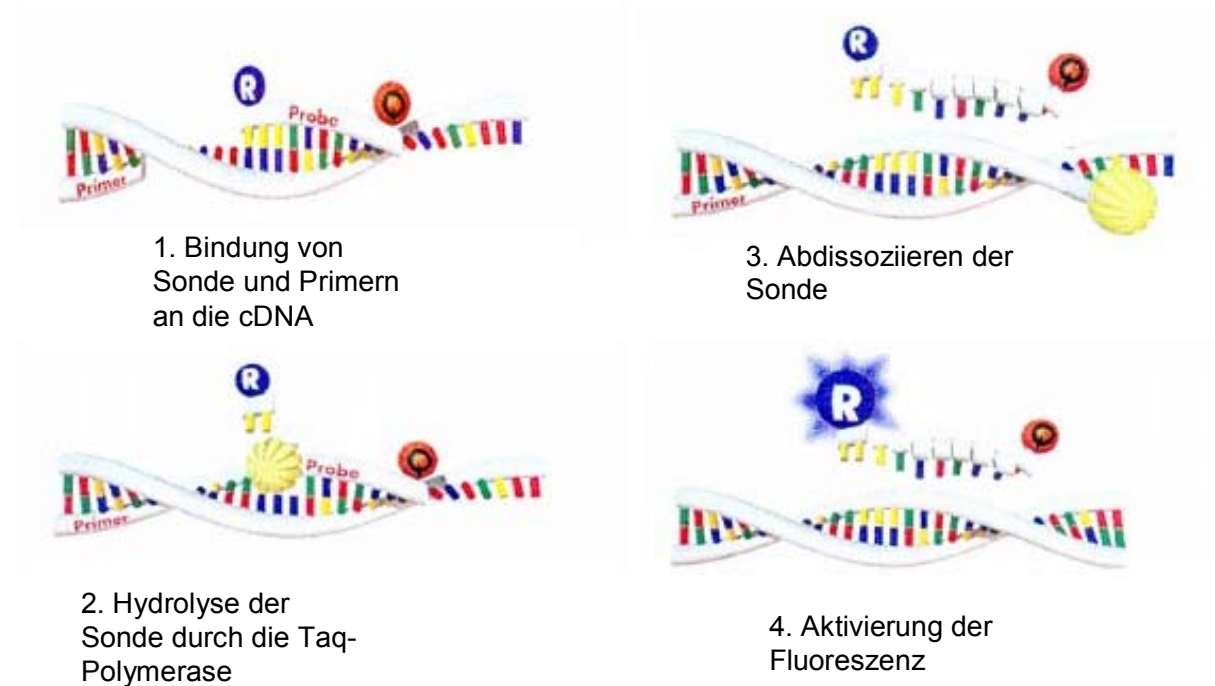
Die Taqman-PCR ist eine PCR-Methode, bei der gleichzeitig die Amplifikation der Zielsequenz und seine Quantifizierung in einem Reaktionsgefäß ermöglicht werden. Dies gelingt auch dann, wenn nur geringe Mengen an RNA in der Probe vorhanden ist. Die Reduzierung der Arbeitsschritte und der im Vergleich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

Es wird bei der Taq-Man-PCR zunächst eine für die zu amplifizierende Sequenz spezifische Sonde angefertigt. Dieses Oligonukleotid ist am 5'-Ende mit einem

fluoreszierenden *reporter*-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat=FAM) markiert, das 3'-Ende trägt einen *quencher*-Farbstoff (Rhodamin-Derivat=TAMRA). Die Wahl der Sonde erfolgt mit dem Programm Primer Express, (Applied Biosystems, Foster City, USA) das speziell für das Design der Taq-Man-Sonden sowie Taq-Man-primern geeignet ist. Die Sonde ist hochspezifisch für das zu amplifizierende Produkt.

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

#### Funktionsweise der Taq-Man-rt-PCR



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

#### 3.2.2.5.2.1 Primer- und Sondendesign

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

*Zur Herstellung von TaqMan-Sonden sollten folgende Regeln beachtet werden:*

Der G-C-Gehalt sollte zwischen 30-80% betragen. Aneinanderreihungen identischer Nukleotide sollten vermieden werden. Dies gilt besonders für vier und mehr Guanin. Aneinanderreihungen. Des Weiteren sollte kein Guanin am 5'-Ende erscheinen. Schließlich sollte der Strang mit einem höheren Cytosin als Guanin Anteil als Sonde ausgewählt werden.

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

*Ähnlich erfolgt die Herstellung von Taq-Man-Primern*

Die *Primer* werden nach der Sonde ausgewählt. Man wählt die Primer in größtmöglicher Nähe zu der Sonde, ohne diese zu überlappen. Der G-C-Gehalt sollte ebenfalls zwischen 30-80% liegen. Aneinanderreihungen identischer Nukleotide sind zu vermeiden. Das Auftreten von mehr als vier Guaninnukleotiden sollte ebenfalls vermieden werden. Beim Anwenden der *Primer Express®*-Software sollte die Temperatur auf 58°C-60°C gelegt werden. Die fünf Nukleotide am 3'-Ende sollten nicht mehr als zwei Guanin- und/oder Cytosin-Basen enthalten.

### 3.2.2.5.2.2 Auswertung der PCR-Ergebnisse – Quantifizierungsstrategie

Zur Auswertung des *TaqMan*-assay wird die Strategie der relativen Quantifizierung mit Standardkurven verfolgt. Dabei wird das Expressionsniveau des untersuchten Gens auf die Expression eines *housekeeping*-Gens normiert. Ein *housekeeping*-Gen ist ein Gen, welches idealerweise ungeachtet experimenteller Bedingungen *in vitro* oder bei Krankheiten *in vivo* im untersuchten Gewebe konstant in der gleichen Menge exprimiert wird. Bekannte und häufig eingesetzte Vertreter dieser Klasse sind z.B.  $\beta$ -Actin, GAPDH, Cyclophilin, 18S-rRNA, PBGD (Porphobilinogendeaminase) und andere. PBGD wurde in der vorliegenden Arbeit als *housekeeping*-Gen benutzt. Eine Normierung auf diesen endogenen Standard hat den Vorteil, dass z.B. verschiedene reverse Transkriptions Ansätze mit unterschiedlichen Effizienzen direkt miteinander verglichen werden und bei der Dosierung der RNA Pipettierfehler ausgeglichen werden können. Das Expressionslevel der zu bestimmenden mRNA-Sequenz und der Sequenz des *housekeeping*-Gens wird mit Hilfe von Standardkurven bestimmt. Dazu werden PCR-Fragmente benutzt, die die beim *TaqMan*-Ansatz amplifizierten Sequenzen enthalten. Hierzu werden sieben serielle 1:10 Verdünnungen hergestellt, die auf jedem Ansatz des jeweiligen Gens als Standards bekannter Konzentrationen mitbestimmt werden. Die Zuordnung der Konzentrationen der Standards kann zwar absolut durch die enthaltene Kopienanzahl erfolgen, im Falle der hier gewünschten Analyse, nämlich eines relativen Vergleiches verschiedener Behandlungsgruppen miteinander, können vereinfachend arbiträre Einheiten korrespondierend zum Verdünnungsgrad gewählt werden. Dem ersten Standard wird dementsprechend die Konzentration 1 zugeordnet, dem zweiten Standard die Konzentration 0,1 usw.

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

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

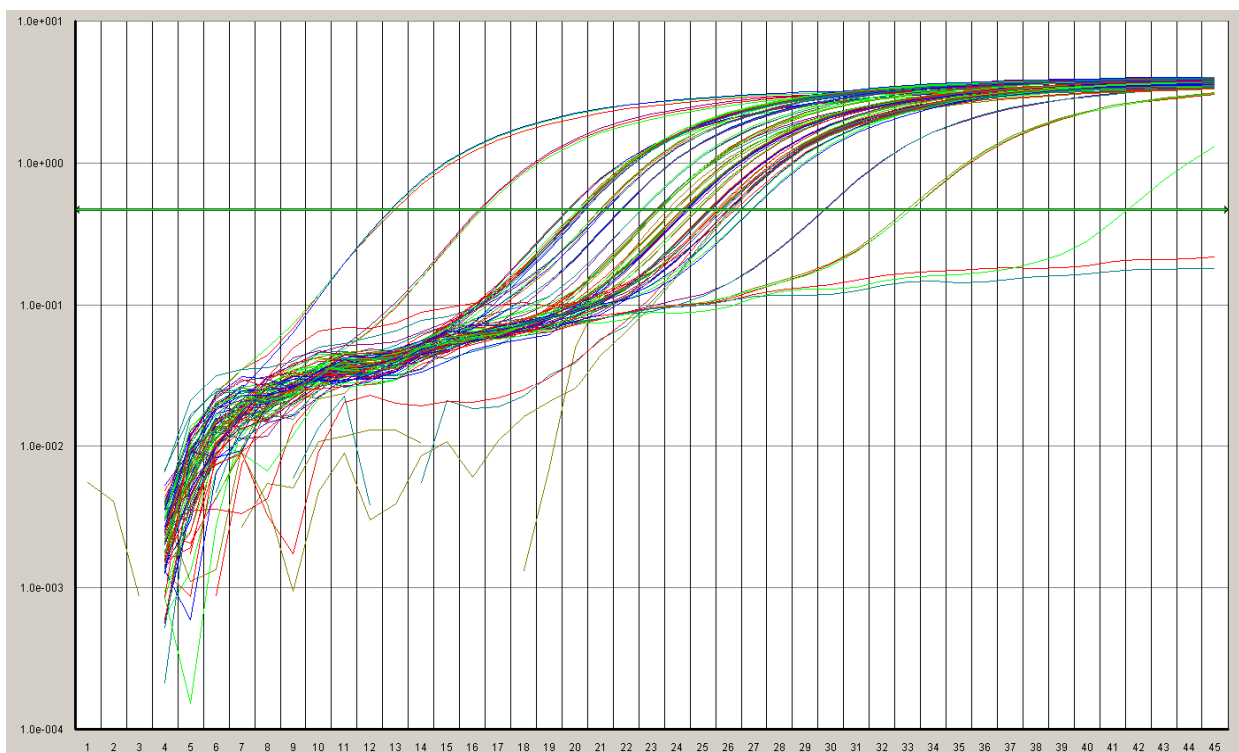
berechnet man die relative Expression (rE) des untersuchten Gens.

Die erhaltenen Quotienten sind einheitenlos und haben keine reale Entsprechung. Die Werte eignen sich jedoch gut zum relativen Vergleich verschiedener Gruppen untereinander. Die Auswertung erfolgt, indem der Mittelwert der rE einer

Kontrollgruppe als 100% definiert wird und die Mittelwerte der anderen Gruppen als Prozent der Kontrolle angegeben werden.

Die PCR-Reaktion ist in ihrer frühen exponentiellen Phase reproduzierbarer als an ihrem Endpunkt. Betrachtet man Amplifikationsplots von Wiederholungen derselben Probe, so erkennt man, dass die Kurven mit zunehmender Zyklenzahl im Bereich ihrer Sättigung immer mehr divergieren, während sie anfänglich praktisch perfekt übereinander liegen. Dies liegt an der exponentiellen Natur der PCR, durch die kleine Schwankungen zu Beginn der Reaktion einen immer größer werdenden Effekt haben können. Je früher eine Auswertung der Amplifikationskurve erfolgt, desto präziser ist daher das Ergebnis.

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



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

### 3.2.2.6 Statistische Analyse

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

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Plazentagewicht-, relative Nieren- und Körpergewichte

#### 4.1.1 relatives Plazentagewicht

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

Abbildung 6a: Verhältnis von Körper-/ Plazentagewicht

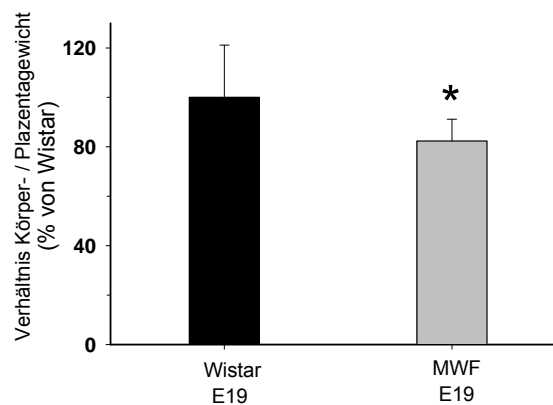


Abb. 6a: Verhältnis von Körpergewicht und Plazentagewicht an Embryonaltag E19 (E19) und den Postnataltagen D1, D7 und D12 in Prozent des Gewichtsverhältnisses bei Wistar,  $n = 18-20$ ,  $*p < 0.05$  vs. Wistar.

#### 4.1.2 relative Nierengewichte

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



Abbildung 6b: Relative Nierengewichte

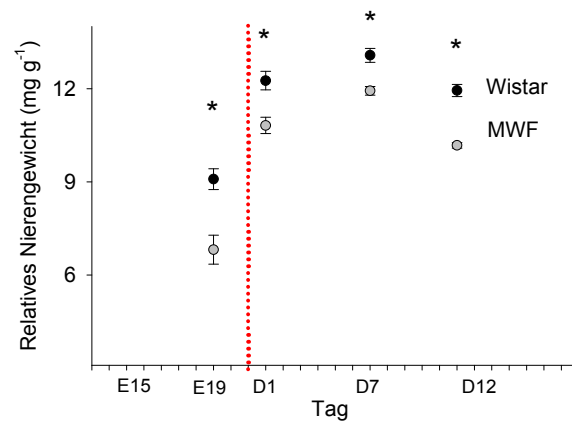


Abb. 6b: Perinatale Nierengewichte bezogen auf das Körpergewicht an Embryonaltag E19 (E19) und an den Postnataltagen 1, 7, und 12 (D1, D7, and D12). Die gepunktete Linie zeigt Embryonaltag E21 an, den Geburtstag, n = 18-54, \*p<0.05 vs. Wistar.

#### 4.1.3 Körpergewichte

Die Körpergewichte der MWF-Tiere waren im Vergleich zu den Wistar-Kontrolltieren an den Embryonaltagen E15, E 17, E19 und an den postnatalen Tagen D1, D7, D12 und D100 reduziert (P < 0.05) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Körpergewichte

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

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

## 4.2 Blutdruck, linksventrikuläres Gewicht, Urinvolumen, Kreatininclearance und Albuminurie

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

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

Der systolische Blutdruck und das Verhältnis des normalisierten linksventrikulären Gewichts des linken Ventrikels zum Körpergewicht war bei den MWF-Tieren im Vergleich zu den Wistar-Tieren an D 100 erhöht ( $P < 0.05$ ) (Tab. 4).

Das Urinvolumen und die Kreatininclearance waren bei den MWF-Tieren im Vergleich zu den Wistar-Kontrolltieren an D100 nicht verändert, jedoch zeigte sich an D100 bei den MWF-Tieren im Vergleich eine starke Zunahme der Urinalbuminexkretion ( $P < 0.05$ ) (Tab. 4).

Tabelle 4:

	Wistar D100	MWF D100
SBD (mmHg)	138 ± 8	159 ± 6 *
LV/KG (mg g <sup>-1</sup> )	1.67 ± 0.04	1.91 ± 0.02 *
NG/KG (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>Krea</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 *
GF (10 <sup>-3</sup> mm <sup>2</sup> )	6.1 ± 0.2	8.2 ± 0.2 *

---

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

## 4.3 Expression des Insulin-ähnlichen Wachstums Faktor Systems

### 4.3.1 Die hepatische mRNA Expression des IGF-Systems

#### 4.3.1.1 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I (IGF-I) mRNA Expression

Die hepatische Expression der IGF-1 mRNA war an Tag E19 (-48%) sowie an Tag D7 (-54%) der MWF Ratten im Vergleich zu den Wistar Ratten erniedrigt. ( $P < 0,05$ , Abb. 7).

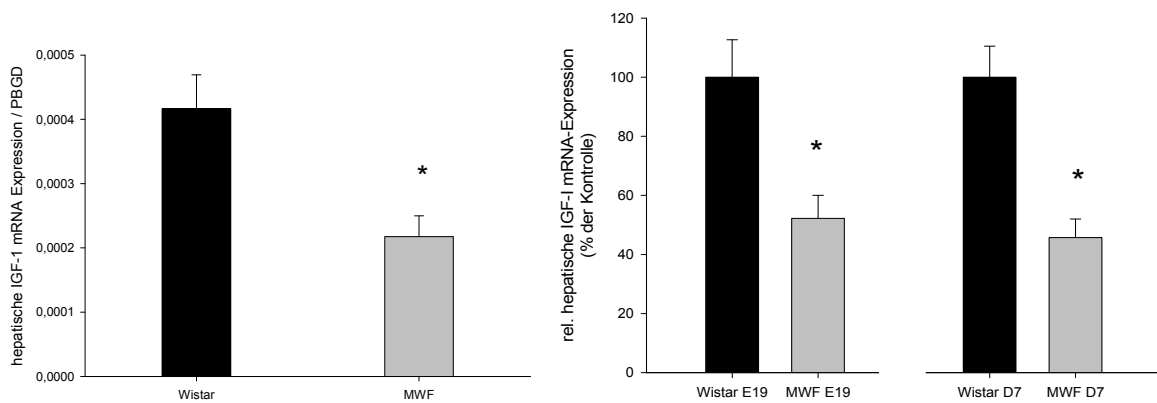


Abb. 7 (a+b) Die hepatische mRNA-Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors I (IGF-I) am Tag 19 der Fetogenese (E19) und an Tag 7 postpartum (D7),  $n=6$ ,  $*P < 0,05$  verglichen zum Wistar Kontrollstamm. Die IGF-I mRNA-Expression wurde links absolut als Quotient (E19 Abb. 7a) der Expression des „Housekeeping“ Gens Porphobilinogen Deaminase (PBGD) und rechts relativ in % der Wistarkontrolle (E19 und D7 Abb. 7b) dargestellt.

Desweiteren war die hepatische Proteinexpression an Tag E19 bei den MWF Ratten im Vergleich zu Wistarratten erniedrigt ( $P < 0,05$  Abb. 8).

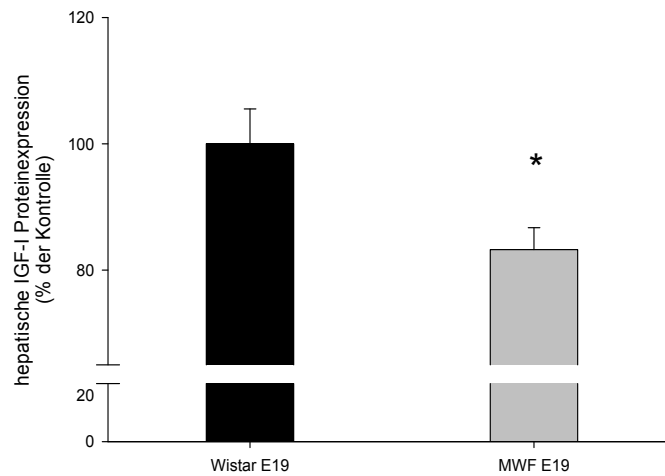


Abb. 8: Die hepatische Proteinexpression von IGF-I an E19,  $n=14$ ,  $*P < 0,05$  im Vergleich von MWF- zu Wistarratten.

#### 4.3.1.2 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I Rezeptor (IGF-I-R) mRNA-Expression

Die hepatische Expression der IGF-1 Rezeptor mRNA am Tag E19 der MWF Ratten im Vergleich zu den Wistar Ratten. (Abb. 9).

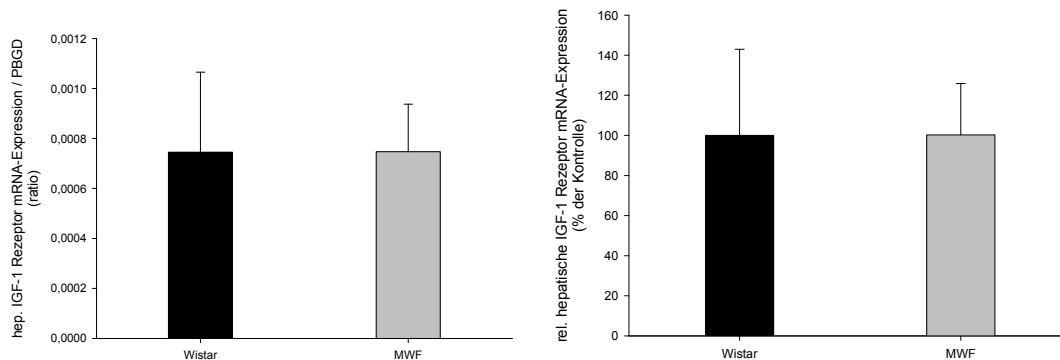


Abb. 9: Die hepatische mRNA-Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor I Rezeptors (IGF-I-R) am Tag 19 der Fetogenese (E19),  $n=6$ , im Vergleich von MWF- zu Wistarratten. Die IGF-I-R mRNA-Expression wird links absolut als Quotient der Expression des „Housekeeping“ Gens Porphobilinogen Deaminase (PBGD) und rechts relativ in % der Wistarkontrolle dargestellt.

#### 4.3.1.3 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor II (IGF-II) mRNA-Expression

Die hepatische Expression der IGF-II mRNA am Tag E19 der MWF Ratten im Vergleich zu den Wistar Ratten. (Abb. 10).

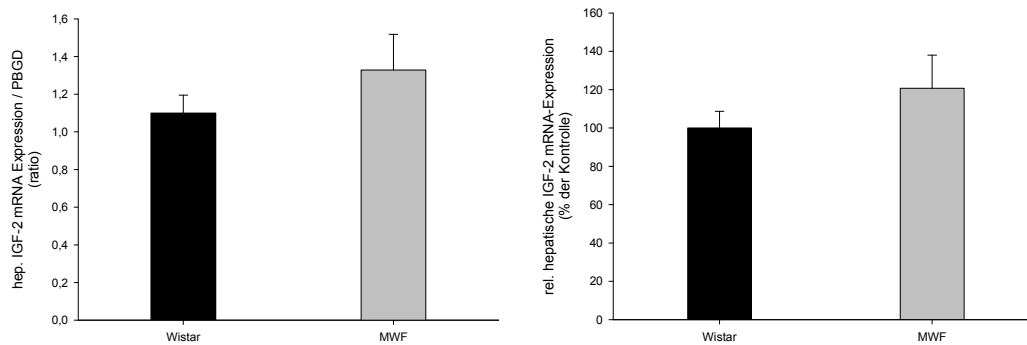


Abb. 10 Die hepatische mRNA-Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors II (IGF-II) am Tag 19 der Fetogenese (E19) im Vergleich von MWF- zu Wistarratten. Die IGF-II mRNA-Expression wird links absolut als Quotient der Expression des „Housekeeping“ Gens Porphobilinogen Deaminase (PBGD) und rechts relativ in % der Wistarkontrolle dargestellt.

#### 4.3.1.4 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I Rezeptor (IGF-II-R) mRNA-Expression

Die hepatische Expression der IGF-II Rezeptor mRNA am Tag E19 der MWF Ratten im Vergleich zu den Wistar Ratten (Abb. 11).

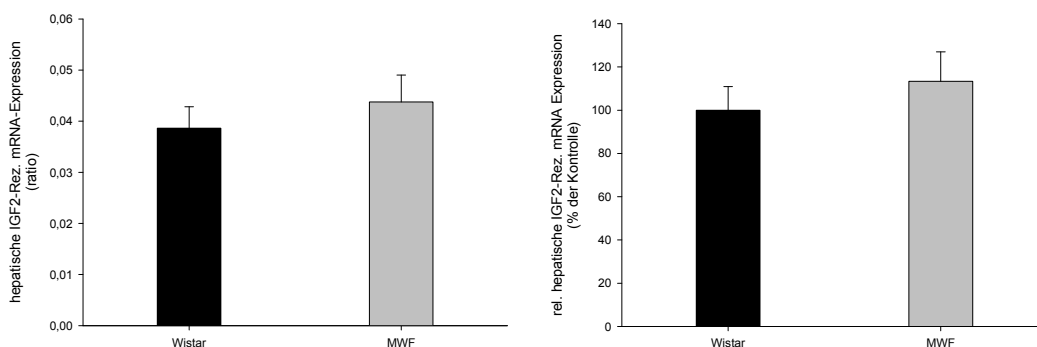


Abb.11 Die hepatische mRNA-Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor II Rezeptors (IGF-II-R) am Tag 19 der Fetogenese (E19) im Vergleich von MWF- zu Wistarratten. Die IGF-II-R mRNA-Expression wird links absolut als Quotient der Expression des „Housekeeping“ Gens Porphobilinogen Deaminase (PBGD) und rechts relativ in % der Wistarkontrolle dargestellt.

#### 4.3.1.5 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Bindungsprotein 1 (IGF-BP1) mRNA-Expression

Die hepatische Expression der IGF-BP1 mRNA am Tag E19 der MWF Ratten im Vergleich zu den Wistar Ratten. (Abb. 12).

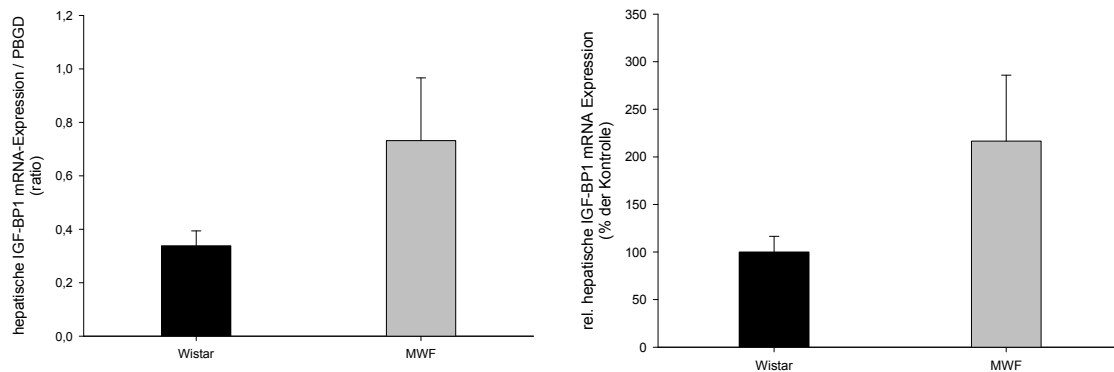


Abb. 12. Die hepatische mRNA-Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Bindungsproteins 1 (IGF-BP1) am Tag 19 der Fetogenese (E19) im Vergleich von MWF- zu Wistarratten. Die IGF-BP1 mRNA-Expression wird links absolut als Quotient der Expression des „Housekeeping“ Gens Porphobilinogen Deaminase (PBGD) und rechts relativ in % der Wistarkontrolle dargestellt.

#### 4.3.1.6 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Bindungsprotein 3 (IGF-BP3) mRNA-Expression

Die hepatische Expression der IGF-BP3 mRNA am Tag E19 der MWF Ratten im Vergleich zu den Wistar Ratten. (Abb. 13).

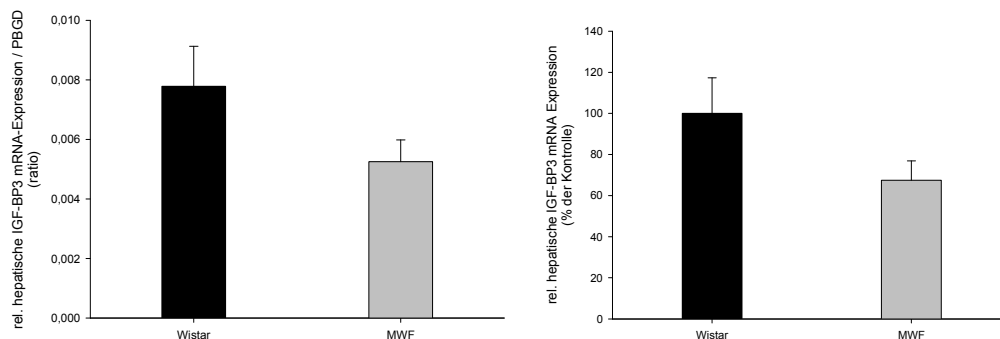


Abb. 13. Die hepatische mRNA-Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Bindungsproteins 3 (IGF-BP3) am Tag 19 der Fetogenese (E19) im Vergleich von MWF- zu Wistarratten. Die IGF-BP3

mRNA-Expression wird links absolut als Quotient der Expression des „Housekeeping“ Gens Porphobilinogen Deaminase (PBGD) und rechts relativ in % der Wistarkontrolle dargestellt).

Zusammengefaßt zeigten sich bei der Untersuchung der hepatischen mRNA Expression von IGF-II, IGF-I Rezeptor, IGF-II Rezeptor, IGFBP-1 und IGFBP-3 an Tag E19 keine signifikanten Unterschiede zwischen MWF- und Wistarratten.

### 4.3.2 Die renale mRNA Expression des IGF-Systems

#### 4.3.2.1 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I (IGF-I) mRNA Expression

Die renale mRNA Expression von IGF-I am Tag E19 bei den MWF Ratten im Vergleich zu den Wistar Kontrollratten (Abb. 14).

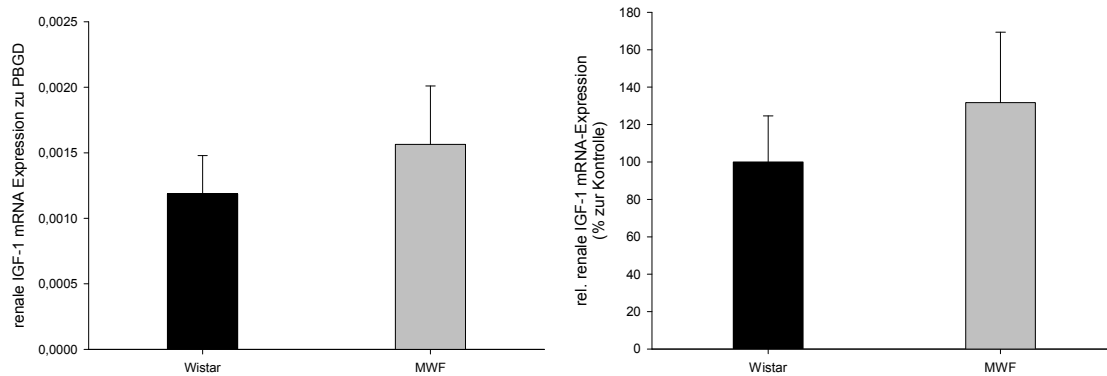


Abb. 14. Die renale mRNA-Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor I (IGF-I) am Tag 19 der Fetogenese (E19) im Vergleich von MWF- zu Wistarratten. Die IGF-I mRNA-Expression wird links absolut als Quotient der Expression des „Housekeeping“ Gens Porphobilinogen Deaminase (PBGD) und rechts relativ in % der Wistarkontrolle dargestellt.

#### 4.3.2.2 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I Rezeptor (IGF-I-R) mRNA-Expression

Die renale mRNA Expression des IGF-I Rezeptors am Tag E19 bei den MWF Ratten im Vergleich zu den Wistar Kontrollratten (Abb. 15).

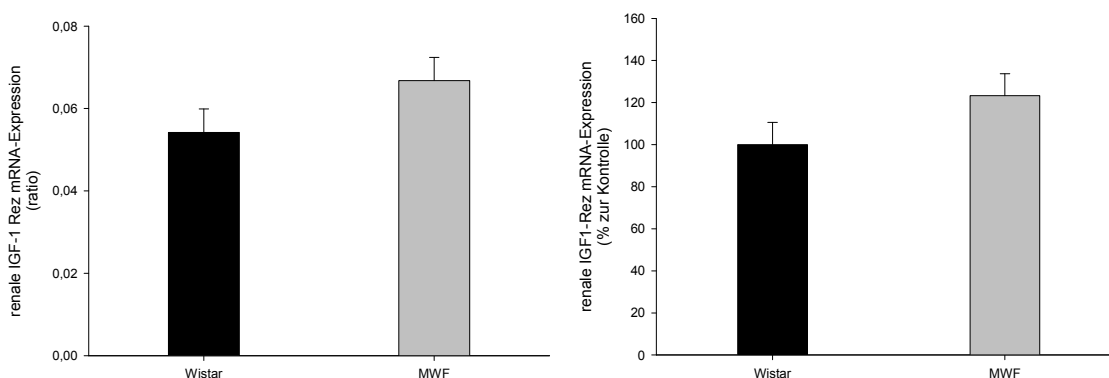


Abb. 15 Die renale mRNA-Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor I Rezeptor (IGF-I-R) am Tag 19 der Fetogenese (E19) im Vergleich von MWF- zu Wistarratten Die IGF-I-R mRNA-Expression



wird links absolut als Quotient der Expression des „Housekeeping“ Gens Porphobilinogen Deaminase (PBGD) und rechts relativ in % der Wistarkontrolle dargestellt).

#### 4.3.2.3 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor II (IGF-II) mRNA-Expression

Die renale mRNA Expression von IGF-II am Tag E19 bei den MWF Ratten im Vergleich zu den Wistar Kontrollratten (Abb. 16).

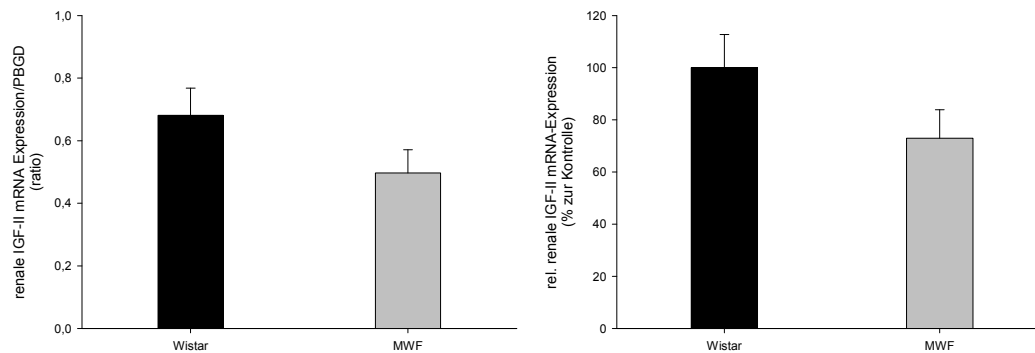


Abb. 16 Die renale mRNA-Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor II (IGF-II) am Tag 19 der Fetogenese (E19) im Vergleich von MWF- zu Wistarratten. Die IGF-II mRNA-Expression wird links absolut als Quotient der Expression des „Housekeeping“ Gens Porphobilinogen Deaminase (PBGD) und rechts relativ in % der Wistarkontrolle dargestellt.

#### 4.3.2.4 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor II Rezeptor (IGF-II-R) mRNA-Expression

Am Tag E19 war die renale mRNA Expression des IGF-II Rezeptors bei MWF- im Vergleich zu Wistarratten um 52% erhöht (\* $P < 0,05$ , Abb. 17 a). Im Gegensatz zum pränatalen Tag E19 (+52%) gab es am postnatalen Tag D7 (+33%,  $P > 0,05$ ) keine signifikanten Unterschiede in der renalen mRNA Expression des IGF-II Rezeptors zwischen den MWF- und Wistarratten (Abb. 17 b).

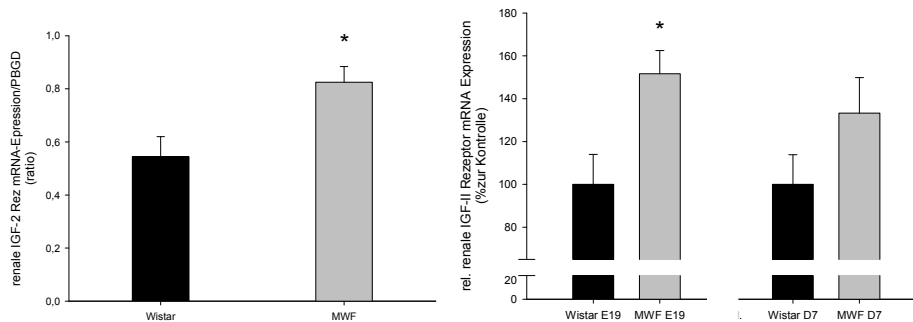
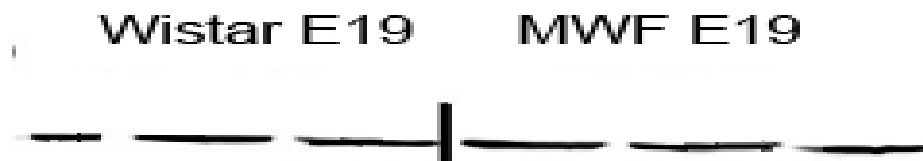


Abb. 17 (a) Die renale mRNA-Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor II Rezeptors (IGF-II-R) am Tag 19 der Fetogenese (E19),  $n=6$ , \* $P < 0,05$  als Quotient der Expression des „Housekeeping“ Gens Porphobilinogen Deaminase (PBGD) im Vergleich von MWF- zu Wistarratten.

Abb. 17 (b) Die renale mRNA-Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor II Rezeptors (IGF-II-R) von MWF- zu Wistarratten an den Tagen E19 und D7. Die IGF-II-R mRNA-Expression wird relativ in % der Wistarkontrolle dargestellt

Eine Western Blot Analyse bestätigte die erhöhte renale IGF-II Rezeptor Protein-Expression (Abb. 17c).



(c) Western blot Analyse der renalen IGF-II Rezeptor Proteinexpression am Tag E19. MWF- im Vergleich zu Wistarratten.

#### 4.3.2.5 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Bindungsprotein 1 (IGF-BP1) mRNA-Expression

Die renale mRNA Expression des IGF-Bindungsproteins am Tag E19 bei den MWF Ratten im Vergleich zu den Wistar Kontrollratten (Abb 18).

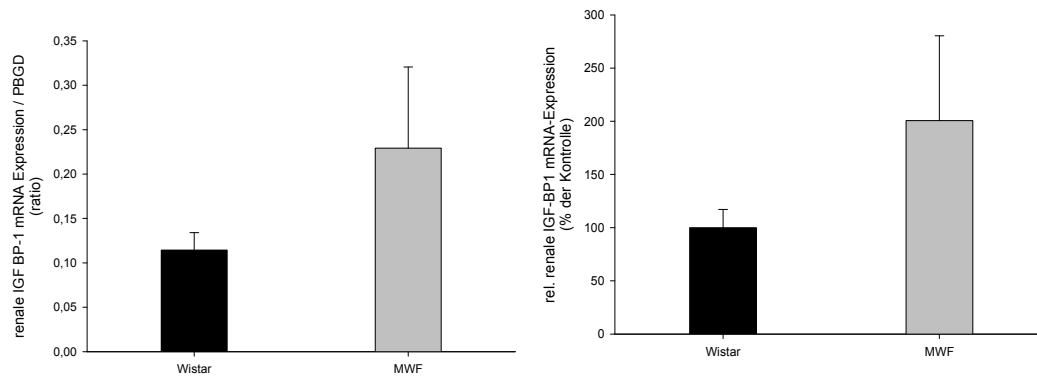


Abb. 18 Die renale mRNA-Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Bindungsproteins 1 (IGF-BP1) am Tag 19 der Fetogenese (E19) im Vergleich von MWF- zu Wistarratten. Die IGF-BP1 mRNA-Expression wird links absolut als Quotient der Expression des „Housekeeping“ Gens Porphobilinogen Deaminase (PBGD) und rechts relativ in % der Wistarkontrolle dargestellt.

#### 4.3.2.6 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Bindungsprotein 3 (IGF-BP3) mRNA-Expression

Am Tag E19 war die renale mRNA Expression des IGFBP-3 bei den MWF Ratten im Vergleich zu den Wistar Kontrollratten um 113% erhöht (\* $P < 0,05$ ). Im Gegensatz zum pränatalen Tag E19 gab es am postnatalen Tag D7 (+2%) keinen signifikanten Unterschied in der renalen mRNA Expression des IGF BP-3 zwischen den MWF- und Wistarratten ( $P > 0,05$ , Abb. 19).

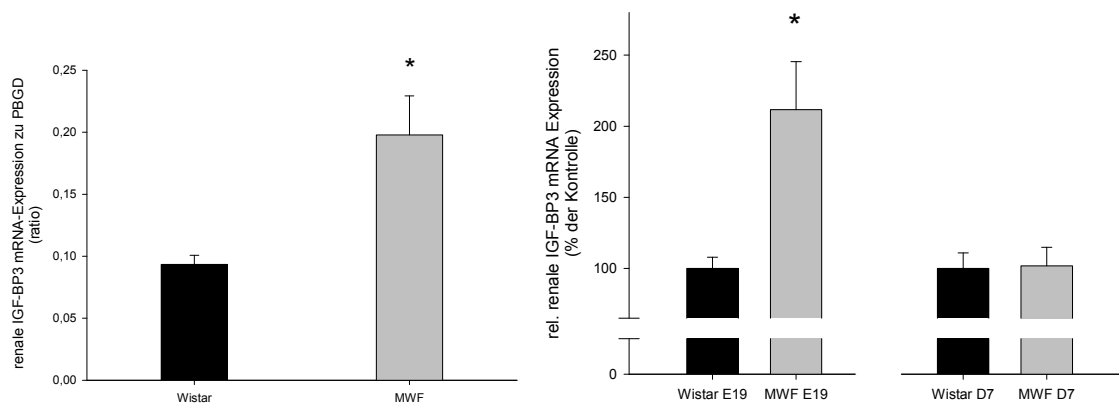


Abb. 19 (a) Die renale mRNA-Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Bindungsproteins 3 (IGF-BP3) am Tag 19 der Fetogenese (E19) als Quotient der Expression des „Housekeeping“ Gens Porphobilinogen Deaminase (PBGD) im Vergleich von MWF- zu Wistarratten.

Abb. 19 (b) Die renale mRNA-Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Bindungsproteins 3 (IGF-BP3) an E19 und D7 ( $n=6$ , \* $P < 0,05$ ) im Vergleich von MWF- zu Wistarratten. Die IGF-BP3 mRNA-Expression wird relativ in % der Wistarkontrolle dargestellt.

Zusammengefaßt war die renale mRNA-Expression von IGF-I, IGF-I Rezeptor, IGF-II sowie dem IGF-BP1 am Tag E19 dem Tag D7 sehr ähnlich und zeigte keine signifikanten Unterschiede.

## 5 Diskussion

### 5.1 Die Oligonephronie – Bedeutung für die Pathogenese der Hypertonie

Verschiedene Arbeiten unterstützen die Hypothese dass eine reduzierte Anzahl an funktionstüchtigen Nephronen eine Schlüsselrolle im Pathomechanismus der Entwicklung einer Hypertonie spielen kann. So zeigte Keller an einer Gruppe von zehn verunfallten weißen Menschen mittleren Alters, bei denen eine Hypertonie anamnestisch bekannt war, eine um 46% verringerte Anzahl an Nephronen zu einer gesunden Kontrollgruppe [61]. In Übereinstimmung dazu zeigt eine Studie von Hoy eine umgekehrte Proportionalität von der Anzahl der Glomerula zu ihrem korpuskulären Volumen. Je geringer die Anzahl der Nephronen war, umso größer war ihr korpuskuläres Volumen und damit die Perfusion des einzelnen Nephrons. Dies prädisponiert mit hoher Wahrscheinlichkeit für ein späteres Auftreten einer Glomerulosklerose [53]. Diese Auffassung wird von Arbeiten unterstützt, die zeigen, dass sich in Rattenstämmen, bei denen auf Grund einer Erbanlage die Anzahl an Nephronen bei der Geburt reduziert ist, im späteren Leben ein Hypertonus entwickelt [109].

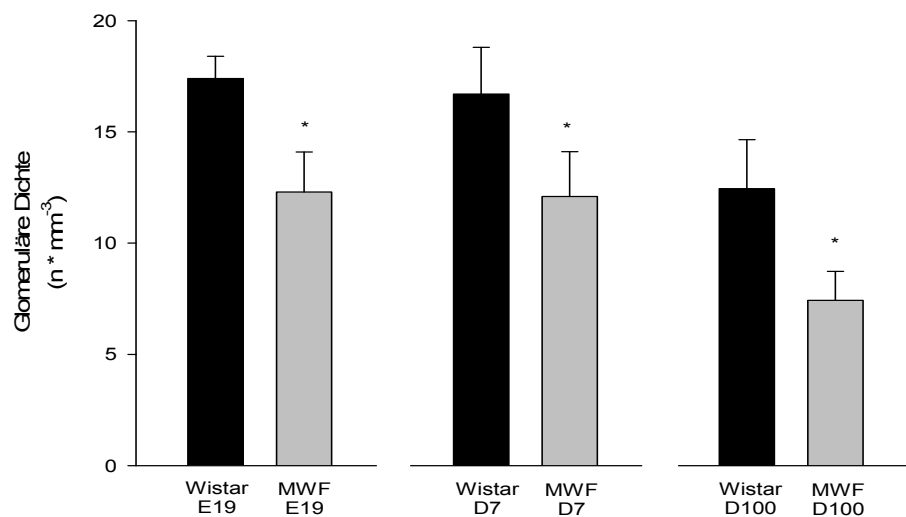


Abb. 20 Glomeruläre Dichte an Tag 19 der Fetogenese (E19), an Tag 7 postpartum (D7) und an Tag 100 (D100), n=8, \*p<0,05 verglichen zur Wistar Kontrollratte. MWF, Munich-Wistar-Frömter Ratten. Reproduziert mit der freundlichen Genehmigung der AG PD. Dr. L. Rothermund

In Vorarbeiten zu der vorgelegten Arbeit hat sich bestätigt, dass diese reduzierte Anzahl an Nephronen schon am fetalen Tag E19 (Abb. 20) vorhanden ist und wird mit einer in der Folge ansteigenden glomerulären Fläche am Tag 100 (D100) in Verbindung gebracht (Tab. 4). Diese anatomischen Charakteristika werden mit diversen funktionellen Störungen in Zusammenhang gebracht [31]. Ebenso wurde über eine Erhöhung der Filtrationsrate eines einzelnen Nephrons bei der MWF Ratte berichtet [31]. In Übereinstimmung mit dem Konzept der „Volumen-Druck Balance“ von Guyton [38] kommt es nach Salzbelastung zu einem Ansteigen des systolischen Blutdrucks beim MWF Rattenmodell [67]. Der spontane Hypertonus bei einem genetischen determiniertem Mangel an Nephronen führt bei MWF Ratten zu einer Albuminurie und einer progredienten renalen Schädigung [31, 67].

Pathomechanismen, die während der embryofetalen Nierenentwicklung zu einem genetisch determinierten Nephronenmangel führen sind bisher unbekannt. Deshalb wurde in dieser vorgelegten Arbeit die Expression von Schlüsselmolekülen des IGF Signal Systems während der Nephrogenese bei der MWF Ratte untersucht.

## **5.2 Auswahl des Tiermodells**

Um die Genexpression in der Niere während der intrauterinen Entwicklung und post partum zu untersuchen, wurde ein Tiermodell gewählt, welches durch eine angeborene verminderte Anzahl von Nephronen mit spontanem salzsensitiven arteriellen Hypertonus, Albuminurie und chronisch progredientem Nierenversagen im Erwachsenenalter charakterisiert ist. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Charakteristika entsprechender Tiermodelle.

In Tabelle 5 wird gezeigt, dass bereits auch einige andere Rattenmodelle mit einem angeborenen Hypertonus eine geringere Anzahl an Nephronen aufweisen [14, 109]. Die salzsensitive Dahl-Ratte weist eine Reduktion von 15% auf, die Milan Bluthochdruckratte eine Reduktion von 17% und die spontan-hypertensive Ratte eine Reduktion von 14%. Im salzsensitiven Dahl Rattenmodell wurden sich widersprechende Befunde hinsichtlich der Anzahl der Nephronen erhoben. Azar und Mitarbeiter berichten eine 15%ige Reduktion der Nephronen im salzsensitiven im Vergleich zum salzresistenten Dahl-Rattenstamm [3]. Eine longitudinale Studie von Sterzel und Kollegen zeigt aber, dass eine Albuminurie schon vor Salzbelastung, also im prähypertensiven Stadium, ohne erhöhten glomerulären Druck und mit

unveränderter Nephronenzahl zu beobachten ist [111]. Die progressive renale Schädigung beschleunigt sich nach Manifestation des HT. Eine salzarme Diät verzögert, verhindert jedoch nicht die fortschreitende Nierenschädigung in salzsensitiven Dahl-Ratten [22].

Für unsere Versuche haben wir die MWF-Ratte gewählt, weil sie im Vergleich zu den o.g. Ratten mit einem Defizit von 50% eine sehr viel stärkere Reduktion der Nephrone aufweist (Abb. 20). Diese Reduktion der Nephronenzahl ist bereits ab dem Embryonaltag E19 nachweisbar. [31].

**Tabelle 5:** Nephronenzahl, arterieller Hypertonus und progredientes Nierenversagen in verschiedenen hypertensiven Rattenstämmen

Hochdruck-Rattenstamm	Kontroll-Rattenstamm	% Nephrone vs. Kontrolle	Kommentar	Referenz
Munich-Wistar-Frömter	Wistar	51%	spontaner HT und HT nach Salzbelastung, FSGS	[31, 56]
Dahl salzsensitiv	Dahl salzresistent	85% -100%	HT nach Salzbelastung; FSGS	[96, 111]
Milan-hypertensiv	Milan-normotensiv	83%	HT und keine FSGS	[11]
Prag-hypertensiv	Prag-normotensiv	81%	spontaner HT; keine Daten zu FSGS	[45]
Fawn Hooded	Wistar	100%	Nephronenzahl nicht in Subgruppen mit höchstem HT und FSGS quantifiziert	[23]
PVG/c	Wistar	122%	Hypotonie und Resistenz gegen FSGS	[36]

Abkürzungen: HT, arterieller Hypertonus; FSGS, fokal-segmentale Glomerulosklerose. Tabelle erweitert und modifiziert nach Brenner [14]

Tabelle 6 gibt einen Überblick über morphologische und funktionelle Befunde bei MWF-Ratten.

**Tabelle 6:** Morphologische und funktionelle Befunde bei MWF-Ratten

Parameter	MWF	Referenzstamm	Interpretation	Geschlecht/ Alter in Wo	Referenz
<b>Anzahl der Glomerula pro Niere</b>	m $13,7 \pm 1,4 \cdot 10^3$ w $13,0 \pm 1,8 \cdot 10^3$	Wistar	erniedrigt Faktor 0,5	12-14 Wo	[30]
<b>Systolischer Blutdruck</b> (mmHg)	$184 \pm 17$	ACEI MWF	erhöht ca. 40mmHg	m/34 Wo	[100]
<b>Systolischer Blutdruck</b> (mmHg)	m $165 \pm 2$ w $156 \pm 3$	Lewis	m +30mmHg w +20mmHg	14 Wo	
<b>Systolischer Blutdruck unter 8% NaCl</b> (mmHg)	m $220 \pm 8$ w $192 \pm 9$	MWF Normaldiät	m +55mmHg w +36mmHg	14 Wo	[67]
<b>Proteinurie</b> (mg/d)	$295 \pm 64$	MWF im Alter von 10 Wo	deutlich erhöht, ca. Faktor 10	m/34 Wo	[100]
<b>Albuminurie</b> (mg/d)	$23 \pm 8$	Lewis	deutlich erhöht, ca. Faktor 60	m/14 Wo	
<b>Albuminurie</b> (mg/d) <b>unter 8% NaCl</b>	$87 \pm 20$	MWF Normaldiät	deutlich erhöht, ca. Faktor 4	m/14 Wo	[67]
<b>Glomerulärer Druck</b> $P_{GC}$ (mmHg)	$51 \pm 1$	ACEI MWF	Normal	m/18 Wo	
<b>Proximal tubulärer Druck</b> $P_T$ (mmHg)	$13 \pm 1$	ACEI MWF	Normal	m/18 Wo	[100]
<b>Transglomerulärer Druck</b>	$38 \pm 2$	ACEI MWF	Normal	m/18 Wo	[100]
<b>Einzelnephron GFR</b> SNGFR (nl/min)	$102 \pm 19$	Wistar	erhöht ca. Faktor 2	m/12-14 Wo	[30]
<b>Glomerulärer Plasmafluss</b> $Q_A$ (nl/min)	$367 \pm 114$	Wistar	erhöht ca. Faktor 2	m/12-14 Wo	[30]

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



Diese anatomischen Gegebenheiten werden von einer Reihe funktioneller Änderungen begleitet. So ist z.B. eine Zunahme der Einzelnephronfiltrationsrate bei männlichen, ausgewachsenen MWF-Ratten dokumentiert. Der durch ein Nephronendefizit verursachte spontane Hypertonus wird von einer Albuminurie und progressiven, renalen Schäden wie Glomerulosklerose und interstitieller Fibrose beim ausgewachsenen MWF-Tier begleitet. [31]

Das Munich-Wistar-Frömter (MWF)-Rattenmodell ist das einzige bisher morphologisch und funktionell ausreichend charakterisierte Tiermodell mit ausgeprägter kongenitaler Oligonephronie. Es vereint in sich die klinisch bedeutsamen Risikofaktoren der Progression der chronischen Niereninsuffizienz: spontaner salzsensitiver arterieller Hypertonus und Proteinurie (Tabelle 5 und Tabelle 6). Deshalb ist die MWF-Ratte das momentan beste Modell zur Identifikation ontogenetischer Faktoren, die zur Oligonephronie und anschließender arterieller Hypertonie, Albuminurie und progredienter Niereninsuffizienz führen.

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

Dieser Stamm weist über 50 kapselberührende Nierenkörperchen pro Niere auf [60]. Weil man aus diesen durch Mikropunktion der Bowman-Kapsel direkt Ultrafiltrat gewinnen kann, erschien die MWF für experimentelle Untersuchungen interessant.

In nachfolgenden Untersuchungen wurden dann weitere phänotypische Befunde erhoben. Ausgehend von einer zunächst verringerten Glomeruladichte konnte dann bei den MWF/Ztm-Ratten eine erniedrigte Glomerulaanzahl nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Wistar-cryptorchic-(WC/Ztm-) Ratte war die Glomerulazahl bei MWF/Ztm-Tieren um 27% reduziert [60].

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

In den letzten Jahren hat die Arbeitsgruppe der Dres. Guiseppa und Andrea Remuzzi, Bergamo, wesentliche Untersuchungen bei MWF-Ratten durchgeführt [39,

116, 117, 123, 124, 126-129]. Die Untersucher haben in einer gemeinsamen Arbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Barry M. Brenner, Boston, auf die Bedeutung der MWF-Ratte zum Studium der Pathogenese des arteriellen Hypertonus und der progredienten chronischen Niereninsuffizienz hingewiesen [31]. In dieser Arbeit konnten die Autoren nachweisen, dass männliche MWF-Ratten im Alter zwischen 12 und 14 Wochen eine Proteinurie entwickeln, wohingegen weibliche MWF-Ratten zu diesem Zeitpunkt noch eine normale Proteinausscheidung im Urin aufweisen [31]. Die Anzahl der Glomerula war sowohl in männlichen (-51%) als auch weiblichen (-47%) MWF-Ratten im Vergleich zu Wistar-Kontrollratten signifikant niedriger. Im Verhältnis zum Körpergewicht war sowohl in den männlichen MWF-Ratten als auch in den männlichen Wistar-Ratten die Anzahl der Nephrone um 63% gegenüber den weiblichen MWF- und Wistar-Tieren reduziert [31]. In männlichen MWF-Ratten waren die Einzelnephron-GFR (SNGFR) und der renale Plasmafluß (RPF) im Vergleich zu den anderen drei Gruppen verringert.

Salzbelastung, bei verminderter Nephronenzahl der MWF-Ratten, sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Tieren, führt zu einer ausgeprägten Hypertonie und einem Anstieg der Albuminurie [67]. Basierend auf den bislang durchgeführten Untersuchungen kann man zusammenfassend feststellen, dass männliche MWF-Ratten eine verminderte Glomerulazahl (Nephronenzahl), eine spontane salzsensitive Hypertonie und Proteinurie entwickeln, wobei der intraglomeruläre Druck ( $P_{GC}$ ) normal ist und die nachgewiesene Erhöhung der SNGFR auf einen erhöhten Ultrafiltrationskoeffizienten (Kf) zurückgeführt werden kann. Bisherige Befunde zeigen, dass der erhöhte Kf sowohl durch eine Vergrößerung der Filtrationsfläche wie auch durch eine Erhöhung des druckabhängigen Filtrationsfaktors bei MWF-Tieren hervorgerufen werden kann. Inwieweit die drei Parameter erniedrigte Nephronenzahl, arterielle Hypertonie und Proteinurie kausal zusammenhängen ist momentan noch nicht abschließend geklärt. Die bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass funktionelle Veränderungen an der glomerulären Basalmembran (GBM) für die Manifestation der Proteinurie mitverantwortlich sind [57, 99]. Hierfür sprechen die Befunde, daß eine Therapie des spontanen Hypertonus mit Hemmstoffen des ACE die Proteinurie reduzieren, jedoch nicht normalisieren kann, obwohl keine strukturellen oder ultrastrukturellen Veränderungen nach ACE-Hemmung nachweisbar waren. Eine Behandlung des spontanen Hypertonus mit dem Dihydropyridin-Calciumantagonisten Nitrendipin blieb

hingegen trotz gleicher Senkung des arteriellen Blutdrucks ohne Einfluss auf die Proteinurie. Im Gegensatz zur Nitrendipinbehandlung war der ACE-Hemmer jedoch in der Lage den normalen glomerulären Druck um ca. 10 mm Hg (50 vs. 40 mm Hg) auf niedrig normale Werte zu senken. Infolgedessen kann postuliert werden, dass bei MWF-Ratten ein funktioneller Defekt an der GBM vorliegt, der bereits in Gegenwart eines normalen glomerulären Druckes zur Proteinurie führt. Die Bedeutung von funktionellen Veränderungen und der Einfluss von geschlechtsspezifischen Faktoren wird durch die Tatsache belegt, dass weibliche MWF-Ratten hinsichtlich der Reduktion der Glomerulazahl und der Glomerulagröße ähnliche Veränderungen aufweisen wie männliche Tiere, obwohl die Entwicklung der Hypertonie und Proteinurie deutlich abgeschwächt und verzögert ist. Auf der Basis der bisher berichteten Untersuchungsergebnisse sind die wesentlichen phänotypischen Befunde der männlichen MWF-Ratte in Tabelle 6 zusammengefasst.

Als Kontrollstamm sollen Wistar-Ratten dienen, da diese genetisch sehr nahe am Ursprungstamm der MWF Ratte liegen und damit die genetische Heterogenität ohne Beziehung zur bearbeiteten Pathologie minimal ist [105].

### **5.3 Herabregulation der hepatischen Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor I Expression**

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist die signifikante Reduktion der hepatischen IGF-I Expression in der MWF Ratte mit genetischer Oligonephropathie im Zeitfenster der Nephrogenese (Abb. 7 und 8). Diese Reduktion der hepatischen IGF-I Expression trat sowohl während der fetalen Entwicklung an Tag E19, als auch am postpartalen Tag 7 (D7) auf.

Da man noch nicht die zirkulierenden IGF-I Konzentrationen im Fetus der Ratte messen kann, muss an dieser Stelle auf die eingeschränkte Interpretierbarkeit der untersuchten hepatischen IGF-I mRNA Expression hingewiesen werden, die jedoch die Hauptquelle des zirkulierenden IGF-I ist [112]. Nichtsdestotrotz ist ein übereinstimmendes Ansteigen des Serum IGF-I und der hepatischen IGF-I Expression gut dokumentiert [16]. Als Folge mütterlicher Mangelernährung, war die IGF-I Konzentration sowohl in der mütterlichen als auch in der fetalen Zirkulation

herabgesetzt, begleitet von einer herabgesetzten fetalen hepatischen IGF-I mRNA Expression im Schafsfeten [72].

Überdies zeigt die hepatische IGF-I Expression bei weitem die stärkste Antwort auf Manipulationen an Wachstumshormonkonzentrationen (GH), was darauf hindeutet, dass das der Leber entstammende IGF-I im „GH-abhängigen“ Wachstum eine zentrale Rolle spielt [16]. Demzufolge könnte der beobachtete Mangel an intrahepatischer IGF-I mRNA und Proteinexpression eine Folge hypophysärer Mindersekretion von Wachstumshormonen sein. Durch Lumbers wurde bereits die Hypothese einer Interaktion zwischen der sich entwickelnden Niere und dem Zentralen Nervensystem aufgestellt [82]. Das „*brain sparing*“ ist ein Merkmal der intrauterinen Wachstumsretardierung. Körper- und Nierenentwicklung werden bei intrauteriner Mangelversorgung über zentralnervöse Mechanismen gebremst, um die Hirnentwicklung zu schützen bzw. eine ausreichende Entwicklung des ZNS zu gewährleisten [82].

IGF-I Rezeptoren finden sich im nephrogenen Mesenchym und in den Zellmembranen der Ureterknospe [87]. Die Aufnahme von Antisense Oligonukleotiden gegen den IGF-I Rezeptor der embryonalen Niere, welcher die meisten IGF-I Wirkungen vermittelt, haben gezeigt, dass dieses Signalsystem wahrscheinlich eine Rolle in der Sprossungsmorphogenese der Sammelrohre spielt [80]. Anti- IGF-I Antikörper hemmen *in vitro* die Entwicklung der embryonalen Niere [104].

IGF-I ist, zumindest *in vitro*, für die Tubulogenese von besonderer Bedeutung [33]. Durch das hinzufügen von Antisense Oligonukleotiden zu dem IGF-I Rezeptor an Mäuseorgankulturen, konnte das weitere Wachstum von bereits induzierten Kondensationen unterbunden werden und somit die Ureterknospung verhindert werden [80]. Trotz all dieser Beweise von *in vitro* Studien, zeigen Experimente der Gendeletion von IGF-I und IGF-I Rezeptor, dass diese Gene nicht essentiell für die renale Morphogenese sind. Sie könnten für die endgültige Organgröße von Bedeutung sein [79]. Im Kontrast zu diesen Ergebnissen bei IGF-I *knockout* Versuchen, zeigt eine frühere Studie an Mäusen, dass eine verminderte Bioverfügbarkeit von IGF-I, die durch eine transgene Überexpression an humanem IGFBP-1 erreicht wurde, zu intrauteriner Wachstumsretardierung und einer reduzierten Nephronenanzahl in erwachsenen Mäusen führte [27].

Es existieren Daten die IGF-I eine Rolle in der fetalen Entwicklung des Menschen zuschreiben. Ein Fallbericht beschreibt einen Patienten mit einer homozygoten partiellen Deletion des IGF-I codierenden Gens, bei dem schwere intrauterine Wachstumsretardierung und postnatale Wachstumsstörungen aufgetreten sind [125]. Desweiteren führt ein bekannter Polymorphismus in der Promotorregion des für IGF-I kodierenden Gens zu erniedrigten Serum IGF-I Konzentrationen, welches mit einem signifikant erniedrigten Geburtsgewicht einhergeht [114]. Diese Daten stehen im Einklang mit Beobachtungen über die Korrelation der IGF-I Konzentration im Nabelschnurblut mit dem Geburtsgewicht [94]. Darüber hinaus verringert Mangelernährung die Expression von IGF I [44, 72]. Das könnte dafür sprechen, dass das IGF Signalsystem die Effekte der Mangelernährung an die Nierenentwicklung vermitteln könnte.

Zusammengenommen könnte die verminderte hepatische IGF-I Expression in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle bei der beobachteten Reduktion des Körpergewichts, des relativen Nierengewichts und der glomerulären Dichte in der Gestations- und postpartalen Periode spielen und damit an der Entwicklung des genetischen Hypertonus und der kardiovaskulären Schädigung bei erwachsenen MWF Tieren am Tag D100 (Tabelle 3, Abb. 6a und b, Abb.20) beteiligt sein.

#### **5.4 Reduzierte Bioverfügbarkeit der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren I und II**

Über die starke Verringerung der hepatischen IGF-I Expression hinaus, waren die renale mRNA Expression des IGF-II Rezeptors und die Expression des IGFBP-3 am Tag E19 der fetalen Entwicklung erhöht, nicht aber an D7 post partum (Abb. 17a-c und Abb. 19). Ein hoher Spiegel der Konzentration des Bindungsproteins reduziert die Konzentration des freien, nicht gebundenen IGF-I und -II. Damit weisen unsere Ergebnisse auf einen Mangel der renalen Bioverfügbarkeit von freiem (effektivem) IGF-I und IGF-II während der pränatalen Entwicklung der Niere im MWF Stamm hin. Neben den bekannten Effekten des zirkulierenden IGF-I auf das fetale Wachstum, spielen auch IGF-II und seine Bindungsstrukturen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Säugetiere [35].

Mehrere Studien haben über die Rolle von IGF-II während der fetalen Nephrogenese berichtet. Embryonale Epithelien exprimieren IGF-II und IGF-BPs [79, 80, 87, 104]. IGF-II mRNA ist bei der sich entwickelnden Niere in Ratten, Mäusen und beim Menschen reichlich vorhanden und wird hauptsächlich von den mesenchymalen Zellen exprimiert [1, 78, 86]. Das von der embryonalen Niere produzierte IGF-II wirkt über Bindung an extrazelluläre IGF-Bindungsproteine und in vitro kann die Entwicklung des Metanephros durch zum Kulturmedium hinzugegebene IGF-II-Antikörper unterbunden werden [104]. In metanephrischen Organkulturen konnte gezeigt werden, dass IGF-II sowohl das Wachstum der Metanephros stimuliert, als auch die Zahl der gebildeten Nephrone. IGF-I wirkt demgegenüber nur auf das Wachstum des Metanephros stimulierend [33]. Unlängst konnte gezeigt werden, dass exogen zugeführtes IGF-I nicht die Anzahl an Nephrone erhöhen konnte, die vor dem Ende der Nephrogenese bei neonatalen Ratten mit unilateraler Ureterobstruktion bereits reduziert waren [17]. Während der Nephrogenese ist der IGF-II Rezeptor in der nephrogenen Zone lokalisiert, insbesondere in noch undifferenzierten, mesenchymalen Zellen [1]. Ein Vorhandensein von IGF-II Rezeptor zusammen mit IGF-II und eine Erhöhung der Expression des IGF-II Rezeptorproteins wurde in Nieren von Feten diabetischer Mütter mit einer reduzierten Anzahl an Nephrone beobachtet [1].

Eine verminderte IGF-II Bioverfügbarkeit während der Nephrogenese könnte als Pathomechanismus die Manifestation der genetischen Oligonephronie im MWF Stamm begünstigen.

Auch wenn wir die Möglichkeit nicht ausschließen können, dass die beobachteten Störungen im IGF System des MWF Stammes in Beziehung zu einem anderen genetischen Unterschied des Stammes stehen, der keine Auswirkung auf die Anzahl der Nephrone hätte, unterstützt unsere Studie das Konzept, dass eine reduzierte Bioverfügbarkeit des IGF während der Nephrogenese mit einer genetischen Oligonephronie im MWF in Zusammenhang stehen kann.

Abschließend konnte zum ersten Male gezeigt werden, dass unabhängig von Umgebungsfaktoren der genetisch bedingte Nephrone-mangel schon vor der Geburt am embryonalen Tag E19 während der Entwicklung der Niere der MWF Ratte vorhanden ist. Desweiteren zeigt diese Studie am genetischen Modell als erste, dass

eine Kombination von Veränderungen während der fetalen Expression von wichtigen Elementen des IGF-Signal Systems zu Störungen der IGF Bioverfügbarkeit in der fetalen Niere führen kann. Unsere Daten unterstützen die Hypothese, dass eine Herabregulation der Expression der fetalen hepatischen IGF-I mRNA in Kombination mit einer erhöhten Expression von fetalen renalen IGF-Bindungsproteinmolekülen (IGF-II Rezeptor und IGF BP-3) in Zusammenhang mit einem genetischen Nephronendefizit und einer folgenden Hypertonie im erwachsenen Organismus stehen könnte. Nichtsdestoweniger wird man Interventionsstudien mit der exogenen Zufuhr von IGF-I während der kritischen Phase der Entwicklung der Niere benötigen, um dieses Konzept am MWF Rattenstamm zu beweisen.

### **5.5 Zusammenfassung und Perspektive**

Zusammengefasst hat die hier vorgelegte Arbeit als erste Studie während der Nephrogenese vorhandene Genexpressionsmuster und morphologische Veränderungen bei kongenitaler Oligonephronie im Vergleich zu einem gesunden Kontrollmodell gezeigt. In Zukunft sollte an einem Tiermodell mit kongenitaler Oligonephronie der Versuch unternommen werden, durch pharmakologische Intervention während der Gestations- und Neonatalperiode, eine gesteigerte Bildung von Nephronen zu induzieren, um damit das Auftreten eines arteriellen Hypertonus und einer progredienten Niereninsuffizienz im Erwachsenenalter zu verhindern.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Amri K, Freund N, Van Huyen JP, Merlet-Benichou C, Lelievre-Pegorier M. Altered nephrogenesis due to maternal diabetes is associated with increased expression of IGF-II/mannose-6-phosphate receptor in the fetal kidney. *Diabetes* 2001; **50**(5):1069-1075.
2. Avner ED, Sweeney WE, Jr., Piesco NP, Ellis D. Growth factor requirements of organogenesis in serum-free metanephric organ culture. *In Vitro Cell Dev Biol* 1985; **21**(5):297-304.
3. Azar S, Johnson MA, Hertel B, Tobian L. Single-nephron pressures, flows, and resistances in hypertensive kidneys with nephrosclerosis. *Kidney Int* 1977; **12**(1):28-40.
4. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993; **75**(1):73-82.
5. Ballard J, Baxter R, Binoux M, Clemmons D, Drop S, Hall K, et al. On the nomenclature of the IGF binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989; **121**(5):751-752.
6. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989; **2**(8663):577-580.
7. Baxter RC. Insulin-like growth factor binding proteins as glucoregulators. *Metabolism* 1995; **44**(10 Suppl 4):12-17.
8. Bianchi G, Fox U, Di Francesco GF, Giovanetti AM, Pagetti D. Blood pressure changes produced by kidney cross-transplantation between spontaneously hypertensive rats and normotensive rats. *Clin Sci Mol Med* 1974; **47**(5):435-448.
9. Blaustein MP, Hamlyn JM. Pathogenesis of essential hypertension. A link between dietary salt and high blood pressure. *Hypertension* 1991; **18**(5 Suppl):III184-III195.
10. Blum WF, Hall K, Ranke MB, Wilton P. Growth hormone insensitivity syndromes: a preliminary report on changes in insulin-like growth factors and their binding proteins during treatment with recombinant insulin-like growth factor I. Kabi Pharmacia Study Group on Insulin-like Growth Factor I Treatment in Growth Hormone Insensitivity Syndromes. *Acta Paediatr Suppl* 1993; **82 Suppl 391**:15-19.
11. Brandis A, Bianchi G, Reale E, Helmchen U, Kuhn K. Age-dependent glomerulosclerosis and proteinuria occurring in rats of the Milan normotensive strain and not in rats of the Milan hypertensive strain. *Lab Invest* 1986; **55**(2):234-243.
12. Brassard P, Amiri F, Thibault G, Schiffrin EL. Role of angiotensin type-1 and angiotensin type-2 receptors in the expression of vascular integrins in angiotensin II-infused rats. *Hypertension* 2006; **47**(1):122-127.
13. Brenner BM. Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am J Physiol* 1985; **249**(3 Pt 2):F324-F337.



14. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1988; **1**(4 Pt 1):335-347.
15. Brenner BM, Mackenzie HS. Nephron mass as a risk factor for progression of renal disease. *Kidney Int Suppl* 1997; **63**:S124-S127.
16. 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* 2001; **142**(5):1685-1688.
17. Chevalier RL, Goyal S, Kim A, Chang AY, Landau D, LeRoith D. Renal tubulointerstitial injury from ureteral obstruction in the neonatal rat is attenuated by IGF-1. *Kidney Int* 2000; **57**(3):882-890.
18. Chevallier B, Lagarde A, Degrelle H, Belaisch-Allart J, Giraudet P, Gallet JP. Insulin-like growth factor binding protein 1 level in amniotic fluid: correlation with birth weight. *Biol Neonate* 1998; **73**(6):404-406.
19. Cowley AW, Jr., Mattson DL, Lu S, Roman RJ. The renal medulla and hypertension. *Hypertension* 1995; **25**(4 Pt 2):663-673.
20. Curtis JJ, Luke RG, Dustan HP, Kashgarian M, Whelchel JD, Jones P, et al. Remission of essential hypertension after renal transplantation. 1983. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**(12):2404-2412.
21. D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; **81**(3):935-939.
22. 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; **40**(4):94-101.
23. de Keijzer MH, Provoost AP, Molenaar JC. Glomerular hyperfiltration in hypertensive fawn-hooded rats. *Ren Physiol Biochem* 1988; **11**(1-2):103-108.
24. 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; **345**(6270):78-80.
25. Deutscher S, Epstein FH, Kjelsberg MO. Familial aggregation of factors associated with coronary heart disease. *Circulation* 1966; **33**(6):911-924.
26. Dodic M, Moritz K, Koukoulas I, Wintour EM. Programmed hypertension: kidney, brain or both? *Trends Endocrinol Metab* 2002; **13**(9):403-408.
27. Doublier S, Amri K, Seurin D, Moreau E, Merlet-Benichou C, Striker GE, et al. Overexpression of human insulin-like growth factor binding protein-1 in the mouse leads to nephron deficit. *Pediatr Res* 2001; **49**(5):660-666.
28. Duong Van Huyen JP, Amri K, Belair MF, Vilar J, Merlet-Benichou C, Bruneval P, et al. Spatiotemporal distribution of insulin-like growth factor receptors during nephrogenesis in fetuses from normal and diabetic rats. *Cell Tissue Res* 2003; **314**(3):367-379.

29. Ekblom M, Klein G, Mugrauer G, Fecker L, Deutzmann R, Timpl R, et al. Transient and locally restricted expression of laminin A chain mRNA by developing epithelial cells during kidney organogenesis. *Cell* 1990; **60**(2):337-346.
30. Fassi A, Sangalli F, Colombi F, Perico N, Remuzzi G, Remuzzi A. Beneficial effects of calcium channel blockade on acute glomerular hemodynamic changes induced by cyclosporine 84. *Am J Kidney Dis* 1999; **33**(2):267-275.
31. Fassi A, Sangalli F, Maffi R, Colombi F, Mohamed EI, Brenner BM, et al. Progressive glomerular injury in the MWF rat is predicted by inborn nephron deficit. *J Am Soc Nephrol* 1998; **9**(8):1399-1406.
32. Gaunt TR, Cooper JA, Miller GJ, Day IN, O'Dell SD. Positive associations between single nucleotide polymorphisms in the IGF2 gene region and body mass index in adult males. *Hum Mol Genet* 2001; **10**(14):1491-1501.
33. Gilbert T, Amri K L-PMMMRBVJeal. Insulin-like growth factor II (IGF-II) but not IGF-I stimulates in vitro nephron formation. *J Am Soc Nephrol*, 9:361A (abstract). 1998. Ref Type: Generic
34. Gilbert T, Lelievre-Pegorier M, Merlet-Benichou C. Immediate and long-term renal effects of fetal exposure to gentamicin. *Pediatr Nephrol* 1990; **4**(4):445-450.
35. Grim CE, Luft FC, Miller JZ, Brown PL, Gannon MA, Weinberger MH. Effects of sodium loading and depletion in normotensive first-degree relatives of essential hypertensives. *J Lab Clin Med* 1979; **94**(5):764-771.
36. 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 80. *Lab Invest* 1986; **54**(1):77-83.
37. Guron G, Marcussen N, Nilsson A, Sundelin B, Friberg P. Postnatal time frame for renal vulnerability to enalapril in rats. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**(7):1550-1560.
38. 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; **52**(5):584-594.
39. Guyton AC, Coleman TG, Cowley AW, Jr., Liard JF, Norman RA, Jr., Manning RD, Jr. Systems analysis of arterial pressure regulation and hypertension 11. *Ann Biomed Eng* 1972; **1**(2):254-281.
40. 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 211. *Ren Physiol* 1983; **6**(2):63-71.
41. Hakim RM, Goldszer RC, Brenner BM. Hypertension and proteinuria: long-term sequelae of uninephrectomy in humans. *Kidney Int* 1984; **25**(6):930-936.
42. Hatini V, Huh SO, Herzlinger D, Soares VC, Lai E. Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev* 1996; **10**(12):1467-1478.
43. Haycock GB. Development of glomerular filtration and tubular sodium reabsorption in the human fetus and newborn. *Br J Urol* 1998; **81 Suppl 2**:33-38.

44. Hayden JM, Marten NW, Burke EJ, Straus DS. The effect of fasting on insulin-like growth factor-I nuclear transcript abundance in rat liver. *Endocrinology* 1994; **134**(2):760-768.
45. Hellmann H, Davis JM, Thurau K. Glomerulus number and blood pressure in the Prague hypertensive rat 78. *Kidney Int Suppl* 1998; **67**:S211-S212.
46. Herington AC. Insulin-like growth factors: biochemistry and physiology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1991; **5**(4):531-551.
47. Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, Rauscher FJ, III, Saunders GF. Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res* 1995; **55**(22):5386-5389.
48. Hirning U, Schmid P, Schulz WA, Rettenberger G, Hameister H. A comparative analysis of N-myc and c-myc expression and cellular proliferation in mouse organogenesis. *Mech Dev* 1991; **33**(2):119-125.
49. Hirschberg R, Adler S. Insulin-like growth factor system and the kidney: physiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Am J Kidney Dis* 1998; **31**(6):901-919.
50. Horster MF, Braun GS, Huber SM. Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation 167. *Physiol Rev* 1999; **79**(4):1157-1191.
51. Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM. The case for intrarenal hypertension in the initiation and progression of diabetic and other glomerulopathies. *Am J Med* 1982; **72**(3):375-380.
52. Hoy WE, Bertram JF, Denton RD, Zimanyi M, Samuel T, Hughson MD. Nephron number, glomerular volume, renal disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; **17**(3):258-265.
53. Hoy WE, Douglas-Denton RN, Hughson MD, Cass A, Johnson K, Bertram JF. A stereological study of glomerular number and volume: preliminary findings in a multiracial study of kidneys at autopsy. *Kidney Int Suppl* 2003; (83):S31-S37.
54. Hoy WE, Kondalsamy-Chennakesavan S, Wang Z, Briganti E, Shaw J, Polkinghorne K, et al. Quantifying the excess risk for proteinuria, hypertension and diabetes in Australian Aborigines: comparison of profiles in three remote communities in the Northern Territory with those in the AusDiab study. *Aust N Z J Public Health* 2007; **31**(2):177-183.
55. Hughson M, Farris AB, III, Douglas-Denton R, Hoy WE, Bertram JF. Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight. *Kidney Int* 2003; **63**(6):2113-2122.
56. Hyink DP, Abrahamson DR. Origin of the glomerular vasculature in the developing kidney 2. *Semin Nephrol* 1995; **15**(4):300-314.
57. Iordache BE, Imberti O, Foglieni C, Remuzzi G, Bertani T, Remuzzi A. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular capillary wall ultrastructure in MWF/Ztm rats 97. *J Am Soc Nephrol* 1994; **5**(6):1378-1384.
58. Julius S, Schork MA. Predictors of hypertension. *Ann N Y Acad Sci* 1978; **304**:38-58.

59. Kaplan NM. Clinical Hypertension. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 5th Edition, 1994 . 1994.
60. Kaufmann K. Quantitative vergleichende Untersuchungen zur Bestimmung der Nierenkörperchenanzahl bei der Munich-Wistar-Frömter-Ratte und der Wistar-Cryptorchic-Ratte. Hackbarth H. [*Dtsch Tierärztl Wschr* 1990;97:265-304], 97:265-304. 1990.
61. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med* 2003; **348**(2):101-108.
62. Kim SK, Kwon JY, Nam TJ. Involvement of ligand occupancy in Insulin-like growth factor-I (IGF-I) induced cell growth in osteoblast like MC3T3-E1 cells 328. *Biofactors* 2007; **29**(4):187-202.
63. Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, Brancati FL, Ford CE, et al. Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med* 1996; **334**(1):13-18.
64. Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyk JJ. Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1983; **112**(6):2215-2217.
65. Komhoff M, Wang JL, Cheng HF, Langenbach R, McKanna JA, Harris RC, et al. Cyclooxygenase-2-selective inhibitors impair glomerulogenesis and renal cortical development. *Kidney Int* 2000; **57**(2):414-422.
66. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, et al. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993; **74**(4):679-691.
67. 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**(6):777-782.
68. Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 1994; **78**(2):191-201.
69. Kurokawa K. Kidney, salt, and hypertension: how and why. *Kidney Int Suppl* 1996; **55**:S46-S51.
70. Langley SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)* 1994; **86**(2):217-222.
71. Lazzaro D, De S, V, De ML, Lehtonen E, Cortese R. LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development. *Development* 1992; **114**(2):469-479.
72. 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; **44**(1):163-173.
73. Lelievre-Pegorier M, Vilar J, Ferrier ML, Moreau E, Freund N, Gilbert T, et al. Mild vitamin A deficiency leads to inborn nephron deficit in the rat. *Kidney Int* 1998; **54**(5):1455-1462.

74. LeRoith D, Clemmons D, Nissley P, Rechler MM. NIH conference. Insulin-like growth factors in health and disease. *Ann Intern Med* 1992; **116**(10):854-862.
75. Levine RS, Hennekens CH, Jesse MJ. Blood pressure in prospective population based cohort of newborn and infant twins. *BMJ* 1994; **308**(6924):298-302.
76. Li Z, Stuart RO, Qiao J, Pavlova A, Bush KT, Pohl M, et al. A role for Timeless in epithelial morphogenesis during kidney development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**(18):10038-10043.
77. Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 1996; **272**(5262):676-680.
78. Lindenbergh-Kortleve DJ, Rosato RR, van Neck JW, Nauta J, van KM, Groffen C, et al. Gene expression of the insulin-like growth factor system during mouse kidney development. *Mol Cell Endocrinol* 1997; **132**(1-2):81-91.
79. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 1993; **75**(1):59-72.
80. Liu ZZ, Wada J, Alvares K, Kumar A, Wallner EI, Kanwar YS. Distribution and relevance of insulin-like growth factor-I receptor in metanephric development. *Kidney Int* 1993; **44**(6):1242-1250.
81. Luft FC. Hypertensive nephrosclerosis: update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004; **13**(2):147-154.
82. Lumbers ER, Yu ZY, Gibson KJ. The selfish brain and the barker hypothesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; **28**(11):942-947.
83. Mackenzie HS, Brenner BM. Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension? *Am J Kidney Dis* 1995; **26**(1):91-98.
84. Mackenzie HS, Lawler EV, Brenner BM. Congenital oligonephropathy: The fetal flaw in essential hypertension? 17. *Kidney Int Suppl* 1996; **55**:S30-S34.
85. Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney Int* 2000; **58**(2):770-773.
86. Matsell DG, Bennett T. Evaluation of metanephric maturation in a human fetal kidney explant model. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998; **34**(2):138-148.
87. Matsell DG, Delhanty PJ, Stepaniuk O, Goodyear C, Han VK. Expression of insulin-like growth factor and binding protein genes during nephrogenesis. *Kidney Int* 1994; **46**(4):1031-1042.
88. 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; **8**(2):175-180.
89. Moreau E, Vilar J, Lelievre-Pegorier M, Merlet-Benichou C, Gilbert T. Regulation of c-ret expression by retinoic acid in rat metanephros: implication in nephron mass control. *Am J Physiol* 1998; **275**(6 Pt 2):F938-F945.

90. 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**(1):13-25.
91. Nilsson AB, Nitescu N, Chen Y, Guron GS, Marcussen N, Matejka GL, et al. IGF-I treatment attenuates renal abnormalities induced by neonatal ACE inhibition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; **279**(3):R1050-R1060.
92. Novick AC, Gephardt G, Guz B, Steinmuller D, Tubbs RR. Long-term follow-up after partial removal of a solitary kidney. *N Engl J Med* 1991; **325**(15):1058-1062.
93. Nyengaard JR, Bendtsen TF. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec* 1992; **232**(2):194-201.
94. Ong K, Kratzsch J, Kiess W, Costello M, Scott C, Dunger D. 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; **85**(11):4266-4269.
95. Ooi GT. Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs): more than just 1, 2, 3. *Mol Cell Endocrinol* 1990; **71**(2):C39-C43.
96. Raij L, Azar S, Keane WF. Role of hypertension in progressive glomerular immune injury 73. *Hypertension* 1985; **7**(3 Pt 1):398-404.
97. Rauchman M. The role of homeobox genes in kidney development. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; **9**(1):37-42.
98. Rees WD, Hay SM, Buchan V, Antipatis C, Palmer RM. The effects of maternal protein restriction on the growth of the rat fetus and its amino acid supply. *Br J Nutr* 1999; **81**(3):243-250.
99. Remuzzi A, Puntorieri S, Alfano M, Macconi D, Abbate M, Bertani T, et al. Pathophysiologic implications of proteinuria in a rat model of progressive glomerular injury 90. *Lab Invest* 1992; **67**(5):572-579.
100. 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 208. *J Clin Invest* 1990; **85**(2):541-549.
101. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 1978; **253**(8):2769-2776.
102. Rogers SA, Padanilam BJ, Hruska KA, Giachelli CM, Hammerman MR. Metanephric osteopontin regulates nephrogenesis in vitro 318. *Am J Physiol* 1997; **272**(4 Pt 2):F469-F476.
103. Rogers SA, Powell-Braxton L, Hammerman MR. Insulin-like growth factor I regulates renal development in rodents. *Dev Genet* 1999; **24**(3-4):293-298.

104. 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; **113**(6):1447-1453.
105. Rovira-Halbach G, Alt JM, Brunkhorst R, Frei U, Kuhn K, Stolte H. Single nephron hyperfiltration and proteinuria in a newly selected rat strain with superficial glomeruli 68. *Ren Physiol* 1986; **9**(6):317-325.
106. Ryan G, Steele-Perkins V, Morris JF, Rauscher FJ, III, Dressler GR. Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development* 1995; **121**(3):867-875.
107. Sealey JE, Blumenfeld JD, Bell GM, Pecker MS, Sommers SC, Laragh JH. 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; **6**(10):763-777.
108. Shimasaki S, Shimonaka M, Zhang HP, Ling N. Identification of five different insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) from adult rat serum and molecular cloning of a novel IGFBP-5 in rat and human. *J Biol Chem* 1991; **266**(16):10646-10653.
109. Skov K, Nyengaard JR, Korsgaard N, Mulvany MJ. Number and size of renal glomeruli in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1994; **12**(12):1373-1376.
110. Stanton BR, Perkins AS, Tessarollo L, Sassoon DA, Parada LF. Loss of N-myc function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop. *Genes Dev* 1992; **6**(12A):2235-2247.
111. Sterzel RB, Luft FC, Gao Y, Schnermann J, Briggs JP, Ganten D, et al. Renal disease and the development of hypertension in salt-sensitive Dahl rats 195. *Kidney Int* 1988; **33**(6):1119-1129.
112. Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 1996; **76**(4):1005-1026.
113. Torres VE, Offord KP, Anderson CF, Velosa JA, Frohnert PP, Donadio JV, Jr., et al. Blood pressure determinants in living-related renal allograft donors and their recipients. *Kidney Int* 1987; **31**(6):1383-1390.
114. Vaessen N, Janssen JA, Heutink P, Hofman A, Lamberts SW, Oostra BA, et al. Association between genetic variation in the gene for insulin-like growth factor-I and low birthweight. *Lancet* 2002; **359**(9311):1036-1037.
115. Veersema D, de Jong PA, van Wijck JA. Indomethacin and the fetal renal nonfunction syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1983; **16**(2):113-121.
116. Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat 133. *Kidney Int* 2001; **59**(1):238-245.
117. Verhulst A, Asselman M, Persy VP, Schepers MS, Helbert MF, Verkoelen CF, et al. Crystal retention capacity of cells in the human nephron: involvement of CD44 and its ligands hyaluronic acid and osteopontin in the transition of a crystal binding- into a nonadherent epithelium146. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**(1):107-115.

118. Vilar J, Gilbert T, Moreau E, Merlet-Benichou C. Metanephros organogenesis is highly stimulated by vitamin A derivatives in organ culture. *Kidney Int* 1996; **49**(5):1478-1487.
119. Voyer LE, Drut R, Mendez JH. Fetal renal maldevelopment with oligohydramnios following maternal use of piroxicam. *Pediatr Nephrol* 1994; **8**(5):592-594.
120. 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; **100**(5):472-475.
121. Wang ZY, Madden SL, Deuel TF, Rauscher FJ, III. The Wilms' tumor gene product, WT1, represses transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene. *J Biol Chem* 1992; **267**(31):21999-22002.
122. Watnick TJ, Jenkins RR, Rackoff P, Baumgarten A, Bia MJ. Microalbuminuria and hypertension in long-term renal donors. *Transplantation* 1988; **45**(1):59-65.
123. 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 factor144. *Dev Biol* 1991; **144**(2):248-261.
124. Wintour EM, Johnson K, Koukoulas I, Moritz K, Tersteeg M, Dodic M. Programming the cardiovascular system, kidney and the brain--a review. *Placenta* 2003; **24 Suppl A**:S65-S71.
125. Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 1996; **335**(18):1363-1367.
126. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* 2001; **49**(4):460-467.
127. Xie Z, Singh M, Singh K. ERK1/2 and JNKs, but not p38 kinase, are involved in reactive oxygen species-mediated induction of osteopontin gene expression by angiotensin II and interleukin-1beta in adult rat cardiac fibroblasts 145. *J Cell Physiol* 2004; **198**(3):399-407.
128. Young RJ, Hoy WE, Kincaid-Smith P, Seymour AE, Bertram JF. Glomerular size and glomerulosclerosis in Australian aborigines. *Am J Kidney Dis* 2000; **36**(3):481-489.
129. Zent R, Bush KT, Pohl ML, Quaranta V, Koshikawa N, Wang Z, et al. Involvement of laminin binding integrins and laminin-5 in branching morphogenesis of the ureteric bud during kidney development 321. *Dev Biol* 2001; **238**(2):289-302.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
AngII	Angiotensin II
Agt	Angiotensinogen
AT1	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
Bcl-2	Bcl-2 Protoonkogen
CAM	<i>Cell adhesion molecule</i>
CD44	CD44-Rezeptor
Ct-Wert	<i>Cycle threshold</i> , Zyklusschwellenwert
D(x)	Postnataler Tag x
E(x)	Embryonaltag x
ECM	Extrazelluläre Matrix
FAM	<i>Reporter-Farbstoff</i> (Fluoreszein-Derivat)
FGF	<i>Basic fibro-blast growth factor</i>
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GF	<i>Growth factor</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HT	Hypertonus
IGF-I, -II	<i>Insulin-like growth factor-I, -II</i>
IGF-I-R, -II-R	<i>Insulin-like growth factor receptor -I, -II</i>
IGFBP-1, -3	<i>Insulin-like growth factor binding protein -1, -3</i>
IGF-System	<i>Insulin-like growth factor-System</i>
Kf	Ultrafiltrationskoeffizient
MET	Mesenchymal-epithelialer Übergang
MM	Metanephrogenes mesenchymales Blastem/ Metanephritisches Mesenchym/ Blastem
OPN	Osteopontin
PCR	Polymerasekettenreaktion
P <sub>GC</sub>	Intraglomerulärer Druck
RGD Sequenz	Peptidsequenz (Arginin-Glycin-Aspartate)
RAS	Renin-Angiotensin-System

RAT PCR	Quantitative <i>real-time</i> Polymeraseketten- reaktion
RPF	Renaler Plasmafluß
SN GFR	Einzelnephron-GFR
SSW	Schwangerschaftswoche
TAMRA	<i>Quencher</i> -Farbstoff (Rhodamin-Derivat)
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor</i> - $\beta$
UB	Ureterknospe (UB)

## **8 Eidstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Auch in Teilen stellt sie keine Kopie anderer Arbeiten dar und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, 30.09.2010

---

Florian Freese

## **9 Danksagung**

Für die Überlassung dieses Themas, für die hervorragende und langjährige Betreuung und Unterstützung, für den immer vorhandenen Optimismus möchte ich meinem Doktorvater Lars Rothermund an dieser Stelle ganz herzlich danken. In allen Phasen dieser Arbeit stand er mir mit gutem Rat zur Seite und auch nach geographischer Trennung hat er seinen Doktoranden nicht aus dem Auge verloren. Danke.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Reinhold Kreutz und den Mitarbeitern der Abteilung für klinische Pharmakologie für die Unterstützung bei der Lösung wissenschaftlicher Fragen und Probleme und die Überlassung von Geräten und Räumlichkeiten.

Olaf Fialkowski und Dr. Markus Wehland – von Tebra möchte ich für die geduldige und exzellente Betreuung im Erlernen diverser Methoden und bei der Beantwortung molekularbiologischer Fragen herzlichst danken.

Den Doktoranden in meiner Arbeitsgruppe und mittlerweile Kollegen Susanne Mieschel, Ricarda Ibscher, Anne Schnieber und Jan Ebersohn möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Meinen Eltern und meiner Schwester schulde ich den größten Dank. Sie standen mir überall und zu jeder Zeit zur Seite.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank Friederike und Ihren Eltern, die mir in der letzten Phase dieser Arbeit zur Seite gestanden haben.

## **10 Curriculum Vitae**

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

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

## 11 Liste der Publikationen

### JOURNAL

Genetic low nephron number hypertension is associated with dysregulation of the hepatic and renal insulin-like growth factor system during nephrogenesis

Lars Rothermund<sub>a,b</sub>, Marc Nierhaus<sub>a,b</sub>, Olaf Fialkowski<sub>b</sub>, Florian Freese<sub>b</sub>, Ricarda Ibscher<sub>b</sub>, Susanne Mieschel<sub>b</sub>, Peter Kossmehl<sub>b</sub>, Daniela Grimm<sub>b</sub>, Markus Wehland<sub>b</sub> and Reinhold Kreutz<sub>b</sub>

Journal of Hypertension 2006, 24:1857–1864

<sub>a</sub>Medizinische Klinik IV, Endokrinologie und Nephrologie and <sub>b</sub>Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Campus Benjamin Franklin, Charité

Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Sponsorship: Supported by the DFG (RO 2124/2-1 and RO 2124/2-2) and by a grant from the Bundesministerium für Bildung und Forschung (Nationales Genomforschungsnetz: KGCV1, 01GS0416). Received 17 January 2006 Revised 1 April 2006 Accepted 3 April 2006

### ABSTRACTS

**Rothermund L**, Fialkowski O, Freese F, Ibscher R, Wehland M, Paul M, Zidek W, Kreutz R. Genetic nephron number deficit is associated with reduced renal IGF2/IGF2 receptor ratio during fetal development. Hypertension 2003;42 (4): 644

**Rothermund L**, Fialkowski O, Freese F, Ibscher R, Janitz K, Wehland M, Kreutz R. Low Nephron Number Hypertension is Associated with Reduced Hepatic Insulin-like Growth Factor-I Expression in the Fetus. Kidney Blood Press Res 2004;27:353

### VORTRÄGE

**Rothermund L**, Fialkowski O, Freese F, Ibscher R, Wehland M, Paul M, Zidek W, Kreutz R. Genetic nephron number deficit is associated with hepatic dysregulation of the insulin like growth factor system. Deutsche Hochdruckliga Jahreskongress 2003 in Bonn.

**Rothermund L**, Fialkowski O, Freese F, Ibscher R, Wehland M, Paul M, Zidek W, Kreutz R. Experimental Models for Renal Organ Damage. 8th Annual Meeting of the European Council for Blood Pressure and Cardiovascular Research (ECCR) 10.-12.10.2003 in Seeheim