

**Multiphotonenmikroskopische Untersuchung des
proliferativen Potentials renaler Zellpopulationen
anhand der Cyclin-B1-Reportermaus**

von Maj-Kristina Hellmuth

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

**Multiphotonenmikroskopische Untersuchung des
proliferativen Potentials renaler Zellpopulationen anhand der
Cyclin-B1-Reportermaus**

vorgelegt von

Maj-Kristina Hellmuth

aus Berlin

München 2019

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Institut für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. R. Wanke

Angefertigt am Institut für Physiologie der Universität Regensburg

Mentor: Univ.-Prof. Dr. H. Castrop

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Elisabeth G. Kemter

Tag der Promotion: 27. Juli 2019

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau und Funktion der Niere	1
1.2	Entwicklung der Niere	2
1.3	Regenerationspotential der Niere	3
1.3.1	Nierenpapille als Stammzellnische.....	3
1.3.2	Extrarenale Zellen als Ursprung für Regeneration.....	4
1.3.3	Regenerationspotential der Tubulusepithelzellen.....	5
1.4	Zellzyklus.....	6
1.4.1	Cyclin B1	7
1.4.2	Untersuchung des Zellzyklus.....	8
1.5	Zellteilungsaktivität in der Niere.....	8
1.5.1	Zellteilungsaktivität in unterschiedlichen Altersstufen	8
1.5.2	Pharmakologische Beeinflussung der Zellteilung	9
1.5.2.1	Angiotensin Converting Enzyme	9
1.5.2.1.1	ACE-Hemmer	10
1.6	Unilaterale Nephrektomie.....	10
1.6.1	Kompensatorische Hypertrophie	11
1.6.2	Hyperplasie der Zellen in der kontralateralen Niere.....	11
1.7	Glomeruläre Filtrationsrate	12
1.8	Multiphotonenmikroskopie.....	13
2	Fragestellung	15
3	Material und Methoden	17
3.1	Material	17
3.1.1	Geräte.....	17

3.1.2	Verbrauchsmaterialien	18
3.1.3	Chemikalien und Pharmazeutika	19
3.2	Methoden	20
3.2.1	Versuchstiere	20
3.2.1.1	Genotypisierung der Versuchstiere	20
3.2.1.2	Haltung der Versuchstiere	20
3.2.2	Bestimmung der Zellteilungsrate	20
3.2.2.1	Vorbereitung der Versuchstiere auf die Perfusion	20
3.2.2.2	Perfusion der Nieren	20
3.2.2.3	Schneiden und Einbetten der Nieren	21
3.2.2.4	Untersuchung der Nieren am Mikroskop	21
3.2.2.4.1	Einstellungen am 2-Photonenmikroskop	22
3.2.2.4.2	Auswertung der aufgenommenen Bilder	22
3.2.3	Behandlung mit ACE-Hemmer und Low Salt-Diät	23
3.2.3.1	Dosierung und Darreichungsform von Enalapril	23
3.2.4	Unilaterale Nephrektomie	24
3.2.4.1	Operation der Versuchstiere	24
3.2.4.1.1	Narkose	24
3.2.4.1.2	Durchführung der OP	24
3.2.4.2	Kontrolle des Körpergewichts nach der Operation	25
3.2.4.3	Erfassung des Nierengewichtes post OP	25
3.2.5	Identifikation der teilungsaktiven Zellen	25
3.2.5.1	Vorbereitung der Nierenschnitte	26
3.2.5.2	Immunhistochemie	26
3.2.5.3	Einstellungen am Mikroskop	29
3.2.6	Statistik	29
4	Ergebnisse	31
4.1	Zellteilung in Abhängigkeit vom Lebensalter	31

4.1.1	Veränderungen der Zellteilungsaktivität.....	32
4.1.2	Lokalisation der teilungsaktiven Zellen	33
4.2	Zellteilungsrate unter Behandlung mit ACE-Hemmer und salzarmer Diät.....	34
4.2.1	Veränderungen der Zellteilungsaktivität.....	35
4.2.2	Lokalisation der teilungsaktiven Zellen	35
4.3	Unilaterale Nephrektomie.....	37
4.3.1	Veränderungen der Zellteilungsaktivität bei verschiedenen Altersgruppen.....	37
4.3.2	Untersuchungszeitpunkte post OP	47
4.3.3	Gewichtsentwicklung der kontralateralen Niere.....	48
4.4	Unilaterale Nephrektomie in Kombination mit ACE-Hemmer und salzarmer Diät	49
4.4.1	Zellteilungsaktivität nach unilateraler Nephrektomie in Kombination mit ACE-Hemmer und salzarmer Diät.....	50
4.4.2	Zellteilungsaktivität nach unilateraler Nephrektomie in Kombination mit ACE-Hemmer ohne Fütterung einer salzarmen Diät.....	52
4.5	Identifizierung der teilungsaktiven Zellen	53
4.5.1	Rinde.....	54
4.5.1.1	Tubulusepithelzellen	54
4.5.1.2	Corticale Fibroblasten	56
4.5.1.3	Dendritische Zellen.....	56
4.5.2	Mark	57
4.5.2.1	Sammelrohr	58
4.5.2.2	Henle-Schleife	60
4.5.3	Zellteilung nach unilateraler Nephrektomie.....	62
5	Diskussion.....	65
5.1	Altersabhängigkeit der Zellteilungsrate	65
5.2	Pharmakologische Beeinflussung der Proliferationsrate renaler Zellen	68
5.3	Entwicklung der Proliferationsrate nach unilateraler Nephrektomie.....	70
5.4	Identifizierung der proliferierenden Zellen	74
5.4.1	Zelltypen mit Fähigkeit zur Teilung	74

5.4.2	Veränderungen der Proliferationsrate verschiedener renaler Zelltypen nach unilateraler Nephrektomie	75
6	Zusammenfassung.....	77
7	Summary	79
8	Literaturverzeichnis.....	81
9	Anhang	93
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	93
9.2	Abkürzungsverzeichnis	96
10	Danksagung.....	99

1 Einleitung

1.1 **Aufbau und Funktion der Niere**

Die Nieren sind paarig angelegte Organe mit vielfältigen Funktionen. So dienen sie nicht nur als Ausscheidungsorgane und erfüllen somit eine wichtige Entgiftungsfunktion, sie sind zudem auch maßgeblich an der Regulation des Volumenhaushalts beteiligt. Nicht zu vernachlässigen ist auch ihre Funktion als Bildungsort unterschiedlicher endokrin wirksamer Substanzen wie Renin, Erythropoetin und Calcitriol, wodurch die Nieren Blutdruck, Blutbildung und Calciumstoffwechsel beeinflussen (Deetjen und Alzheimer 2005).

Jede Niere ist von einer dünnen, bindegewebigen Kapsel umgeben und unterteilt in Nierenrinde (Cortex renalis) und Nierenmark (Medulla renalis). Eine grobe Differenzierung beider Gewebeanteile ist bereits makroskopisch möglich (Kahle et al. 2009).

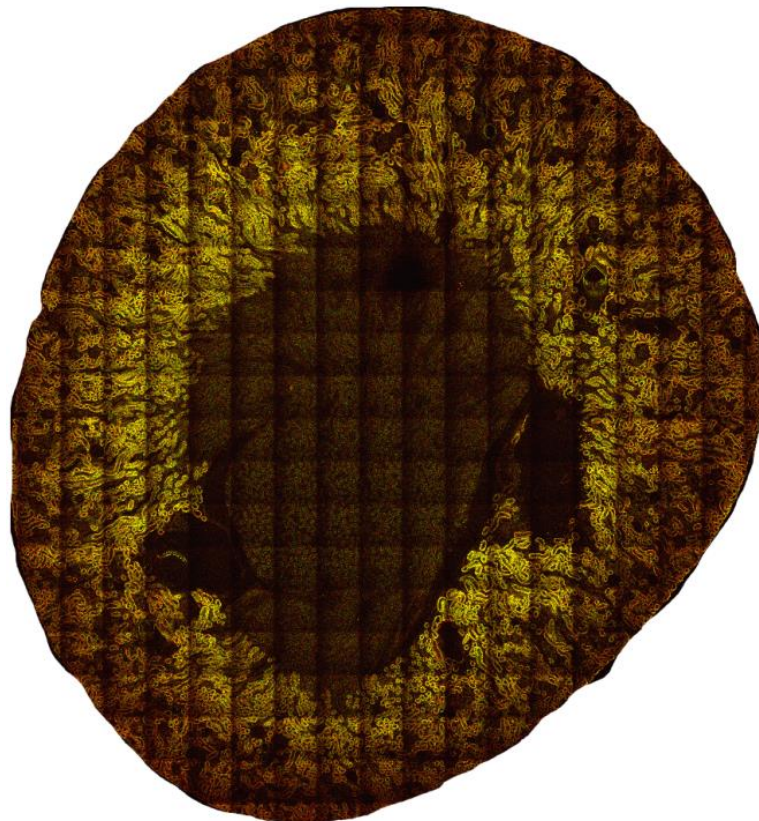


Abbildung 1: Mit dem 2-Photonenmikroskop aufgenommener Kachelscan eines Nierenschnittes Die Abbildung zeigt einen Transversalschnitt durch die Niere einer Pgl1-Cyclin B1-GFP transgenen Maus.

Die genaue Abgrenzung von Cortex und Medulla ist makroskopisch nicht möglich. Definiert wird diese Grenze üblicherweise durch den Verlauf der renalen Bogenarterien (Carretero et al. 2017). Über 20 hochspezialisierte Zelltypen ermöglichen es der Niere, ihre vielfältigen Aufgaben zu erfüllen (Siegenthaler und Amann-Vesti 2006). Die funktionelle Untereinheit bildet dabei das Nephron. Die dazu gehörigen Glomeruli sind im Cortex lokalisiert, genau wie die S1- und S2-Segmente der proximalen Tubuli. Die S3-Segmente dagegen befinden sich in der äußeren Medulla, die Henle-Schleife zieht bis in die innere Medulla, um von dort wieder in Richtung des Cortex zu verlaufen, wo sie in den distalen Tubulus übergeht. Dieser führt wiederum ins Innere der Niere, um schließlich ins Sammelrohr zu münden, das in der Nierenpapille endet (McMahon 2016).

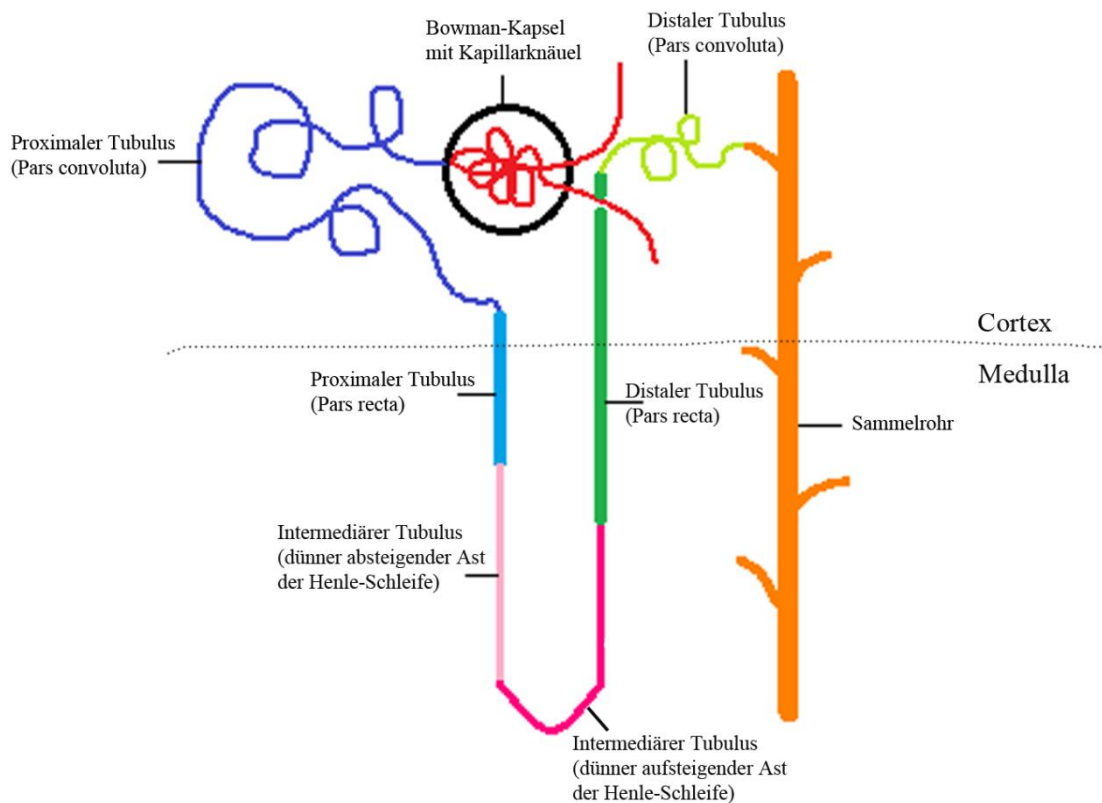


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Nephrons

1.2 Entwicklung der Niere

Die Entwicklung der Niere ist nicht bei allen Säugetieren zum gleichen Zeitpunkt abgeschlossen. So kommt der Mensch mit bereits vollständig entwickelten Nieren auf die Welt, während das Organ bei anderen Arten erst post partum ausreift. Die Angaben in der Literatur bezüglich der Vollendung der Entwicklung bei Mäusen und Ratten gehen leicht

auseinander. Sie schwanken zwischen 3-7 Tagen post partum (Sequeira Lopez und Gomez 2011) und einigen Wochen nach der Geburt (McMahon 2016).

1.3 Regenerationspotential der Niere

Die Zellteilungsrate in der gesunden adulten Niere ist grundsätzlich sehr niedrig. Dennoch scheint ein großes Regenerationspotential als Reaktion auf akute Schädigung zu bestehen. Die höchste Zellteilungsrate scheinen Zellen der S3-Segmente der proximalen Tubuli aufzuweisen, weshalb viele Studien sich auf diesen Teil der Niere konzentrieren, um die Grundlagen ihres regenerativen Potentials zu klären (Anglani et al. 2010). Der Ursprung der Zellen, die zu Grunde gegangene Tubulusepithelzellen ersetzen, ist nach wie vor unklar. So gibt es drei verschiedene denkbare Möglichkeiten. Zum einen ist es vorstellbar, dass die Tubulusepithelzellen selber über Teilungspotential verfügen und bei Verlust von Epithelzellen diese ersetzen können (Voetseder et al. 2005). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass mesenchymale Zellen bei Bedarf aus dem Interstitium einwandern, sich in den Zellverband im Tubulus integrieren und dort zu Tubulusepithelzellen ausdifferenzieren (Oliver et al. 2004). Außerdem ist es denkbar, dass extrarenale Zellen an der Regeneration beteiligt sind (Kale et al. 2003; Poulsom et al. 2001).

1.3.1 Nierenpapille als Stammzellnische

Letztlich sind alle Zellen in der Niere abgeleitet von zwei verschiedenen Progenitorzellen. So stellt die Ureterknospe den Ursprung aller Epithelzellen des Sammelrohres dar, während die Gesamtheit der Epithelzellen der Nephrone und das renale Endothel von mesenchymalen Zellen des Metanephrons abstammen. Die Tatsache, dass diese mesenchymalen Zellen sich in die verschiedenen Epithelzelltypen ausdifferenzieren, lässt die Vermutung zu, dass auch in der adulten Niere eine Stammzellpopulation existiert (Al-Awqati und Oliver 2002). Einige Daten legen nahe, dass in der Nierenpapille eine Population von Zellen existiert, die als Stammzellen dienen und bei Schädigung der Niere in den Verband der Tubulusepithelzellen einwandern und seine Funktion wieder herstellen. Stammzellen sind unter anderem dadurch charakterisiert, dass sie langsam proliferieren und häufig in spezifischen Bereichen der Organe lokalisiert sind, wo sie vor schädigenden Einflüssen geschützt sind (Cotsarelis et al. 1989). So wurde in einer Studie

aus dem Jahr 2004 nachgewiesen, dass es in der Niere, wie in anderen Organen auch, langsam proliferierende Zellen gibt, die sich vor allem in der Papille befinden. Dies wurde an jungen Ratten und Mäusen getestet, denen Bromdesoxyuridin (BrdU) injiziert wurde. BrdU wird in die Zelle aufgenommen und während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Die so markierten Zellen können mittels immunhistochemischer Untersuchung identifiziert werden und wurden nach einer Wartezeit von mehreren Monaten fast ausschließlich noch in der Nierenpapille gefunden, was darauf schließen lässt, dass in diesem Abschnitt der Niere eine Zellpopulation existiert, die den oben genannten Charakteristika von Stammzellen entspricht. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass diese langsam proliferierenden Zellen als Reaktion auf eine Ischämie in der Niere zu proliferieren beginnen und die Papille verlassen. Eine Isolation der Zellen mit anschließender Injektion in den Cortex führt dazu, dass sich die Zellen dort in das Nierenparenchym einfügen (Oliver et al. 2004). Diese Zellen sind in der Lage, in epitheliale, neuronale sowie weitere Zelltypen zu differenzieren (Al-Awqati und Oliver 2006).

1.3.2 Extrarenale Zellen als Ursprung für Regeneration

Auch für die mögliche Beteiligung extrarenaler Zellen an Regenerationsprozessen in der Niere sprechen einige Daten in der Literatur. Nach einer Knochenmarksspende von männlichen an weibliche Mäuse konnten in Tubulusepithelzellen der weiblichen Empfängertiere neben spezifischen Epithelzellmarkern auch Y-Chromosomen nachgewiesen werden (Poulsom et al. 2001). Diese Erkenntnis stützt die Hypothese, dass aus dem Knochenmark stammende Stammzellen einen Beitrag zum Turnover der Zellen in der Niere leisten können. Die Schädigung des Nierenparenchyms scheint ein Signal für Zellen aus dem Knochenmark zu sein, zum Ort der Schädigung zu migrieren und sich dort in den Zellverband zu integrieren. So konnte 2003 in einer Studie eine Migration von Zellen aus dem Knochenmark in die Niere als Folge einer transienten Ischämie gezeigt werden (Kale et al. 2003). In einer weiteren Studie wurde beta-Galactosidase genutzt, um Nieren auf das Vorhandensein von hämatopoetischen Stammzellen zu untersuchen. Beta-Galactosidase ist eines von mehreren Enzymen, die der Verwertung von Lactose dienen. Seine Anwesenheit kann gut detektiert werden, da das Enzym in der Lage ist, das Glykosid X-Gal zu hydrolysieren, was mit einer Blaufärbung einhergeht (Juers et al. 2012). Hämatopoetische Stammzellen wurden von Rosa26-Mäusen isoliert, die beta-

Galactosidase exprimieren und Tieren eines genetisch nicht veränderten Stammes transplantiert, nachdem diese einer renalen Ischämie mit anschließender Reperfusion unterzogen wurden. Vier Wochen später konnten mit Hilfe einer X-Gal-Färbung beta-Galactosidase-positive Zellen in den Tubuli der Empfängertiere nachgewiesen werden (Lin 2003).

1.3.3 Regenerationspotential der Tubulusepithelzellen

Auch die Hypothese, dass Tubulusepithelzellen selbst in der Lage sind, zu proliferieren und somit auch zu Grunde gegangene Epithelzellen ersetzen können, wird durch die Ergebnisse verschiedener Experimente gestützt. Uneinigkeit zeigt sich in der Literatur jedoch hinsichtlich der Frage, ob grundsätzlich alle Tubulusepithelzellen in der Lage sind, sich zu teilen, oder ob lediglich ein Teil der Zellen eine Art Stammzellpopulation mit der Fähigkeit zur Zellteilung darstellt (Kramann et al. 2015; Berger et al. 2014). Für das Vorhandensein einer Stammzellpopulation innerhalb der Tubulusepithelzellen spricht beispielsweise eine Studie aus dem Jahr 2003 (Maeshima 2003). Wie oben bereits beschrieben, wurden sogenannte label-retaining cells, also langsam proliferierende Zellen, mittels BrdU-Injektion identifiziert. Während der Regenerationsphase nach experimentell hervorgerufener Ischämie und Reperfusion begannen diese Zellen zu proliferieren, was dadurch gekennzeichnet war, dass die betroffenen Zellen Proliferative Cell Nuclear Antigen (PCNA) exprimierten. Da dieses Protein in erster Linie in den Zellen gefunden wurde, die mit Hilfe von BrdU als langsam proliferierende Zellen eingestuft worden waren, wies man diesem Zelltyp ein größeres Potential zur Proliferation zu (Maeshima 2003). Allerdings wird auch die Vermutung, dass alle Tubulusepithelzellen bei Bedarf proliferieren können, durch die Ergebnisse verschiedener Studien erhärtet. In einer Studie aus dem Jahr 2005 wurde der Differenzierungsgrad der Zellen als Kriterium herangezogen, um Stammzellen von anderen Zellen im Tubulusepithelzellverband zu unterscheiden. Stammzellen zeigen im Vergleich einen geringeren Differenzierungsgrad. Hier wurde wiederum jungen Versuchstieren BrdU injiziert, um einige Wochen später langsam proliferierende Zellen identifizieren zu können. Zudem wurde in den Nieren nach proliferierenden Zellen gesucht und das Vorhandensein von Differenzierungsmarkern überprüft. Es stellte sich heraus, dass mitotisch aktive Zellen den gleichen Differenzierungsgrad aufwiesen wie nicht proliferierende Zellen und dass auch die durch mittels BrdU identifizierten langsam

proliferierenden Zellen ausdifferenziert waren. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch die ausdifferenzierten Tubulusepithelzellen über die Fähigkeit zur Teilung verfügen (Vogetseder et al. 2005).

Dieser Überblick zeigt, dass die Frage, auf welche Weise die Niere ihr hohes regeneratives Potential, insbesondere im Bereich des Tubulusepithels, umsetzt, noch längst nicht vollständig geklärt ist.

1.4 Zellzyklus

Um sich mit der Zellteilungsaktivität und dem Regenerationspotential von Organen zu beschäftigen, muss man sich zunächst die Grundlagen des Zellzyklus ins Gedächtnis rufen. Der Zellzyklus umfasst vier verschiedene Phasen. Der Mitose (M-Phase), in der die neu gebildeten Chromosomen auf die entstehenden Tochterzellen verteilt werden, folgt die G1-Phase, wobei das G für „Lücke“ (englisch Gap) steht. In dieser Phase findet Zellwachstum statt, die Zelle synthetisiert Membranbestandteile und Proteine. Danach tritt die Zelle in die Synthesephase ein (S-Phase), während der die DNA repliziert wird. Auf die S-Phase folgt die G2-Phase, in der die Zelle weiter wächst und die nächste Mitose vorbereitet wird. Im Anschluss an die G1-Phase kann eine Zelle auch in die sogenannte G0-Phase eintreten, die eine Ruhephase darstellt, aus der die Zelle bei Bedarf wieder in den Zellzyklus eintreten kann (Engelhardt et al. 2010; Canaud und Bonventre 2014).

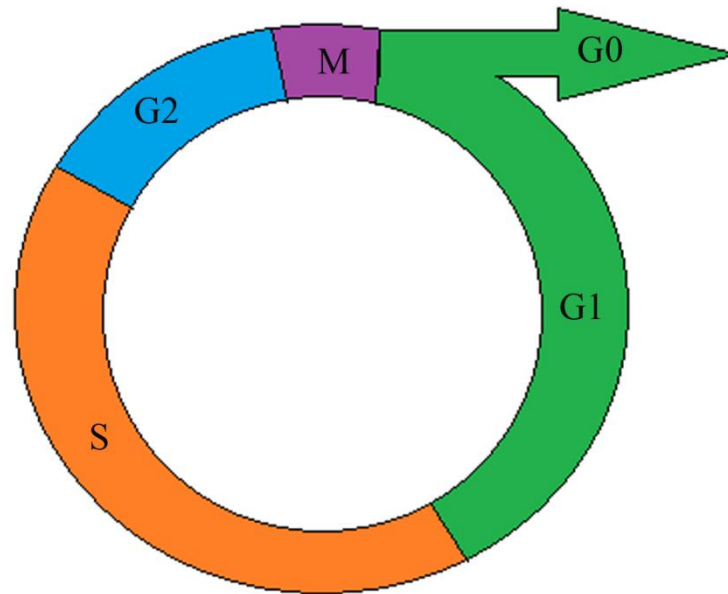


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zellzyklus Auf die Mitosephase (M) folgt die G1-Phase, in der Membranbestandteile synthetisiert werden. Danach wird die DNA repliziert (S-Phase), in der G2-Phase findet Zellwachstum statt. Alternativ kann die Zelle in die G0-Phase eintreten, die eine Ruhephase darstellt, aus der die Zelle wieder in den Zellzyklus eintreten kann.

Der Ablauf des Zellzyklus wird durch eine Vielzahl von Faktoren gesteuert. Eine fehlerhafte Regulation kann zur Entwicklung eines chronischen Nierenversagens beitragen. Unter anderem sind drei verschiedene Gruppen von Proteinen daran beteiligt, dass die Phasen des Zellzyklus nacheinander ablaufen können. Es handelt sich um Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen und Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (Moonen et al. 2018).

1.4.1 Cyclin B1

Die bereits erwähnten Cyclin-abhängigen Kinasen können nur in die Steuerung des Zellzyklus eingreifen, wenn sie als Komplex mit dem zugehörigen Cyclin vorliegen. Bei Zellen von Säugetieren spielen vor allem Cyclin A und Cyclin B eine Rolle (Gavet und Pines 2010). Bei Mäusen ist jedoch lediglich Cyclin B1 für die Zellteilung essentiell (Brandeis et al. 1998). Cyclin B1 ist notwendig für den Übertritt der Zelle von der G2- in die M-Phase (Ye et al. 2016; Innocente et al. 1999).

1.4.2 Untersuchung des Zellzyklus

Die Proliferation von Zellen ist ein komplizierter und streng regulierter Vorgang, für dessen reibungslosen Ablauf zum einen viele Signalwege innerhalb der Zelle, aber auch das Milieu außerhalb der Zelle eine wichtige Rolle spielen (Conlon und Raff 1999; Elledge 1996). Proliferierende Zellen können in situ mit Hilfe von Markern wie BrdU identifiziert werden, die während des Zellzyklus in die DNA der Zelle aufgenommen werden und nachträglich mittels einer entsprechenden immunhistochemischen Färbung detektiert werden (Salic und Mitchison 2008). Um nun die Teilung von Zellen unabhängig von der Nutzung solcher Marker untersuchen zu können, wurde ein spezielles Mausmodell entwickelt, die Pgl1-Cyclin B1-GFP transgene Maus. Tiere dieses Stammes exprimieren in allen Zellen GFP (green fluorescent protein), die sich in der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus befinden. Das GFP ist gekoppelt an das Protein Cyclin B1 (Klochender et al. 2012). Die Konzentration von Cyclin B1 in der Zelle ist nicht konstant, sondern schwankt im Verlauf des Zellzyklus. Das Protein ist stabil von der S- bis zur M-Phase (Brandeis und Hunt 1996). Danach wird durch eine Ubiquitin-Ligase katalysierte Ubiquitinierung des Cyclins sein Abbau initiiert, sodass in den anderen Phasen des Zellzyklus kein Cyclin B1 und somit auch kein GFP vorliegt (Sudakin et al. 1995). Bei den für die vorliegende Arbeit genutzten Tieren handelt es sich um eben diese Pgl1-Cyclin B1-GFP transgenen Mäuse.

1.5 Zellteilungsaktivität in der Niere

Die Niere hat im Vergleich zu anderen Organen einen geringen Regenerationsbedarf, die Proliferationsrate ist wesentlich niedriger als in anderen Organen (Strehl et al. 2002). Über den Urin werden beim erwachsenen Menschen pro Tag etwa 70000 Zellen des tubulären Systems ausgeschieden, was in etwa einer Zelle pro Nephron pro Tag entspricht (Prescott 1966). In der gesunden Niere proliferieren weniger als 1% der Tubulusepithelzellen (Moonen et al. 2018), andere Studien deuten sogar auf einen noch niedrigeren Proliferationsindex hin (Nadasdy et al. 1994).

1.5.1 Zellteilungsaktivität in unterschiedlichen Altersstufen

Über die Entwicklung der Proliferationsrate im Laufe des Lebens liefert die Literatur sehr unterschiedliche Angaben. So wurde in einer Studie aus dem Jahr 2000 an F344-Ratten

gezeigt, dass die Teilungsrate der Tubulusepithelzellen im Alter von 6-10 Monaten am höchsten war und danach wieder abnahm (Cardani und Zavanella 2000). In eine andere Richtung deutet das Ergebnis einer Untersuchung aus dem Jahr 2007, das eine hohe Proliferationsrate besonders bei jüngeren Tieren (5 Wochen) nachwies, während bei älteren Tieren (15-70 Wochen) kaum noch Teilungsaktivität zu beobachten war (Enoki et al. 2007). Einige Daten legen die Vermutung nahe, dass es mit zunehmendem Alter einen Abfall der Proliferationsrate der Tubulusepithelzellen gibt, der auch mit einer Verringerung des Regenerationspotentials nach akuter Schädigung des Epithels einhergeht (Schmitt und Cantley 2008).

1.5.2 Pharmakologische Beeinflussung der Zellteilung

Neben der Entwicklung der Zellteilungsaktivität in der gesunden Niere mit fortschreitendem Lebensalter sollten in der vorliegenden Arbeit auch Möglichkeiten einer pharmakologischen Beeinflussung des proliferativen Potentials renaler Zellen untersucht werden. Einen Anhaltspunkt hierfür stellte das Angiotensin Converting Enzyme dar.

1.5.2.1 Angiotensin Converting Enzyme

Das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) ist ein wichtiger Bestandteil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, das der Regulation des Volumenhaushaltes dient und somit auch den Blutdruck beeinflusst. Ein Volumenmangel resultiert in einer vermehrten Freisetzung von Renin aus den Zellen des juxtaglomerulären Apparates. Das Renin spaltet Angiotensin I aus dem Vorläufermolekül Angiotensinogen ab und das Angiotensin I wird letztlich durch ACE in Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II bewirkt eine Vasokonstriktion und führt zur Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Aldosteron sorgt für eine vermehrte Natrium- und Wasserretention in der Niere (Klinke et al. 2005).

Neben der Funktion im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System erfüllt ACE jedoch auch weitere, weniger geläufige Funktionen. So spielt es eine Rolle für die Signaltransduktion von Endothelzellen, indem es die Aktivität einer ACE-assoziierten Casein-Kinase 2 (CK2) beeinflusst (Kohlstedt et al. 2004), nimmt Einfluss auf die Expression der Cyclooxygenase 2 in Endothelzellen (Kohlstedt et al. 2005) und ist in der Lage, Ca²⁺-Signalwege zu aktivieren, indem es als Rezeptor für AngII fungiert (Guimarães et al.

2011). Ca^{2+} -abhängige Signale, insbesondere im Nukleus, sind an der Regulation der Proliferation beteiligt (Rodrigues et al. 2007). In einer Studie aus dem Jahr 2016 konnte ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von ACE und Ca^{2+} -gesteuerter Proliferation von Zellen nachgewiesen werden (Alvarenga et al. 2016).

1.5.2.1.1 ACE-Hemmer

ACE-Hemmer kommen bei der Behandlung der arteriellen Hypertonie häufig zum Einsatz. Ihr Wirkprinzip beruht darauf, dass sie an Aminosäurereste und das Zinkion der katalytischen Einheiten des Enzyms binden und somit verhindern, dass die Substrate umgesetzt werden. So kann keine Umwandlung von AngI zu AngII mehr stattfinden (Freissmuth et al. 2016). Ein Beispiel aus der Gruppe der ACE-Hemmer ist Enalapril. Wie die meisten ACE-Hemmer wird es nach oraler Einnahme erst durch Metabolisierung in der Leber in seine wirksame Form, das Enalaprilat, umgewandelt (Gomez et al. 1985). In verschiedenen Studien wurden weitere Wirkungen von Enalapril, abgesehen vom blutdrucksenkenden Effekt, untersucht. Unter anderem scheint der ACE-Hemmer auch Einfluss auf die Proliferation von Zellen zu haben. So führt eine Behandlung mit ACE-Hemmern dazu, dass das nach partieller Nephrektomie erfolgende und durch Proliferation und Akkumulation von Kollagen bedingte Wachstum des Nierenrestes vermindert wird, bzw. ganz ausbleibt (Krivosíková et al. 1999; Kakinuma et al. 1992). Auch die Entwicklung der Niere wird durch die Hemmung des Enzyms beeinflusst. Eine zweiwöchige Behandlung neugeborener Ratten mit Enalapril bewirkt eine verminderte Expression von Transforming Growth Factor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) und Epidermal Growth Factor (EGF) und resultiert in einem reduzierten Körper- und Nierengewicht verglichen mit gleichalten Kontrolltieren (Yoo et al. 1997).

1.6 Unilaterale Nephrektomie

Da es sich bei der Niere um ein paarig angelegtes Organ handelt, ist der teilweise oder vollständige Verlust einer Niere, sei es beispielsweise durch eine Nierenspende oder eine operative Entfernung aufgrund eines Tumors oder einer sonstigen Erkrankung, weiterhin mit dem Leben vereinbar. Um in der Lage zu sein, den Verlust zu kompensieren, unterliegt die verbleibende kontralaterale Niere gewissen Veränderungen. Als Modell zur Untersuchung dieser Vorgänge dient die Durchführung einer einseitigen Entfernung einer Niere, die unilaterale Nephrektomie.

1.6.1 Kompensatorische Hypertrophie

Länge, Durchmesser und Masse der kontralateralen Niere nehmen nach unilateraler Nephrektomie zu (Bohlouli et al. 2010; Chen et al. 2016). Nicht ganz eindeutig dagegen sind die Daten in der Literatur hinsichtlich der Frage, ob dieses Wachstum durch eine Hypertrophie oder durch eine Hyperplasie der Zellen der verbleibenden Niere zu erklären ist (Johnson und Vera Roman 1966). Bei der Hypertrophie handelt es sich um eine Volumenzunahme in Folge einer Erhöhung der Zellgröße durch Synthese von zellulären Strukturen ohne dass es zur Mitose kommt, während der Volumenzunahme durch Hyperplasie eine Erhöhung der Zellzahl zugrunde liegt (Siegenthaler und Amann-Vesti 2006). Viele Studien deuten in die Richtung, dass eher eine Größenzunahme als eine Erhöhung der Zellzahl (Hyperplasie) stattfindet. So werden 75-80% der Volumenzunahme hypertrophischen Veränderungen zugeschrieben (Bridges et al. 2016). Diese Annahme wird vor allem dadurch gestützt, dass es nach unilateraler Nephrektomie zwar zu einer Zunahme der Masse der verbleibenden Niere kommt, nicht aber zur Bildung neuer, funktionsfähiger Nephrone. Die Nephronanzahl bleibt nach Entfernung einer Niere im verbleibenden Organ unverändert (Larsson et al. 1980).

1.6.2 Hyperplasie der Zellen in der kontralateralen Niere

Allerdings wird auch die Annahme, dass beim kompensatorischen Wachstum der kontralateralen Niere nach unilateraler Nephrektomie die Hyperplasie eine größere Rolle spielt, durch Daten in der Literatur gestützt. 1967 wurde der Mitoseindex von Nierenzellen mit Hilfe einer Thymidin-Markierung gemessen und die Daten von nicht operierten Ratten mit denen von Tieren verglichen, die einer unilateralen Nephrektomie unterzogen wurden. Zudem wurden juvenile adulten Tieren gegenüber gestellt. Die Nephrektomie hatte bei beiden Altersgruppen eine erhöhte Mitoserate zur Folge (Phillips, Leong 1967).

In einer weiteren Studie wurde das RNA/DNA-Verhältnis herangezogen, um die Wachstumsrate der Niere zu beurteilen. Sowohl bei wachsenden als auch bei adulten Tieren zeigte sich ein Anstieg des RNA/DNA-Verhältnisses, der jedoch in beiden Gruppen auf den Cortex beschränkt war. Da der Anstieg bei adulten Tieren deutlich größer war als bei juvenilen, bei den jüngeren Tieren aber die Zunahme der Masse

insgesamt höher war als bei den erwachsenen (Dicker und Shirley 1971), schloss man darauf, dass zumindest bei jüngeren Tieren auch eine Zellhyperplasie zum kompensatorischen Wachstum beitragen muss (Dicker und Shirley 1973).

Das kompensatorische Wachstum der kontralateralen Niere nach unilateraler Nephrektomie wurde also bisher sowohl durch Hypertrophie als auch durch Hyperplasie oder eine Kombination aus beidem beschrieben.

1.7 Glomeruläre Filtrationsrate

Mit der wichtigste Marker, den man bestimmen kann, um Rückschlüsse auf die Nierenfunktion zu ziehen, ist die glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Sie gibt die Menge an Plasma an, die pro Minute von den funktionsfähigen Glomeruli filtriert wird (Ghosh und Collier 2012). Eine verminderte Filterleistung kann Störungen der Elektrolytbalance und des Flüssigkeitshaushaltes im Körper zur Folge haben. Um die GFR zu bestimmen, wird die Clearance einer Substanz aus dem Plasma untersucht. Bei Verwendung einer Substanz, die frei filtrierbar ist und weder sezerniert noch rückresorbiert wird, entspricht die GFR der Clearance dieser Substanz (Stevens und Levey 2009; Pasala und Carmody 2017). Nachdem früher Inulin, ein frei filtrierbares pflanzliches Polysaccharid, für die Messung genutzt wurde, greift man heute wegen seiner besseren Löslichkeit eher auf Fluorescein- Isothiocyanate- Sinistrin (FITC-Sinistrin) zurück (Pill et al. 2005).

Auch nach unilateraler Nephrektomie findet die Messung der GFR Anwendung, um die Funktion der kontralateralen Niere zu überwachen. Die Funktion der verbleibenden Niere wird gesteigert, um den durch die Entfernung des Organs bedingten Verlust von Nephronen zu kompensieren (Funahashi et al. 2011). Die Daten in der Literatur hinsichtlich der Frage, ab welchem Zeitpunkt und wie ausgeprägt diese Kompensation sich auch in der GFR bemerkbar macht, variieren jedoch stark. So variieren die Angaben über die Höhe des Anstiegs zwischen 70% (Kim et al. 2010) und um die 20% im Vergleich zum Ausgangswert (Chen et al. 2012). Der Beginn der Veränderungen zeigt sich einigen Autoren zu Folge bereits nach weniger als einer Woche (Strandgaard et al. 1988), andere wiederum sehen ihn erst einige Monate nach der Operation (Kim et al. 2010). Obwohl also der Zeitpunkt post OP, ab dem eine messbare Erhöhung der GFR vorliegt, nach wie vor nicht genau bekannt ist und auch die Höhe des Anstiegs noch nicht genau definiert ist, ist die Messung der GFR unbestritten ein wichtiges Instrument, um einen Überblick über die Nierenfunktion zu erhalten.

1.8 Multiphotonenmikroskopie

Um das proliferative Potential renaler Zellpopulationen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Technik der Multiphotonenmikroskopie genutzt. Diese ermöglicht die Untersuchung funktioneller und morphologischer Gegebenheiten in den Nieren lebender Tiere und stellt somit ein wichtiges Instrument dar, um offene Fragen hinsichtlich der in der Niere ablaufenden Prozesse zu klären (Hato et al. 2017).

Die Grundlage der Fluoreszenzmikroskopie beruht darauf, dass ein Fluorophor durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge vom energiearmen Grundzustand S_0 auf ein energiereicheres Level S_2 angehoben wird. Bei der Rückkehr des Moleküls in seinen ursprünglichen Zustand wird Fluoreszenz emittiert und der Übergang zwischen den Energieniveaus somit sichtbar. Da das Elektron aber vor der Rückkehr zum Grundzustand S_0 strahlungsfrei vom Level S_2 auf ein energieärmeres Level S_1 fällt und erst dann in seinen Grundzustand zurückkehrt, ist das Emissionslicht energieärmer und somit langwelliger als das kurzwelligere und energiereichere Absorptionslicht. Die als Stokes-Verschiebung bezeichnete Differenz zwischen den Wellenlängen wird dazu genutzt, Anregungslicht und emittiertes Licht im Strahlengang zu trennen (Sanderson et al. 2014). Um die Entstehung unscharfer Bilder durch die Anregung von Fluorophoren außerhalb des Brennpunktes zu vermeiden, werden in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie Lochblenden genutzt, die das emittierte Fluoreszenzlicht bündeln und nur einen Anteil davon zum Detektor gelangen lassen. Dies macht die Entstehung kontrastreicher Bilder möglich (Oheim et al. 2006).

Die Basis für die Entwicklung der Multiphotonen-Mikroskopie legte Maria Goeppert-Mayer bereits 1931. Sie entdeckte den Übergang von einem Molekül in den angeregten Zustand durch die simultane Absorption von zwei Photonen (Göppert-Mayer 1931). Diese Entdeckung wird heute für die Fluoreszenzmikroskopie genutzt. Hier erfolgt die Anregung des Fluorophors nicht mit einem, sondern mit zwei Photonen, die gemeinsam die nötige Energie aufbringen, um das Elektron auf das höhere Energielevel anzuheben. Um dies zu gewährleisten, müssen die beiden Photonen innerhalb einer bestimmten Zeit auf das anzuregende Elektron treffen. Eine hohe Photonendichte ist nötig, um dieses Ereignis wahrscheinlich zu machen. Diese wird durch die Verwendung von gepulstem Licht erzeugt. Die Fokussierung des Laserstrahls durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur (Vermögen eines Objektes, Licht zu bündeln) trägt zusätzlich dazu

bei, das gemeinsame Auftreffen von zwei Photonen wahrscheinlicher zu machen. Da die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Photonen gleichzeitig auf das anzuregende Elektron treffen quadratisch abnimmt mit zunehmender Entfernung vom Fokuspunkt (Bianco und Diaspro 1989), ist der Bereich, in dem dies überhaupt stattfinden kann, so klein, dass bei dieser Art der Mikroskopie keine Lochblende genutzt werden muss (Diaspro et al. 2006). Die Nutzung von langwelligem Licht zur Anregung von Fluorophoren bietet einige Vorteile im Vergleich zur Einphotonenmikroskopie. Es dringt weiter ins Gewebe ein und erlaubt somit die Untersuchung von tiefer liegenden Gewebeschichten. Zudem ist es energieärmer und geht deswegen mit einer geringeren Phototoxizität einher. Die Anregung von Elektronen ist auf die Fokusebene beschränkt und erlaubt daher die Entstehung kontrastreicher Bilder ohne Nutzung einer Lochblende (Schießl et al. 2016).

2 Fragestellung

Der gesunden Niere wird im Vergleich zu anderen Organen eine geringe Proliferationsrate nachgesagt. Die Daten in der Literatur hinsichtlich der Entwicklung dieser Zellteilungsaktivität mit steigendem Lebensalter gehen weit auseinander. Genauere Kenntnis über die Proliferation von Nierenzellen zu gewinnen, ist auch im Hinblick auf mögliche Mechanismen der Regeneration im Falle einer Schädigung des Nierengewebes relevant.

Für die vorliegende Arbeit stand mit der Pgc1-Cyclin B1-GFP transgenen Maus in Kombination mit der modernen Technik der 2-Photonen-Mikroskopie ein geeignetes Modell zur Verfügung, um einen Überblick über die Entwicklung der Zellteilungsaktivität in der Niere im Laufe des Lebens zu erstellen, ohne auf die Nutzung von Proliferationsmarkern zurückgreifen zu müssen. Zunächst sollten also folgende Fragen beantwortet werden:

- Ändert sich die Proliferationsrate der Zellen in Nieren adulter Mäuse mit fortschreitendem Lebensalter?
- Wenn ja, beschränken sich diese Veränderungen auf bestimmte Kompartimente der Niere?
- Welche Zellen verfügen über proliferatives Potential?
- Lässt sich die Proliferationsrate renaler Zellen pharmakologisch beeinflussen?

Die Auswirkungen einer unilateralen Nephrektomie auf die Zellteilungsaktivität in der kontralateralen Niere werden in der Literatur ebenfalls kontrovers diskutiert. Die Ergebnisse verschiedener Studien variieren in dieser Fragestellung stark, sodass noch nicht endgültig geklärt ist, ob es überhaupt zu einer vermehrten Zellteilungsaktivität kommt. Diesbezüglich ergaben sich für die vorliegende Arbeit also folgende Fragen:

- Hat eine unilaterale Nephrektomie eine Veränderung der Proliferationsrate der Zellen in der kontralateralen Niere zur Folge?
- Wenn ja, welche Zelltypen sind von diesen Veränderungen betroffen?
- Hat das Lebensalter einen Einfluss darauf, ob und inwiefern sich die Proliferationsrate renaler Zellen in der verbleibenden Niere nach unilateraler Nephrektomie ändert?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Computer	Precision T3500, Dell, Frankfurt am Main
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Fluoreszenzlampe	LQ-HXP-120, LEj Leistungselektronik GmbH, Jena
Isofluran-Verdampfer	Groppler Medizintechnik, Deggendorf
Kühl- und Gefrierschränke	Hera freeze, Thermo electron corporation, Langenselbold Premium NoFrost, Liebherr, Biberach a.d. Riss
Laser	Chameleon UltraII-Multiphoton-Lasers, Coherent, Santa Clara
Mäuse-OP-Tisch	Elektronik- und Mechanikwerkstatt der Universität Regensburg
Mikroskop	LSM 710, Zeiss, Jena
Narkosegas-Absorber	Harvard-Apparatus GmbH, Holliston, MA
NDD-Filter	Zeiss-Reflektormodul 424931, AHF Analystechnik AG, Tübingen
OP-Besteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
OP-Tisch-Beleuchtung	KL 1500 LCD, Schott, Mainz
Perfusionspumpe	323 Watson Marlow, Falmouth, England
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
Rasierer	Aesculap, Suhl
Rotlichtlampe	Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler
Schüttler	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Vibratom	Leica VT 1200S, Leica Biosystems, Wetzlar

Waagen	Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen Küchenwaage
Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad	Lauda AQUAline AL12, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Faden	PROLENE 4-0, Ethicon Inc, Somerville, New Jersey
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Haarentfernungscreme	Reckitt Benckiser Deutschland GmbH, Heidelberg
Handschuhe	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Hautkleber	TruGlue, Trusetal Verbandstoff GmbH, Schloß Holte-Stukenbrock
Insulinspritzen	BD Micro-Fine 0,5ml, Becton Dickinson, New Jersey
Kanülen	BD Microlance, Becton Dickinson, New Jersey
Kapillaren	Hirschmann minicaps 5µl; 0,5µl; Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Kunststoff-Spacer	iSpacer, SunJin Lab. Co., Taiwan
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Präzisionsdeckgläschen	High Precision Deckgläser, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Reagiergefäße Eppendorf Cup (0,5ml, 1,5ml, 2,0ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Material und Methoden

Reagiergefäße Falcon-Tube (15ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sekundenkleber	UHU GmbH & Co. KG, Bühl
Spritzen	B. Braun, Melsungen
Wägeschälchen	Carl Roth, Karlsruhe

3.1.3 Chemikalien und Pharmazeutika

Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Buprenoret	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma Aldrich, Mannheim
Enalapril maleate salt	Sigma Aldrich, Mannheim
Heparin	B. Braun, Melsungen
Isofluran	Piramal Critical Care Deutschland GmbH, Hallbergmoos
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchstiere

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche wurden an Pgc1-Cyclin B1-GFP transgenen Mäusen (Jackson Mice, Tg[Pgc1-Ccnb1/EGFP]1Aklo/J) durchgeführt. Diese exprimieren GFP an das den Zellzyklus regulierende Protein Cyclin B1 gekoppelt, sodass alle Zellen während des Durchlaufens der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus fluoreszierend gefärbt sind. In der G0- und G1-Phase dagegen zeigen die Zellen keine Fluoreszenz. Dieser Mausstamm ermöglicht die Untersuchung der Zellteilung unabhängig von der Nutzung von Proliferationsmarkern und Zellkulturversuchen. Das Alter der im Versuch genutzten Tiere variierte zwischen 3 und 50 Wochen. Alle Mäuse wurden im Alter von 21 Tagen von den Elterntieren abgesetzt.

Die beschriebenen Versuche wurden von der Regierung in Unterfranken genehmigt (AZ 55.2.2532-2-476 (12.06.2017) und AZ 55.2DMS-2532-2-150 (14.10.2015)).

3.2.1.1 Genotypisierung der Versuchstiere

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte durch Analyse der genomischen DNA aus einer Schwanzspitzenbiopsie mittels PCR. Dazu wurde den Tieren im Alter von 21 Tagen mit einem sterilen Skalpell ein ca. 2 mm großes Stück des distalen Schwanzendes abgetrennt. Anschließend erfolgte eine Charakterisierung der DNA mittels einer Restriktionsanalyse.

3.2.1.2 Haltung der Versuchstiere

Die für die Arbeit verwendeten Mäuse wurden in einer Tierhaltung mit einem 12 h-Hell-Dunkel-Regime gehalten und hatten rund um die Uhr Zugang zu Wasser und Futter ad libitum. Die Haltung erfolgte in Kleingruppen von bis zu acht Tieren pro Käfig.

3.2.2 Bestimmung der Zellteilungsrate

3.2.2.1 Vorbereitung der Versuchstiere auf die Perfusion

In Vorbereitung auf die Perfusion der Nieren wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation unter Isoflurannarkose getötet (3,0 Vol%)

3.2.2.2 Perfusion der Nieren

Zur Perfusion wurde die Maus in Rückenlage gelagert und fixiert. Um die Eröffnung des Abdomens zu erleichtern, wurden einige Tropfen Paraffinöl auf dem Fell in Höhe der Schnittlinie verteilt. Einem Hautschnitt folgte die Eröffnung der Bauchhöhle über die Linea alba über eine Länge vom Sternum bis zum Eingang der Beckenhöhle. Danach wurde das Abdomen mit Hilfe von Entlastungsschnitten zu beiden Seiten komplett eröffnet. Nach Vorlagerung des gesamten Darmkonvolutes zu einer Seite wurde die Aorta abdominalis vorsichtig freipräpariert und mit einer Bulldog-Klemme distal der Abzweigungen der Aa. renales abgeklemmt. Die Aorta wurde daraufhin möglichst weit kaudal mit einer Augenschere eröffnet und mit Hilfe eines Vessel-Dilators eine Butterfly-Kanüle eingeführt, die mit einer weiteren Bulldog-Klemme in ihrer Position fixiert wurde. Im Anschluss an die Eröffnung der benachbarten Vena cava caudalis erfolgte die Perfusion mit ca. 30 ml 0,9%iger NaCl-Lösung, der 1 ml Heparin (25000 I.E./5 ml) pro 500 ml Infusionslösung zugesetzt wurde, gefolgt von ca. 30 ml PFA (3%, pH 7,34). Die Nieren wurden nach erfolgter Perfusion vorsichtig entnommen, die Kapseln entfernt und die Organe für 30 Minuten in 70%iges Methanol gelegt. Die Lagerung bis zum Schneiden erfolgte gekühlt in PBS und dauerte höchstens 24 Stunden.

3.2.2.3 Schneiden und Einbetten der Nieren

Das Schneiden der perfundierten Nieren erfolgte am Vibratom, mit dessen Hilfe 800 µm dicke Schnitte der Nieren hergestellt wurden. Dafür wurden die Nieren zunächst halbiert und mit niedrigschmelzender Agarose (30 mg Agarose auf 1 ml PBS, ca. 1 ml pro Nierenhälfte, je nach Größe) stabil eingebettet, was eine Kühlzeit von etwa einer halben Stunde erforderte. Die eingebetteten Nieren wurden bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert, die hergestellten Schnitte wurden in PBS ebenfalls auf Eis gelegt. Die Nierenschnitte wurden unter Benutzung von 500 µm dicken Kunststoffspacern zwischen zwei Präzisions-Deckgläsern in PBS eingebettet, um einen ausreichenden Kontakt der gesamten Schnittfläche zum Deckglas zu gewährleisten und so eine Untersuchung am Multiphotonenmikroskop zu ermöglichen.

3.2.2.4 Untersuchung der Nieren am Mikroskop

Die Nierenschnitte wurden am Multiphotonenmikroskop (Zeiss LSM 710) untersucht. Die Anregung des in den mitotisch aktiven Zellen der Mäuse exprimierten GFP erfolgte mit Hilfe eines Chameleon Ultra-II Multiphotonen-Lasers (Coherent) mit einer

Wellenlänge von 860 nm. Verwendet wurde zudem ein Wasser-Immersionsobjektiv mit 40facher Vergrößerung und hoher numerischer Apertur. Die eingebetteten Nierenschnitte wurden zur Untersuchung auf einem speziell angepassten Mikroskoptisch gelagert und mit einer Abdeckung aus Rettungsfolie versehen, um den Einfall von Streulicht aus dem Raum zu verhindern.

3.2.2.4.1 Einstellungen am 2-Photonenmikroskop

Aus einem Nierenschnitt wurden zur Untersuchung Z-Stapel von sechs zufällig ausgewählten Bereichen der Niere angefertigt, von denen vier im Bereich des Cortex und zwei im Bereich der Medulla lagen. Die Anregung erfolgte mit einem Chameleon Ultra-II Multiphotonen-Laser mit einer Wellenlänge von 860 nm. Die Laserpower lag bei 26-28%. Die Größe der Z-Stapel betrug im Bereich des Cortex 40 Slices pro Stelle und im Bereich der Medulla 30 Slices pro Stelle, um die Untersuchung eines definierten Gewebevolument zu gewährleisten.

3.2.2.4.2 Auswertung der aufgenommenen Bilder

Durch die Erstellung von Z-Stapeln mit einer festgelegten Anzahl von Slices pro Stapel konnte ein definiertes Gewebevolumen in den Nieren auf das Vorhandensein von GFP-positiven und damit in Teilung befindlichen Zellen untersucht werden. Im Bereich des Cortex betrug dieses Volumen pro Stelle bei 40 Slices von jeweils 0,558 μm Dicke und einer Bildgröße von 303,64 x 303,64 μm 0,002058 mm^3 . In der Medulla waren es bei gleichen Abmessungen und 30 Slices pro Stelle 0,001543 mm^3 . Innerhalb der so aufgenommenen Z-Stapel wurde die Anzahl GFP-positiver Zellen ausgezählt. Die ermittelten Ergebnisse wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf ein Volumen von $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ umgerechnet. Außerdem wurden die Ergebnisse je nach Bedarf entweder in ihrer Gesamtheit betrachtet, oder beispielsweise in Rinde und Mark unterteilt. Ein Beispiel ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

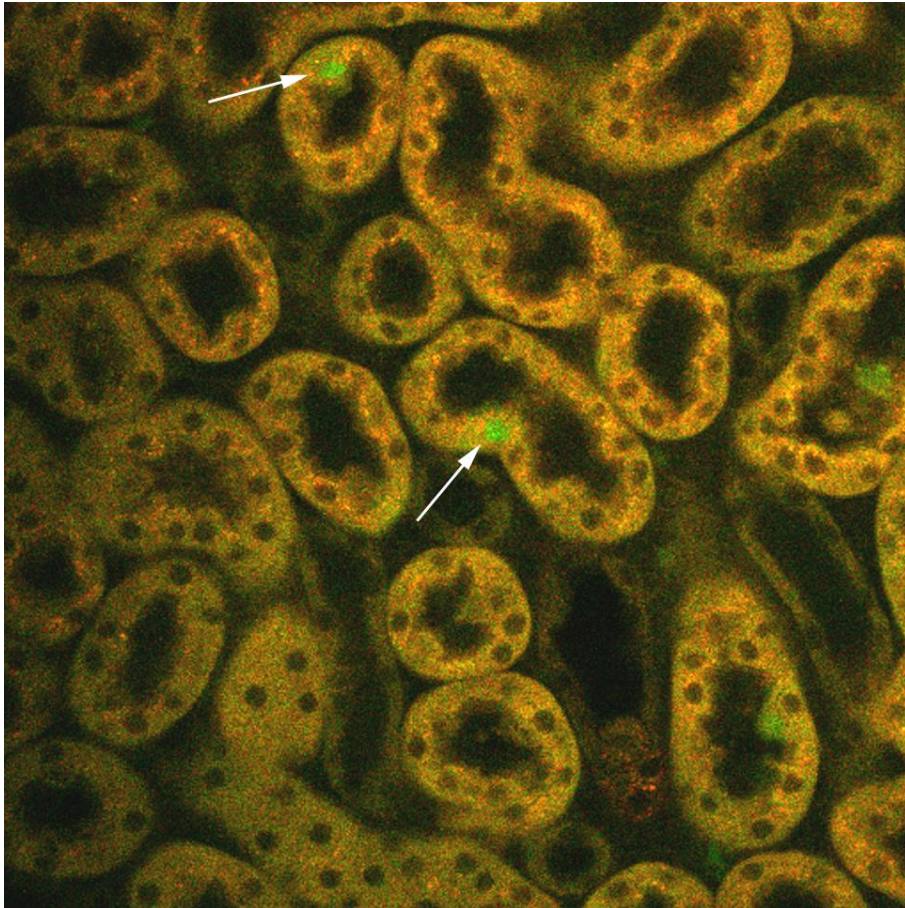


Abbildung 4: Beispiel einer Aufnahme aus dem Cortex Die Pfeile markieren die in dieser Aufnahme sichtbaren GFP-positiven Zellen. Ihre Anzahl wird innerhalb des gesamten Z-Stapels bestimmt und im Anschluss auf ein definiertes Gewebevolumen umgerechnet.

3.2.3 Behandlung mit ACE-Hemmer und Low Salt-Diät

Um die pharmakologische Beeinflussung der Zellteilungsaktivität in einer ansonsten gesunden Niere zu untersuchen, wurden die Versuchstiere über einen gewissen Zeitraum mit dem ACE-Hemmer Enalapril in Kombination mit einer salzarmen Diät behandelt.

3.2.3.1 Dosierung und Darreichungsform von Enalapril

Den Versuchstieren wurden vor der Perfusion und anschließender Untersuchung ihrer Nieren über einen Zeitraum von einer Woche der ACE-Hemmer und die kochsalzarme Diät verabreicht. Bei dem hier genutzten ACE-Hemmer handelt es sich um Enalapril maleate salt der Firma SIGMA. Es wurde den Tieren in einer Konzentration von 150 mg/ml in lichtundurchlässigen Trinkflaschen zur freien Verfügung gestellt und jeden zweiten Tag gewechselt. Das kochsalzarme Futter stand den Mäusen 24 Stunden am Tag

ad libitum zur Verfügung. Die weiblichen Tiere hatten während der Behandlung ein Körpergewicht zwischen 17,32 g und 23,5 g, die männlichen Tiere wogen zwischen 25,0 g und 29,57 g.

3.2.4 Unilaterale Nephrektomie

Als Modell für eine Lebend-Nierenspende wurde die unilaterale Nephrektomie herangezogen. Diese ermöglichte es, die Folgen des Verlustes einer Niere auf die Proliferationsrate im kontralateralen Organ zu untersuchen. Untersucht wurden Tiere im Alter von 3, 4, 5, 30, 40 und 50 Wochen. Die Perfusion und Untersuchung der Nieren am Mikroskop erfolgte, je nach Versuch, 5, 7 oder 14 Tage nach der OP.

3.2.4.1 Operation der Versuchstiere

Den Versuchstieren wurde 30 Minuten vor Beginn der Operation eine subkutane Buprenorphinjektion verabreicht. Genutzt wurde Buprenorphin in einer Konzentration von 0,3mg/ml. Von einer daraus mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellten Verdünnung in einer Konzentration von 1:10 erhielten die Tiere 3 µl/g KGW (entsprechend 0,09 µg/g KGW) auf der rechten Körperseite unter die Haut injiziert. Um eine ausreichende Analgesie zu erzielen wurde bis zum Beginn der Operation eine Wartezeit von etwa 30 Minuten eingehalten.

3.2.4.1.1 Narkose

Für die Durchführung der unilateralen Nephrektomie wurde das Versuchstier in einer mit Isofluran gefluteten Narkosekammer anästhesiert. Die Narkose wurde im weiteren Verlauf über eine Narkosemaske aufrechterhalten. Die Inhalationsnarkose erfolgte mit 2-2,5 Vol% Isofluran.

3.2.4.1.2 Durchführung der OP

Die Maus wurde auf der rechten Körperseite liegend auf dem beheizbaren Operationstisch mit angeschlossener Narkosemaske fixiert. Nachdem die linke Körperseite im Bereich der Niere vom Fell befreit wurde, um ein möglichst sauberes Arbeiten zu gewährleisten, wurde die Haut mit Alkohol desinfiziert und mit einem

sterilen OP-Tuch abgedeckt. Nach Ertasten der Niere wurde ein etwa der Größe des Organs entsprechender Hautschnitt über der linken Niere ausgeführt und anschließend auch die Muskulatur eröffnet. Durch diesen Schnitt wurde die Niere vorgelagert und vorsichtig freipräpariert, bis die zu- und abführenden Gefäße deutlich dargestellt waren. Hierbei wurde unter Schonung der Glandula suprarenalis und, bei weiblichen Tieren, des Ovars gearbeitet. Anschließend wurden die Nierengefäße sorgfältig abgebunden und danach die Niere entfernt. Nach gründlicher Kontrolle auf mögliche Nachblutungen aus der Ligatur wurde die Muskulatur mit Einzelheften vernäht und die Haut mit Wundkleber verschlossen.

3.2.4.2 Kontrolle des Körpergewichts nach der Operation

Um die Konstitution der Versuchstiere nach der unilateralen Nephrektomie zu kontrollieren, wurde die Entwicklung des Gewichtes der Tiere festgehalten. Verglichen wurde das Körpergewicht vor der Entfernung der linken Niere mit dem zum Zeitpunkt der Perfusion.

3.2.4.3 Erfassung des Nierengewichtes post OP

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die verbleibende kontralaterale Niere nach unilateraler Nephrektomie bereits nach kurzer Zeit messbar an Masse zunimmt, wurde ihr Gewicht nach der Entnahme bestimmt und das der bei der Nephrektomie entnommenen Organe mit dem Gewicht der für unterschiedliche Zeiten im Tier verbleibenden Nieren verglichen. Hierfür wurde im Anschluss an die Operation die Kapsel der jeweiligen Niere entfernt und das Organ dann für 48 Stunden bei 60 °C getrocknet. Das Trockengewicht der Nieren wurde dann mit Hilfe einer Präzisionswaage ermittelt.

3.2.5 Identifikation der teilungsaktiven Zellen

Um zunächst einen Überblick zu gewinnen, welche Zellen in der Niere grundsätzlich in der Lage sind, sich zu teilen und anschließend diejenigen Zellen zu identifizieren, die nach einer unilateralen Nephrektomie vermehrt in die S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus eintreten, wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen angefertigt.

3.2.5.1 Vorbereitung der Nierenschnitte

In Vorbereitung auf die immunhistochemische Färbung wurden die Nieren zunächst so vorbereitet, wie für die weiter oben beschriebene Untersuchung auf Zellteilungsaktivität. Die Perfusion der Mäuse erfolgte nach dem bereits beschriebenen Protokoll und es wurden auch für diesen Teil der Arbeit 800 µm dicke Organschnitte am Vibratom angefertigt. Diese wurden in mit PBS gefüllte Eppendorfgeläße verbracht.

3.2.5.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient dem Nachweis verschiedener Moleküle (z.B. Proteine oder Polysaccharide) mit Hilfe der Markierung durch Antikörper. In der vorliegenden Arbeit wurde die sogenannte indirekte Immunmarkierung verwendet. Dabei bindet ein Primärantikörper an das Antigen, das nachgewiesen werden soll. Dieser Primärantikörper ist selber nicht markiert, sondern es bedarf eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers, der an den Primärantikörper bindet und dann mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden kann. Damit der Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden kann, muss er gegen die Spezies gerichtet sein, aus der der Primärantikörper stammt (Mulisch und Welsch 2015). Die Färbungen der Gewebeschnitte erfolgten in 2 ml-Eppendorfgeläßen nach folgenden Protokollen:

- Megalin (Nachweis proximaler Tubulusepithelzellen)
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - 1 h blockieren (10% HS und 1% BSA) bei RT
 - Inkubation mit Primärantikörper (guineapig- anti-Megalin-AK; Verdünnung 1:500 in Blockierlösung) über Nacht bei 4 °C
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - Inkubation mit Sekundärantikörper (Cy5-konjugierter anti-guineapig-AK; Verdünnung 1:400 in 1% BSA) für 1,5 h bei RT
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - Einbetten des Schnittes zwischen Präzisionsdeckgläsern in PBS
- pNCC (Nachweis distaler Tubulusepithelzellen)
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - 1 h blockieren (10% HS und 1% BSA) bei RT
 - Inkubation mit Primärantikörper (rabbit-anti-pNCC-AK; Verdünnung 1:100 in Blockierlösung) über Nacht bei 4 °C

- 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
- Inkubation mit Sekundärantikörper (Cy5-konjugierter anti-rabbit-AK; Verdünnung 1:400 in 1% BSA) für 1,5 h bei RT
- 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
- Einbetten des Schnittes zwischen Präzisionsdeckgläsern in PBS
- SGC α 1 (Nachweis corticaler Fibroblasten)
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - 1 h blockieren (10% HS und 1% BSA) bei RT
 - Inkubation mit Primärantikörper (rabbit-anti-SGC α 1-AK; Verdünnung 1:100 in Blockierlösung) über Nacht bei 4 °C
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - Inkubation mit Sekundärantikörper (Cy5-konjugierter anti-rabbit-AK; Verdünnung 1:400 in 1% BSA) für 1,5 h bei RT
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - Einbetten des Schnittes zwischen Präzisionsdeckgläsern in PBS
- CD11c (Nachweis dendritischer Zellen)
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - 1 h blockieren (5% BSA und 0,04% Triton X) bei RT
 - Inkubation mit Primärantikörper (hamster-anti-CD11c-AK; Verdünnung 1:100 in 5% BSA) über Nacht bei 4 °C
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - Inkubation mit Sekundärantikörper (Alexa594-konjugierter anti-hamster-AK; Verdünnung 1:400 in 0,5% BSA) für 1,5 h bei RT
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - Einbetten des Schnittes zwischen Präzisionsdeckgläsern in PBS
- Aquaporin2 (Nachweis von Hauptzellen im Sammelrohr)
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - 1 h blockieren (10% HS und 1% BSA) bei RT
 - Inkubation mit Primärantikörper (rabbit-anti-AP2-AK; Verdünnung 1:200 in Blockierlösung) über Nacht bei 4 °C
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - Inkubation mit Sekundärantikörper (Cy5-konjugierter anti-rabbit-AK; Verdünnung 1:400 in 1% BSA) für 1,5 h bei RT
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT

- Einbetten des Schnittes zwischen Präzisionsdeckgläsern in PBS
- V-ATPase (Nachweis von α -Schaltzellen im Sammelrohr)
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - 1 h blockieren (10% HS und 0,3% Triton X) bei RT
 - Inkubation mit Primärantikörper (goat-anti-V-ATPase-AK; Verdünnung 1:200 in Blockierlösung) über Nacht bei 4 °C
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - Inkubation mit Sekundärantikörper (Cy5-konjugierter anti-rabbit-AK; Verdünnung 1:400 in Blockierlösung) für 1,5 h bei RT
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - Einbetten des Schnittes zwischen Präzisionsdeckgläsern in PBS
- Pendrin (Nachweis von β -Schaltzellen im Sammelrohr)
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - 1 h blockieren (0,3% TritonX und 10% HS) bei RT
 - Inkubation mit Primärantikörper (rabbit-anti-Pendrin-AK; Verdünnung 1:100 in Blockierlösung) über Nacht bei 4 °C
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - Inkubation mit Sekundärantikörper (Cy5-konjugierter anti-rabbit-AK; Verdünnung 1:400 in Blockierlösung) für 1,5 h bei RT
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - Einbetten des Schnittes zwischen Präzisionsdeckgläsern in PBS
- NKCC2 (Nachweis von Zellen im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife)
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - 1 h blockieren (5% BSA und 0,04% TritonX) bei RT
 - Inkubation mit Primärantikörper (rabbit-anti-NKCC2-AK; Verdünnung 1:200 in 5% BSA) über Nacht bei 4 °C
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - Inkubation mit Sekundärantikörper (Cy5-konjugierter anti-rabbit-AK; Verdünnung 1:400 in 0,5% BSA) für 1,5 h bei RT
 - 3x5 Minuten waschen in PBS auf dem Schüttler bei RT
 - Einbetten des Schnittes zwischen Präzisionsdeckgläsern in PBS

3.2.5.3 Einstellungen am Mikroskop

Die Anregung erfolgte bei 633 nm (Laserpower 8%) und 488 nm (Laserpower 15-20%). Im Live-Modus wurde der gesamte Gewebeschnitt untersucht und auf das Vorliegen von Colokalisationen der jeweiligen Färbungen mit GFP-positiven Zellen untersucht. Die Aufnahmen der Beispielbilder wurden mit der gleichen Laserpower hergestellt. Die Bildgröße betrug 512 x 512 Pixel.

3.2.6 Statistik

Ausgewertet wurden alle Daten mit Hilfe von Microsoft Excel 2010 und der Statistiksoftware GraphPad Prism 5. Die Werte wurden als Mittelwert \pm SEM berechnet. Als statistische Tests zur Ermittlung signifikanter Unterschiede dienten t-Test und One-way ANOVA.

4 Ergebnisse

4.1 Zellteilung in Abhängigkeit vom Lebensalter

Die Entwicklung der Niere ist bei der Maus, anders als beim Menschen, mit der Geburt noch nicht abgeschlossen. Die Nephronentstehung dauert post partum an und ist erst ca. 7 Tage (Hartman et al. 2007) bis wenige Wochen nach der Geburt abgeschlossen (McMahon 2016). Um Aufschluss darüber zu erlangen, ob sich auch in den Nieren adulter Tiere noch altersabhängige Unterschiede in der Zellteilungsrate beobachten lassen, wurden die Nieren von Tieren verschiedener Altersgruppen untersucht. Die in Teilung befindlichen Zellen in den Nieren der verwendeten Pdk1-Cyclin B1-GFP transgenen Mäuse konnten aufgrund des während der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus exprimierten GFP unter dem 2-Photonenmikroskop eindeutig identifiziert werden (Abbildung 5).

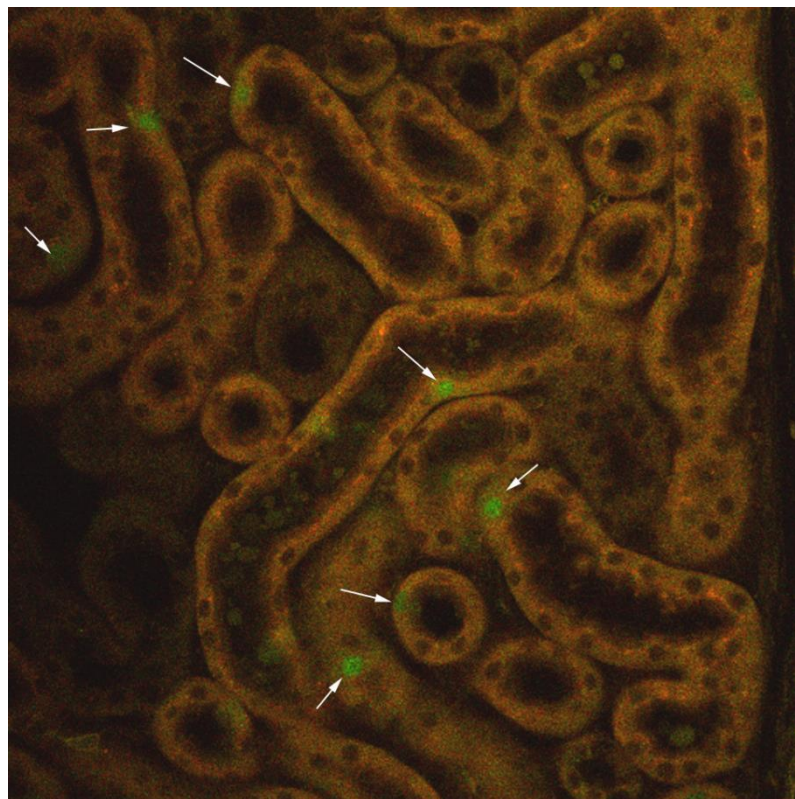


Abbildung 5: Visualisierung der proliferierenden Zellen Die mit Pfeilen markierten Zellen in der Niere einer Pdk1-Cyclin B1-GFP transgenen Maus befinden sich in der S-, G2- oder M-Phase des Zellzyklus und exprimieren GFP, das mit dem 2-Photonenmikroskop detektiert werden kann.

4.1.1 Veränderungen der Zellteilungsaktivität

Untersucht wurden Mäuse im Alter von 3, 4, 5, 20 und 50 Wochen. Die Anzahl an Zellen in der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus betrug bei den 3 Wochen alten Mäusen $1,89 \pm 0,39$ pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Nierengewebe ($n=36$, entspricht der Anzahl der untersuchten Stellen). Bei den 4 Wochen alten Tieren waren es $4,03 \pm 0,61$ ($n=30$), bei den 5 Wochen alten $1,18 \pm 0,23$ ($n=30$), bei den 20 Wochen alten $0,57 \pm 0,09$ ($n=48$) und bei den 50 Wochen alten Tieren $0,32 \pm 0,08$ ($n=48$) Zellen in Teilung pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Nierengewebe (Abbildung 6).

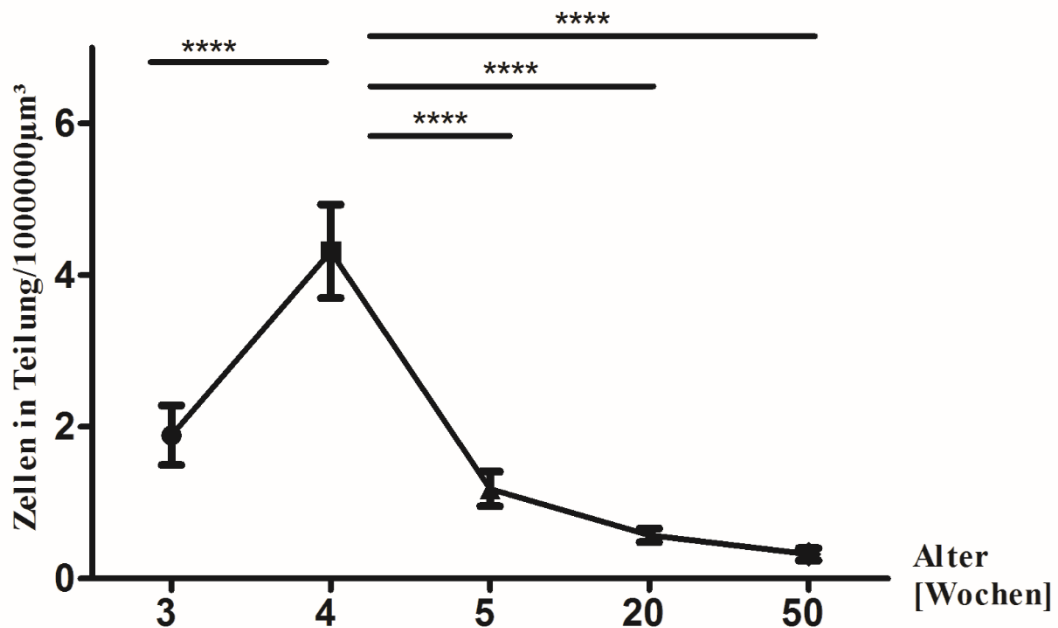


Abbildung 6: Zellteilungsaktivität in der gesamten Niere mit zunehmendem Lebensalter Den größten Anteil an mitotisch aktiven Zellen wiesen die Nieren der 4 Wochen alten Tiere auf. Danach zeigte sich ein stetiger Abfall der Proliferationsrate mit zunehmendem Lebensalter (**** zeigt $P < 0,0001$).

Wie aus Abbildung 6 ersichtlich wird, ist die Zellteilungsrate in der Niere im Alter von 4 Wochen am höchsten. Die Unterschiede zu allen weiteren untersuchten Gruppen sind hochsignifikant ($P < 0,0001$). Der Anteil an in Mitose befindlichen Zellen ist bei der jüngsten untersuchten Gruppe noch deutlich niedriger, steigt dann bis zum Alter von vier Wochen auf den höchsten Wert an, um dann mit fortschreitendem Lebensalter wieder abzunehmen.

4.1.2 Lokalisation der teilungsaktiven Zellen

Um den Teil der Niere mit dem höchsten Anteil an teilungsaktiven Zellen näher einzugrenzen, wurde nicht nur die Zellteilungsrate in der gesamten Niere betrachtet, sondern zusätzlich eine Aufteilung in Cortex und Medulla unternommen, sowie das Interstitium gesondert untersucht. Hierbei wurde der Cortex definiert als die glomerulumhaltige Zone der Niere.

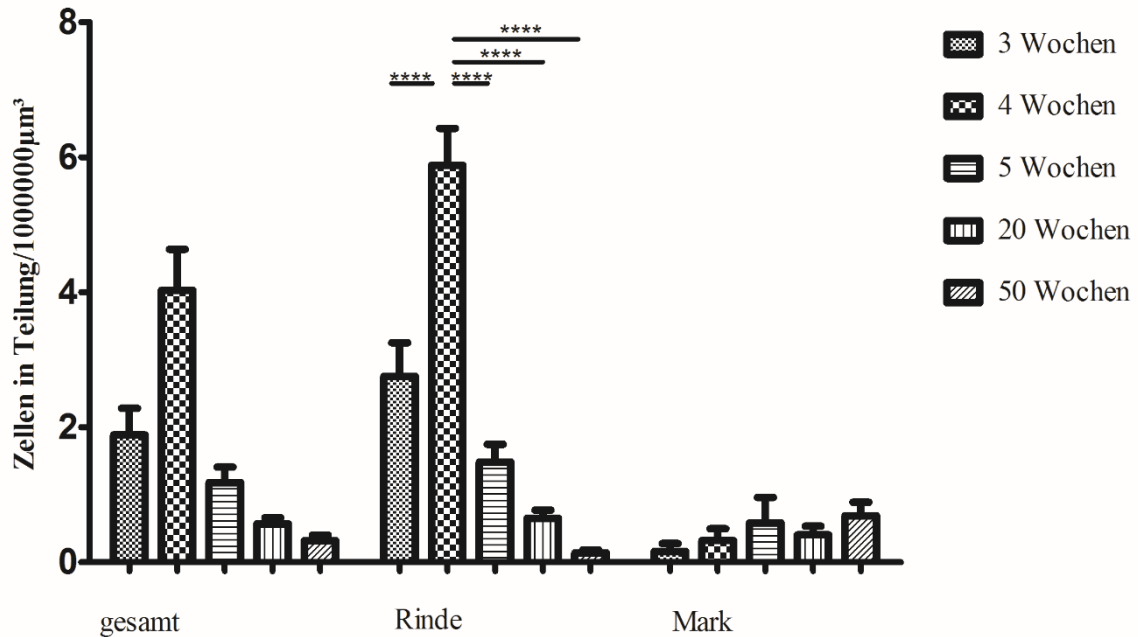


Abbildung 7: Verteilung der Zellteilungsaktivität in der Niere mit zunehmendem Lebensalter Die für die gesamte Niere beschriebenen Unterschiede spiegeln sich im Cortex wider. Im Mark waren keine altersabhängigen Unterschiede in der Proliferationsrate ersichtlich. Die Zellteilungsrate war hier insgesamt sehr niedrig (**** zeigt $P < 0,0001$).

Im Cortex waren bei 3 Wochen alten Mäusen $2,75 \pm 0,50$ ($n=24$), bei 4 Wochen alten $5,88 \pm 0,55$ ($n=20$), bei 5 Wochen alten $1,48 \pm 0,27$ ($n=20$), bei 20 Wochen alten $0,65 \pm 0,12$ ($n=32$) und bei 50 Wochen alten Tieren $0,14 \pm 0,04$ ($n=32$) Zellen in Teilung zu sehen. Die Anzahl in der Mitose befindlicher Zellen im Mark war deutlich geringer (3 Wochen $0,16 \pm 0,12$ ($n=12$); 4 Wochen $0,32 \pm 0,17$ ($n=10$); 5 Wochen $0,58 \pm 0,38$ ($n=10$); 20 Wochen $0,40 \pm 0,13$ ($n=16$); 50 Wochen $0,69 \pm 0,20$ ($n=16$) GFP-positive Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Nierengewebe). Die in der Gesamtniere festgestellten Unterschiede spiegeln sich mit gleicher Signifikanz im Cortex wider. In der Medulla waren dagegen keine altersabhängigen Unterschiede in der Zellteilungsrate zu beobachten (Abbildung 7).

Im Interstitium fand in der gesunden Niere wenig Zellteilung statt, auch gab es keine Unterschiede zwischen den in diesem Versuch untersuchten Altersgruppen (3 Wochen $0,09 \pm 0,04$ (n=36); 4 Wochen $0,30 \pm 0,08$ (n=30); 5 Wochen $0,05 \pm 0,03$ (n=30); 20 Wochen $0,12 \pm 0,04$ (n=48); 50 Wochen $0,18 \pm 0,07$ (n=48) GFP-positive Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Nierengewebe, Abbildung 8).

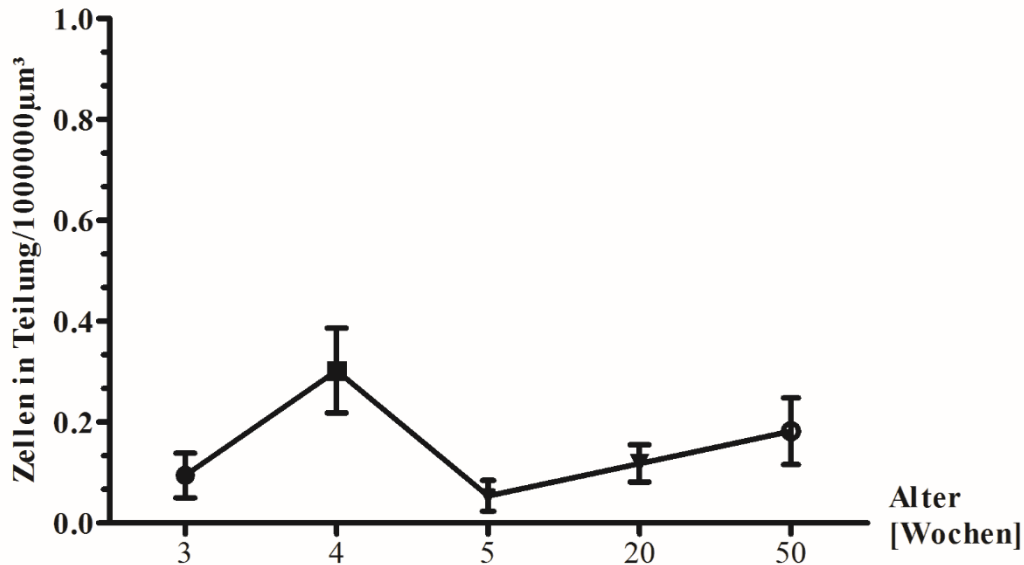


Abbildung 8: Teilungsrate in den Zellen des Interstitiums mit zunehmendem Lebensalter In den untersuchten Nieren war keine Altersabhängigkeit der Zellteilungsrate im Interstitium festzustellen. Die Zahl sich teilender Zellen im Interstitium war in allen Altersstufen sehr niedrig.

Die Nierenrinde weist insgesamt eine höhere Zellteilungsrate auf als das Nierenmark. Betrachtet man die gesamte Niere, verändert sich die Anzahl sich teilender Zellen im Laufe des Lebens deutlich. Diese Veränderungen sind jedoch nicht in der gesamten Niere ersichtlich, sondern beschränken sich auf den Cortex. Interstitielle Zellen sind von den altersabhängigen Unterschieden nicht betroffen.

4.2 Zellteilungsrate unter Behandlung mit ACE-Hemmer und salzarmer Diät

Daten in der Literatur legen nahe, dass eine Behandlung mit dem ACE-Hemmer Enalapril in Kombination mit einer ad libitum gefütterten kochsalzarmen Diät zu einer verminderten Zellteilungsrate führt (Krivosíková et al. 1999). Um diese Hypothese zu

prüfen, wurde eine Gruppe der Pdk1-Cyclin B1-GFP transgenen Mäuse über eine Woche entsprechend behandelt und danach die Zahl GFP-positiver Zellen in ihren Nieren mit der in den Nieren von Tieren einer unbehandelten Kontrollgruppe im gleichen Alter verglichen.

4.2.1 Veränderungen der Zellteilungsaktivität

Untersucht wurde zunächst im Vergleich die Zahl GFP-positiver und somit in Teilung befindlicher Zellen unter Betrachtung der gesamten Niere. Bei den mit Enalapril und salzreicher Diät behandelten Tieren befanden sich $1,35 \pm 0,31$ Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Nierengewebe ($n=30$) in Teilung, bei den Kontrolltieren waren es $0,39 \pm 0,12$ ($n=18$, Abbildung 9).

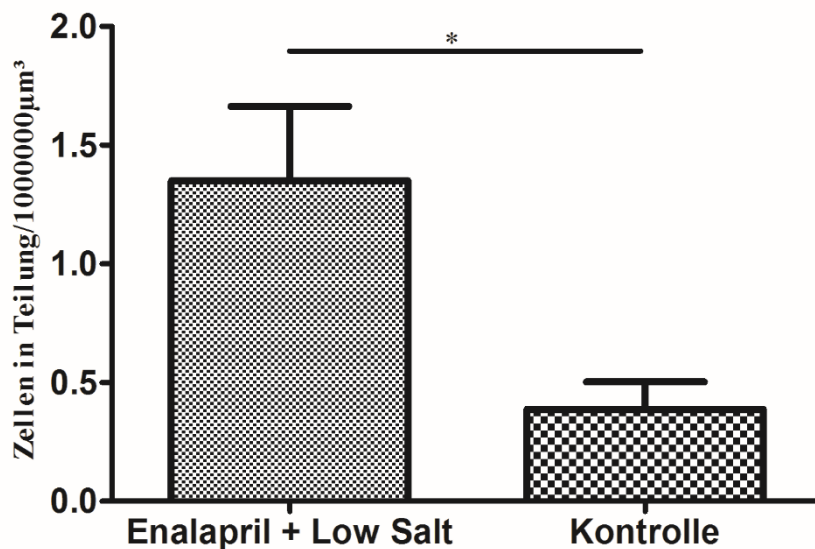


Abbildung 9: Vergleich der Zellteilungsaktivität nach Behandlung mit einem ACE-Hemmer mit unbehandelten Kontrolltieren Die über eine Woche mit Enalapril und Low-Salt-Diät behandelten Tiere wiesen eine signifikant erhöhte Zellteilungsrate auf im Vergleich mit unbehandelten Tieren (* zeigt $P=0,0251$).

Wie in Abbildung 9 ersichtlich wird, hatte die Behandlung mit dem ACE-Hemmer Enalapril (150 mg/l Trinkwasser über 7 Tage) und kochsalzreicher Diät ad libitum eine Erhöhung der Zellteilungsrate zur Folge ($P=0,0251$).

4.2.2 Lokalisation der teilungsaktiven Zellen

Auch hier wurden Cortex und Medulla zusätzlich getrennt voneinander untersucht, um zu klären, auf welchen Teil der Niere sich die Behandlung mit Enalapril und

kochsalzreicher Diät hinsichtlich der Zellteilungsrate auswirkt. Im Cortex waren in den Nieren der behandelten Tiere $1,80 \pm 0,42$ Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Gewebe GFP-positiv ($n=20$), bei den unbehandelten Tieren waren es $0,53 \pm 0,15$ Zellen ($n=12$). Die Medulla wies bei Tieren der Versuchsgruppe $0,45 \pm 0,27$ ($n=10$), bei denen der Kontrollgruppe $0,11 \pm 0,11$ Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Gewebe auf ($n=6$). Dargestellt ist dies in Abbildung 10.

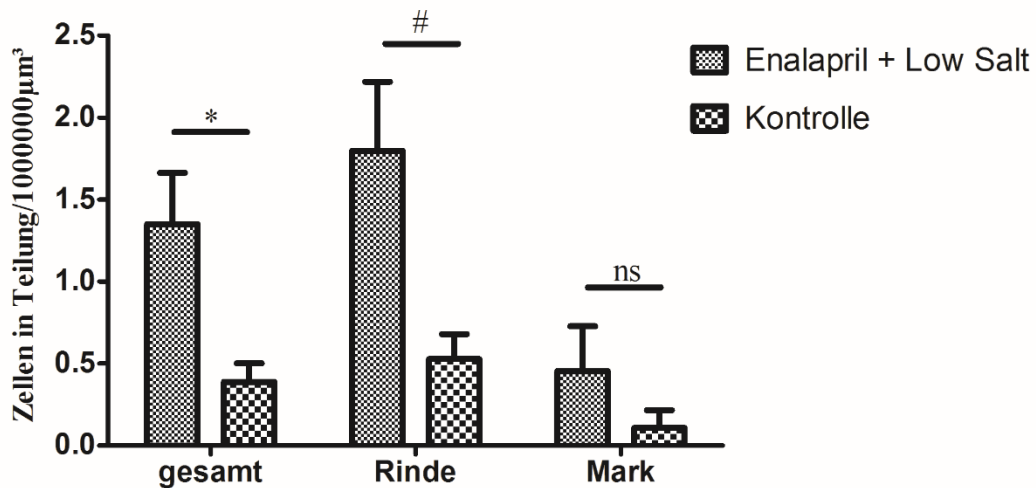


Abbildung 10: Änderungen der Proliferationsrate in Cortex und Medulla nach Behandlung mit Enalapril und Low-Salt-Diät Im Cortex zeigte sich, wie auch in der Gesamtniere, eine Erhöhung der Zellteilungsrate nach Behandlung mit 150 mg/l Enalapril und kochsalzreicher Diät über 7 Tage. In der Medulla änderte sich die Zellteilungsrate nicht (* zeigt $P=0,0251$; # zeigt $P=0,0296$).

Wie bereits in der gesamten Niere beobachtet, zeigte sich im Cortex eine Erhöhung der Proliferationsrate nach Behandlung der Tiere mit dem ACE-Hemmer und Fütterung der salzarmen Diät ($P=0,0296$). Im Mark dagegen fand keine vermehrte Zellteilung nach der Behandlung statt.

Im Interstitium war die Zellteilungsaktivität mit $0,79 \pm 0,17$ sich teilenden Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Nierengewebe ($n=30$) nach einwöchiger Behandlung mit Enalapril und Low Salt-Diät höher als bei den unbehandelten Tieren ($0,04 \pm 0,04$ Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ ($n=18$), $P=0,0016$). Dargestellt ist dies in Abbildung 11.

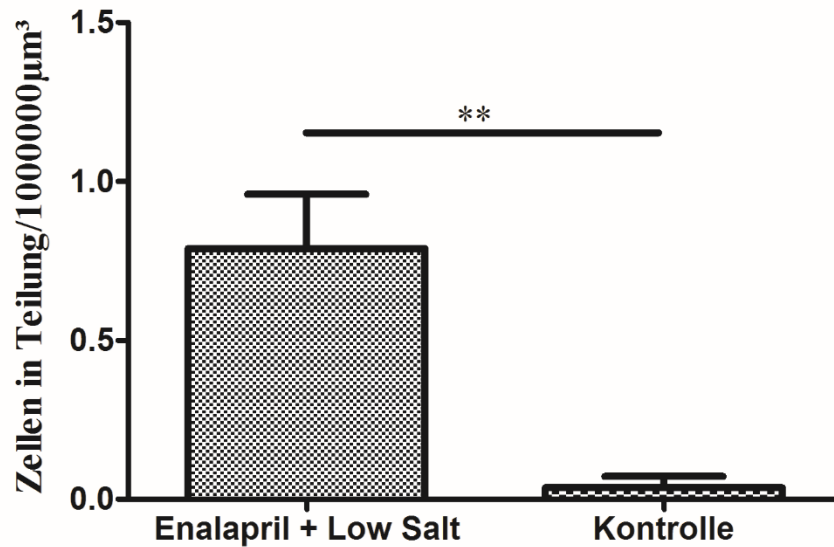


Abbildung 11: Zellteilungsaktivität im Interstitium nach Behandlung mit Enalapril und Low-Salt-Diät im Vergleich mit Kontrolltieren Eine Behandlung mit dem ACE-Hemmer Enalapril (150 mg/l) und salzarmer Diät über 7 Tage hatte eine vermehrte Zellteilung im Interstitium zur Folge (** zeigt $P=0,0016$).

Eine Behandlung mit dem ACE-Hemmer Enalapril in Kombination mit einer kochsalzarmen Diät führt zu einer vermehrten Zellteilung in den Nieren. Diese erhöhte Zellteilungsrate beschränkt sich auf den Bereich der Nierenrinde und ist besonders in Zellen des Interstitiums ausgeprägt.

4.3 Unilaterale Nephrektomie

Eine unilaterale Nephrektomie hat der Literatur nach ein Wachstum der kontralateralen Niere zur Folge. Ob diese durch eine Hyperplasie oder eine Hypertrophie bedingt ist, konnte noch nicht abschließend geklärt werden (Johnson und Vera Roman 1966). Dies konnte mit Hilfe der Pgl1-Cyclin B1-GFP transgenen Mäuse untersucht werden.

4.3.1 Veränderungen der Zellteilungsaktivität bei verschiedenen Altersgruppen

Untersucht wurden Tiere im Alter von 3, 4, 5, 30, 40 und 50 Wochen, wobei die Daten von je einer Versuchsgruppe eine Woche nach Entfernung der linken Niere und einer nicht operierten Kontrollgruppe pro Altersstufe stammen. Dadurch war es möglich, die Tiere nicht nur auf mögliche Veränderungen in der Zellteilungsaktivität als Reaktion auf

eine unilaterale Nephrektomie zu untersuchen, sondern zusätzlich noch die Entwicklung mit fortschreitendem Lebensalter zu beobachten.

Im Alter von 3 Wochen teilten sich 7 Tage nach unilateraler Nephrektomie $3,03 \pm 0,41$ Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Nierengewebe ($n=24$), während es bei der nicht operierten Kontrollgruppe $1,89 \pm 0,39$ Zellen waren ($n=36$). Bei vier Wochen alten Tieren stieg die Zellteilung von $4,03 \pm 0,61$ ($n=30$) auf $6,24 \pm 0,52$ ($n=30$; $P=0,0199$), bei den 5 Wochen alten von $1,18 \pm 0,23$ ($n=30$) auf $2,02 \pm 0,31$ pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ ($n=24$; $P=0,0318$). Die Zahl an GFP-positiven Zellen erhöhte sich bei 30 Wochen alten Tieren von $0,17 \pm 0,07$ ($n=48$) nach unilateraler Nephrektomie auf $1,56 \pm 0,32$ Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ ($n=18$; $P < 0,0001$). Im Alter von 40 Wochen waren es bei nicht operierten Tieren $0,21 \pm 0,05$ ($n=48$) Zellen in Teilung. Dieser Wert erhöhte sich 7 Tage nach der Operation auf $1,28 \pm 0,16$ pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ ($n=30$; $P < 0,0001$). Die mit 50 Wochen älteste untersuchte Gruppe zeigte eine Erhöhung der Zellteilungsrate von $0,32 \pm 0,08$ Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Nierengewebe vor der Operation ($n=48$) auf $1,11 \pm 0,35$ danach ($n=24$; $P=0,0046$, Abbildung 12).

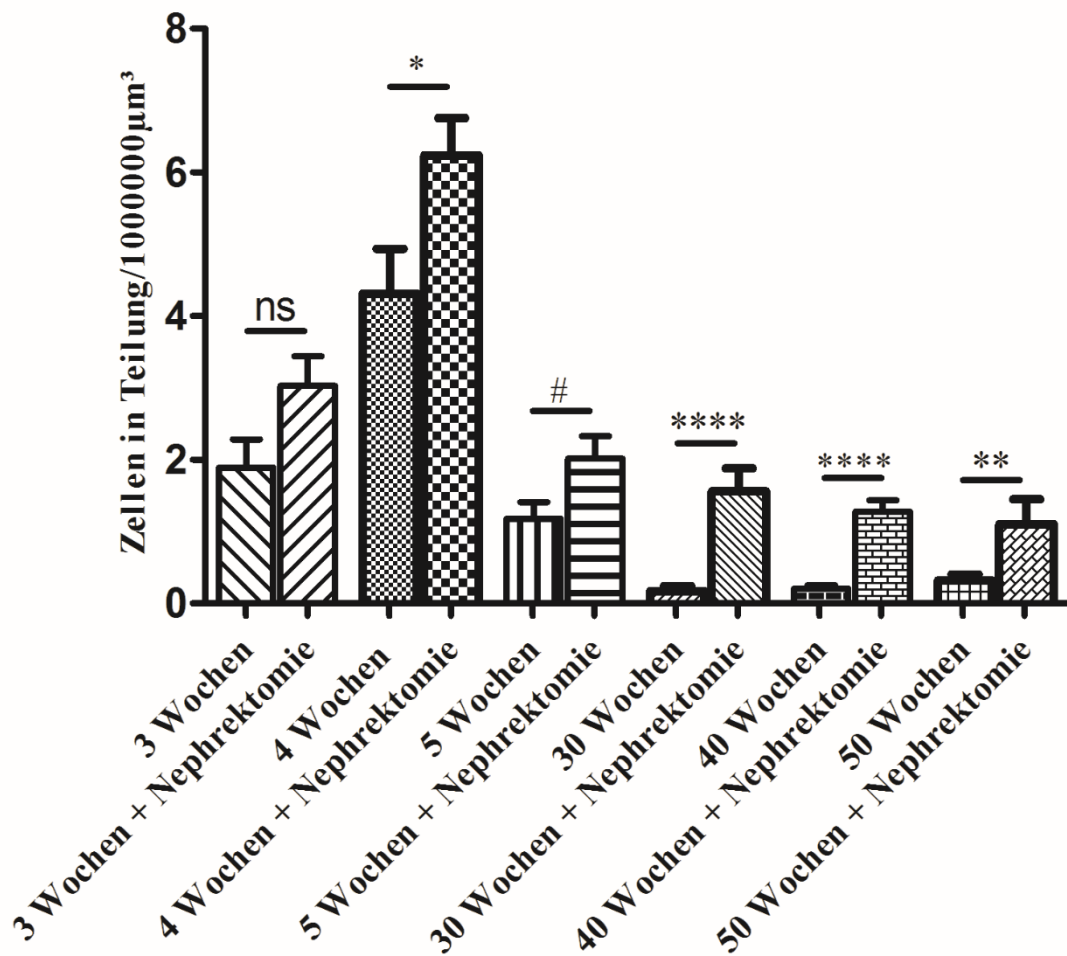


Abbildung 12: Entwicklung der Proliferationsrate eine Woche nach unilateraler Nephrektomie in verschiedenen Altersgruppen In allen untersuchten Altersstufen, abgesehen von den 3 Wochen alten Mäusen, war die Zellteilungsrate 7 Tage post OP erhöht. Besonders deutlich wurde dies bei Mäusen im Alter von 30 und 40 Wochen (* zeigt $P=0,0199$; # zeigt $P=0,0318$; ** zeigt $P=0,0046$; **** zeigt $P<0,0001$).

In allen untersuchten Altersgruppen stieg die Anzahl an Zellen in der S-, G2- oder M-Phase des Zellzyklus eine Woche nach unilateraler Nephrektomie an (dargestellt in Abbildung 12). Lediglich die Tiere der jüngsten Gruppe im Experiment (3 Wochen) zeigten keine signifikante Veränderung in der Zellteilungsrate. Besonders gravierend war der Anstieg bei den 30 und 40 Wochen alten Tieren.

Auch hier wurde im Anschluss eine Differenzierung zwischen Cortex und Medulla vorgenommen.

In der Nierenrinde teilten sich bei den 3 Wochen alten Mäusen ohne Nephrektomie $2,75 \pm 0,50$ Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Nierengewebe ($n=24$), eine Woche post OP waren es $3,71 \pm 0,46$ ($n=16$). Im Alter von vier Wochen waren es ohne Operation $5,88 \pm 0,55$ ($n=20$), nach unilateraler Nephrektomie $6,73 \pm 0,71$ ($n=20$). Bei der Kontrollgruppe der 5 Wochen alten Mäuse waren $1,48 \pm 0,27$ GFP-positive Zellen im untersuchten Gewebavolumen zu finden ($n=20$), bei den operierten Tieren waren es $2,34 \pm 0,41$ ($n=16$). Die Untersuchung der älteren Gruppen ergab bei den 30 Wochen alten Mäusen einen Anstieg der Zellteilungsrate im Cortex von $0,10 \pm 0,04$ ($n=32$) auf $0,88 \pm 0,23$ ($n=12$) post OP ($P < 0,0001$). Im Alter von 40 Wochen war ebenfalls ein Anstieg zu verzeichnen. Hier stieg die Teilungsrate von $0,17 \pm 0,05$ ($n=32$) auf $0,95 \pm 0,15$ Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ ($n=20$; $P < 0,0001$). In der mit 50 Wochen ältesten untersuchten Gruppe war ein Anstieg von $0,14 \pm 0,04$ ($n=32$) auf $0,49 \pm 0,14$ ($n=16$) zu beobachten ($P = 0,0020$). Dargestellt sind die Ergebnisse in Abbildung 13.

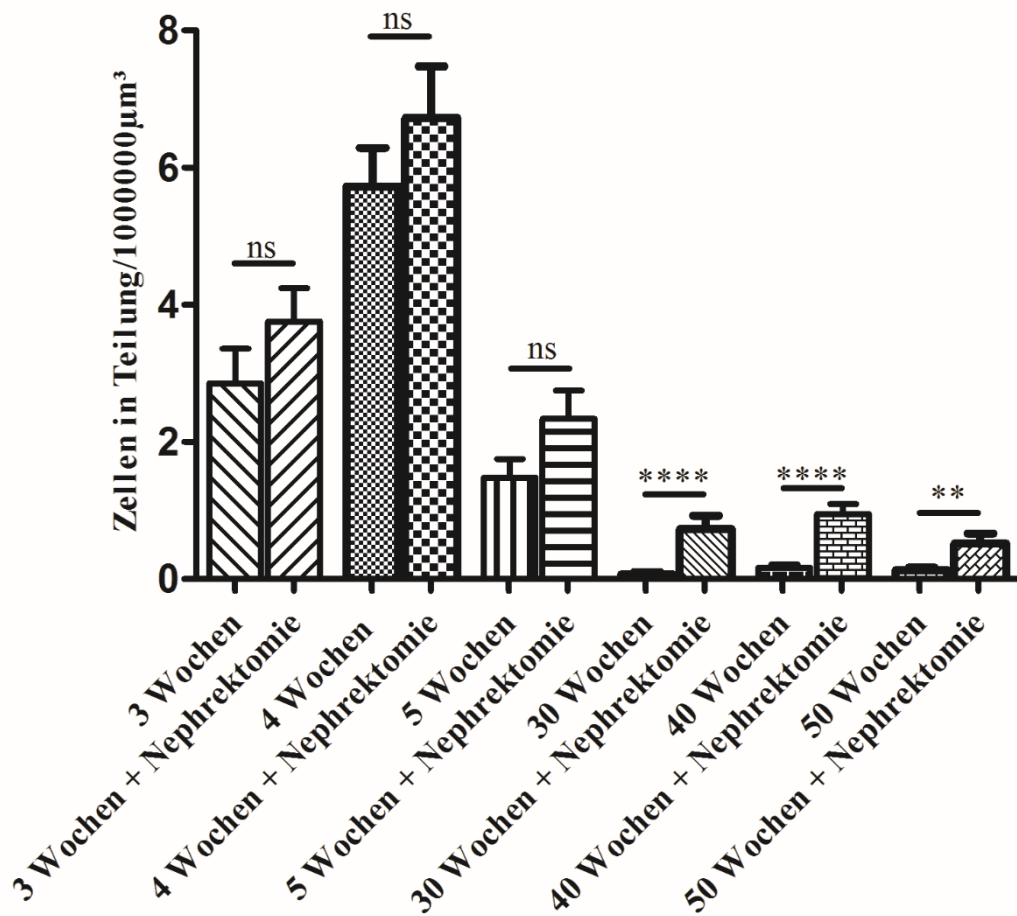


Abbildung 13: Entwicklung der Zellteilungsrate im Cortex eine Woche nach unilateraler Nephrektomie In der Nierenrinde fand eine vermehrte Zellteilung nur bei den älteren der untersuchten Tiere statt. Bei den 3, 4 und 5 Wochen alten Tieren war die Teilungsrate post OP unverändert (** zeigt $P=0,0020$; **** zeigt $P<0,0001$).

Im Alter von 3, 4 und 5 Wochen hatte eine unilaterale Nephrektomie keine erhöhte Zellteilungsrate im Cortex der kontralateralen Niere zur Folge. Bei den älteren der untersuchten Tiere dagegen fand eine vermehrte Zellteilung in der verbleibenden Niere statt. Dieser Anstieg war besonders deutlich im Alter von 30 und 40 Wochen.

In der Medulla war die Zahl sich teilender Zellen eine Woche nach unilateraler Nephrektomie bei den 3 Wochen alten Tieren von $0,16 \pm 0,12$ ($n=12$) auf $1,48 \pm 0,52$ ($n=8$) pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ untersuchtem Gewebewolumen gestiegen ($P=0,0060$). Bei den 4 Wochen alten Tieren zeigte sich ein Anstieg von $0,32 \pm 0,17$ ($n=10$) auf $5,25 \pm 0,53$ ($n=10$; $P<0,0001$). Ohne Operation exprimierten bei den 5 Wochen alten Mäusen $0,58 \pm 0,38$ Zellen GFP ($n=10$), eine Woche post OP waren es $1,38 \pm 0,40$ ($n=8$). Die 30 Wochen alten Tiere zeigten eine Erhöhung der Zellteilungsrate von $0,32 \pm 0,19$ ($n=16$) auf $2,81 \pm 0,49$ pro

$1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ nach einer Woche ($n=6$; $P<0,0001$). Im Alter von 40 Wochen erhöhte sich die Teilungsrate von $0,28 \pm 0,12$ ($n=16$) auf $1,94 \pm 0,27$ ($n=10$; $P<0,0001$). Sie stieg bei den 50 Wochen alten Tieren von $0,69 \pm 0,20$ ($n=16$) auf $2,35 \pm 0,87$ sich teilende Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Nierenvolumen post OP ($n=8$; $P=0,0211$, Abbildung 14).

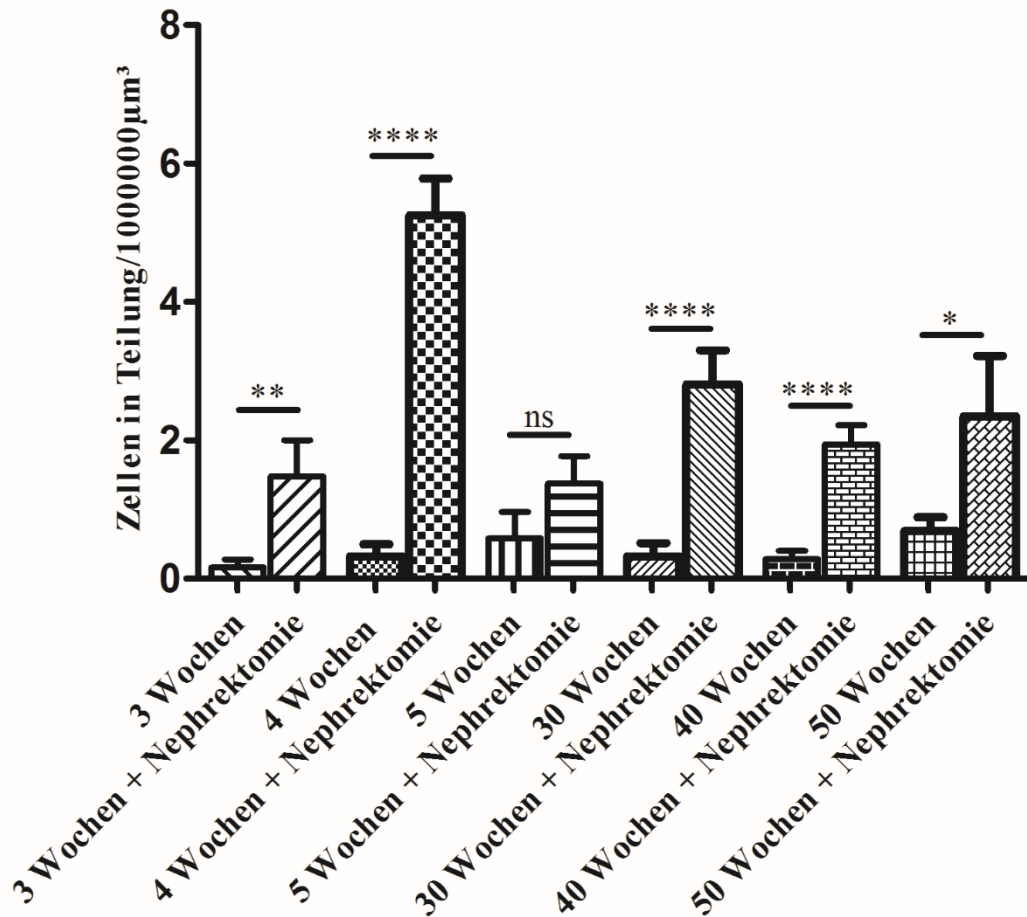


Abbildung 14: Entwicklung der Zellteilungsrate in der Medulla eine Woche nach unilateraler Nephrektomie 7 Tage nach unilateraler Nephrektomie fand in allen Altersgruppen vermehrt Zellteilung in der Medulla statt. Nur die 5 Wochen alten Tiere zeigten keine Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe (* zeigt $P=0,0211$; ** zeigt $P=0,0060$; **** zeigt $P<0,0001$).

Außer im Alter von 5 Wochen hatte eine unilaterale Nephrektomie immer eine vermehrte Zellteilung in der Medulla der verbleibenden Niere zur Folge. Die beobachteten Veränderungen im Nierenmark waren besonders deutlich im Alter von 4, 30 und 40 Wochen.

Zur weiteren Differenzierung wurde als nächstes gesondert die Teilungsrate der interstitiellen Zellen in der Niere untersucht. Bei den 3 Wochen alten Tieren blieb die

Zahl sich teilender Zellen im Interstitium gleich ($0,09 \pm 0,04$ pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Nierengewebe ($n=36$) ohne Nephrektomie vs. $0,17 \pm 0,08$ ($n=24$) 7 d post OP). In der Gruppe der 4 Wochen alten Mäuse stieg die Zahl sich teilender Zellen von $0,30 \pm 0,08$ ($n=30$) auf $1,13 \pm 0,21$ ($n=30$; $P=0,0006$). Die 5 Wochen alten Tiere zeigten wiederum nicht vermehrt GFP-positive Zellen post OP ($0,05 \pm 0,03$ ($n=30$) vorher vs. $0,18 \pm 0,09$ ($n=24$) nachher). Bei den älteren Tieren war in jeder Gruppe ein Anstieg der Zahl sich teilender interstitieller Zellen post OP zu verzeichnen (30 Wochen $0,09 \pm 0,05$ ($n=48$) vorher vs. $0,56 \pm 0,24$ ($n=18$) nachher ($P=0,0081$); 40 Wochen $0,12 \pm 0,05$ ($n=48$) vorher vs. $0,44 \pm 0,14$ ($n=30$) nachher ($P=0,0137$); 50 Wochen $0,18 \pm 0,07$ ($n=48$) vorher vs. $0,72 \pm 0,33$ ($n=24$) nachher ($P=0,0339$, Abbildung 15)).

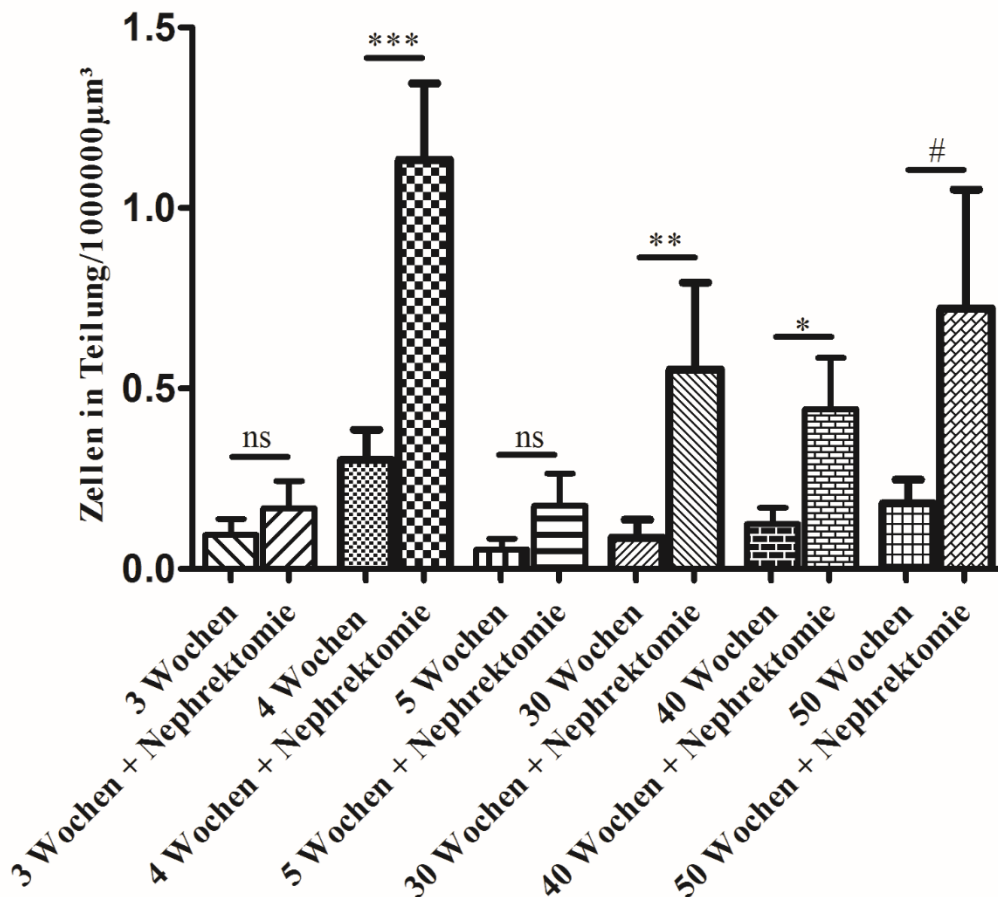


Abbildung 15: Entwicklung der Zellteilungsaktivität im Interstitium eine Woche nach unilateraler Nephrektomie Die Proliferationsrate der Zellen im Interstitium war eine Woche post OP erhöht. Keine Unterschiede zeigten sich bei 3 und 5 Wochen alten Tieren (* zeigt $P=0,0137$; ** zeigt $P=0,0081$; *** zeigt $P=0,0006$; # zeigt $P=0,0339$).

Auch das Interstitium wurde zusätzlich noch in Cortex und Medulla unterteilt, um die beobachteten Unterschiede näher einzugrenzen.

Im Interstitium des Cortex war die Zahl GFP-positiver Zellen bei 3 Wochen alten Tieren nach der Nephrektomie gleich der der Kontrollgruppe ($0,12 \pm 0,07$ post Nephrektomie (n=16) vs. $0,06 \pm 0,03$ ohne OP (n=24)). Bei den 4 Wochen alten Tieren stieg die Zahl sich teilender Zellen 7 Tage nach unilateraler Nephrektomie im Vergleich zur nicht operierten Kontrollgruppe ($1,02 \pm 0,27$ post OP (n=20) vs. $0,39 \pm 0,11$ ohne OP (n=20; $P=0,0354$)). Bei allen anderen untersuchten Gruppen zeigte sich nach der Nephrektomie kein Unterschied in der Teilungsrate der Zellen des Interstitiums im Cortex (5 Wochen $0,05 \pm 0,03$ vorher (n=20) vs. $0,06 \pm 0,04$ nachher (n=16); 30 Wochen $0,02 \pm 0,02$ vorher (n=32) vs. $0,09 \pm 0,06$ nachher (n=12); 40 Wochen $0,05 \pm 0,03$ vorher (n=32) vs. $0,05 \pm 0,03$ nachher (n=20); 50 Wochen $0,03 \pm 0,02$ vorher (n=32) vs. $0,03 \pm 0,03$ nachher (n=16) Abbildung 16).

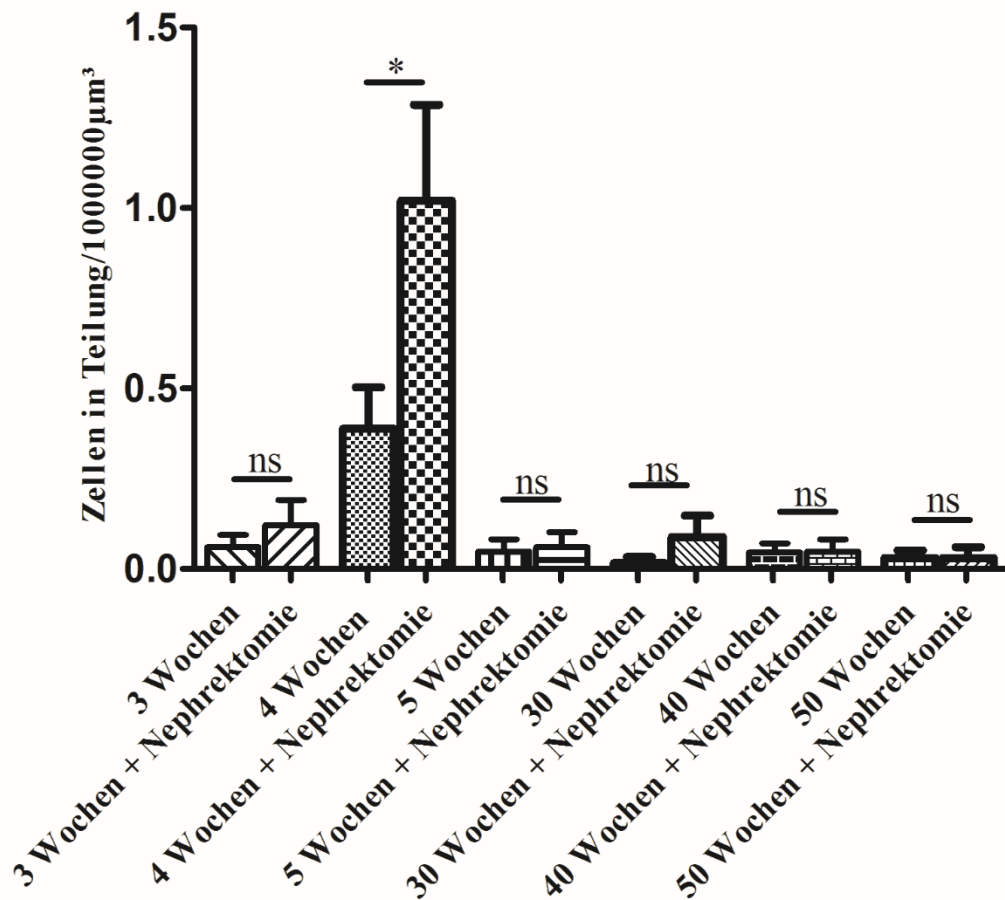


Abbildung 16: Entwicklung der Zellteilungsaktivität im Interstitium des Cortex eine Woche nach unilateraler Nephrektomie Im Cortex war die Proliferationsrate interstitieller Zellen eine Woche nach unilateraler Nephrektomie nur bei den 4 Wochen alten Tieren erhöht. In allen anderen Gruppen blieb die Zahl sich teilender Zellen konstant (* zeigt $P=0,0354$).

Im Interstitium der Medulla blieb die Zahl GFP-positiver Zellen bei den 3 Wochen alten Tieren eine Woche post OP unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,16 \pm 0,12$ vorher ($n=12$) vs. $0,28 \pm 0,19$ Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Gewebe nachher ($n=8$)). Bei den 4 Wochen alten Tieren stieg sie von $0,13 \pm 0,09$ ohne Operation ($n=10$) auf $1,36 \pm 0,35$ 7 Tage post OP ($n=10$; $P=0,0034$). Im Alter von 5 Wochen hatte die unilaterale Nephrektomie keine erhöhte Zellteilungsaktivität in der kontralateralen Niere zur Folge ($0,06 \pm 0,06$ vorher ($n=10$) vs. $0,40 \pm 0,24$ nachher ($n=8$)). Die älteren untersuchten Gruppen zeigten jeweils eine signifikant erhöhte Zellteilungsrate eine Woche nach der Operation verglichen mit der nicht operierten Kontrollgruppe (30 Wochen $0,23 \pm 0,15$ vorher ($n=16$) vs. $1,40 \pm 0,54$ nachher ($n=6$; $P=0,0102$); 40 Wochen $0,28 \pm 0,11$ vorher ($n=16$) vs.

1,23±0,30 nachher (n=10; P=0,0022); 50 Wochen 0,49±0,17 vorher (n=16) vs. 2,11±0,81 nachher (n=8; P=0,0147) Abbildung 17)).

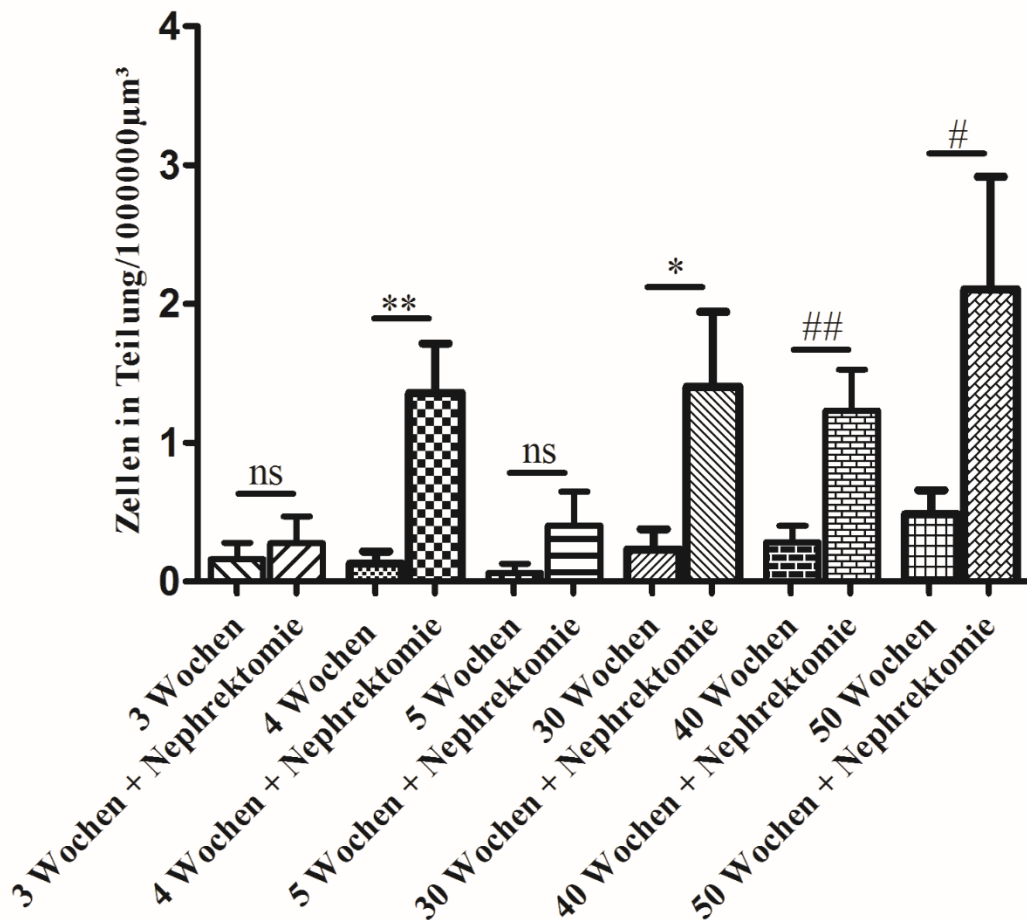


Abbildung 17: Entwicklung der Zellteilungsaktivität im Interstitium der Medulla eine Woche nach unilateraler Nephrektomie In der Medulla war die Proliferationsrate interstitieller Zellen bei den 4, 30, 40 und 50 Wochen alten Mäusen signifikant erhöht. Bei den 3 und 5 Wochen alten Tieren war sie post OP unverändert (* zeigt P=0,0102; ** zeigt P=0,0034; # zeigt P=0,0147; ## zeigt P=0,0022).

Betrachtet man das gesamte Organ, zeigt sich eine Woche nach Entnahme der linken Niere unabhängig vom Alter der untersuchten Tiere eine erhöhte Zellteilungsrate in der verbleibenden rechten Niere. Lediglich die 3 Wochen alten Mäuse, die die jüngste der untersuchten Gruppen darstellen, bilden eine Ausnahme. Hier zeigt sich post OP keine Veränderung. In den älteren Versuchsgruppen (30, 40 und 50 Wochen) spiegeln sich die Ergebnisse bei getrennter Betrachtung von Cortex und Medulla in beiden Zonen der Niere entsprechend denen der ganzen Niere wider. Bei den jüngeren Tieren beschränken sich die Veränderungen jedoch nur auf das Innere der Niere. Im Cortex hat eine unilaterale Nephrektomie keine Änderung der Zellteilungsrate zur Folge. Bei gesonderter

Betrachtung des Interstitiums fällt eine erhöhte Teilungsrate eine Woche post OP bei allen Gruppen auf, eine Ausnahme bilden die 3 und 5 Wochen alten Tiere. Diese im gesamten Interstitium beobachteten Veränderungen spiegeln sich so auch im Interstitium des Nierenmarkes wieder. Im Cortex dagegen lässt sich der Anstieg der Zellteilungsrate im Interstitium lediglich bei den 4 Wochen alten Tieren erkennen.

4.3.2 Untersuchungszeitpunkte post OP

Die bisher beschriebenen Befunde wurden nach einer Wartezeit von 7 Tagen nach unilateraler Nephrektomie erhoben. Um zu untersuchen, inwieweit die Veränderungen der Zellteilungsaktivität in der verbleibenden Niere vom Abstand des Untersuchungszeitpunktes zum Zeitpunkt der Operation abhängen, wurden zusätzlich Tiere nach einer Wartezeit von 5 bzw. 14 Tagen post OP untersucht (Abbildung 18).

5 Tage nach unilateraler Nephrektomie waren $0,96 \pm 0,21$ ($n=18$) Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Nierengewebe GFP-positiv, nach 7 Tagen waren es $0,63 \pm 0,14$ ($n=12$) und nach 14 Tagen $1,53 \pm 0,33$ ($n=12$).

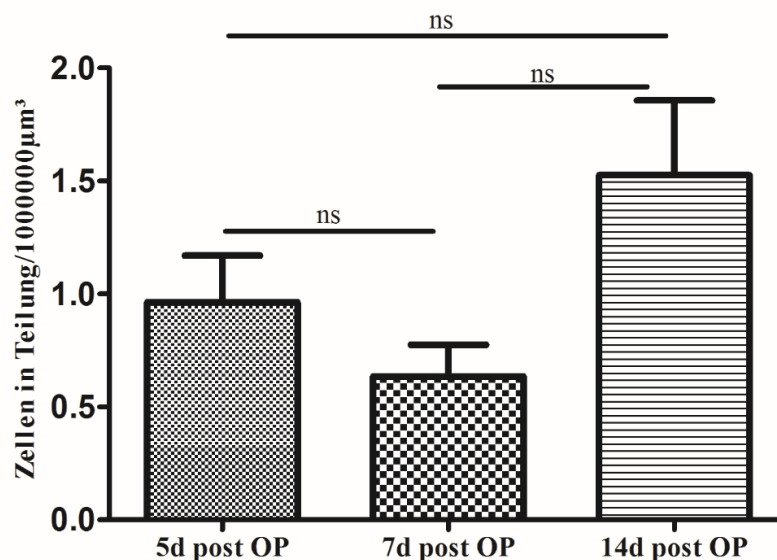


Abbildung 18: Zellteilungsaktivität in der Niere zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach unilateraler Nephrektomie 5, 7 und 14 Tage post OP unterscheidet sich die Proliferationsrate in der Niere nicht.

Eine gesonderte Betrachtung der Nierenrinde ergab nach 5 Tagen $1,01 \pm 0,30$ sich teilende Zellen ($n=12$), nach 7 Tagen $0,55 \pm 0,19$ ($n=8$) und nach 14 Tagen $1,40 \pm 0,31$ ($n=8$). In der Medulla waren 5 Tage post OP $0,86 \pm 0,22$ Zellen GFP-positiv ($n=6$), 7 Tage post OP waren es $0,81 \pm 0,16$ ($n=4$) und 14 Tage post OP $1,78 \pm 0,85$ ($n=4$) Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Gewebe. Dargestellt ist dies in Abbildung 19.

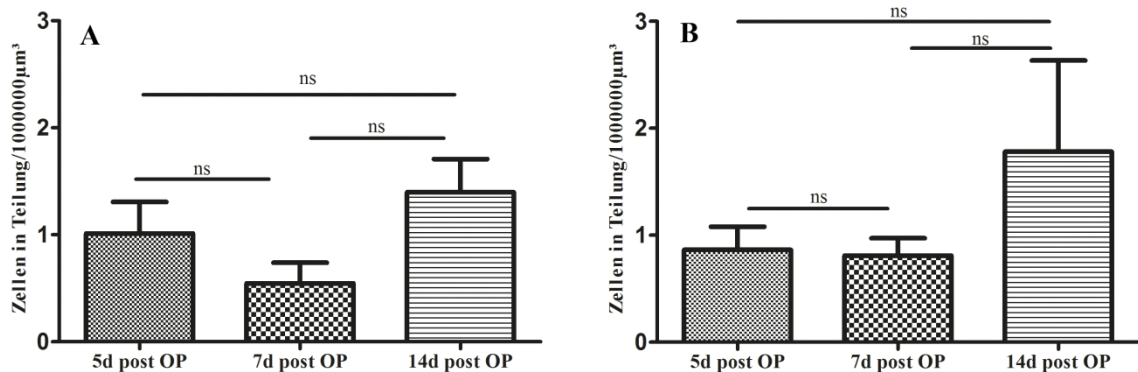


Abbildung 19: Zerteilungsaktivität in Cortex (A) und Medulla (B) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach unilateraler Nephrektomie Sowohl im Cortex (A) als auch in der Medulla (B) gab es keine Unterschiede in der Proliferationsrate nach 5, 7 und 14 Tagen post OP.

Innerhalb des in dieser Arbeit betrachteten Zeitraums zwischen 5 und 14 Tagen nach der unilateralen Nephrektomie zeigen sich keine Unterschiede in der Zellteilungsaktivität der kontralateralen Niere. Die Zeit post OP spielt in diesem Intervall keine Rolle.

4.3.3 Gewichtsentwicklung der kontralateralen Niere

Um die in der Literatur beschriebene Gewichtszunahme der kontralateralen Niere nach unilateraler Nephrektomie zu überprüfen, wurde das Gewicht der verbleibenden Niere nach 5, 7 und 14 Tagen post OP erfasst. Aufgrund der großen Gewichtsunterschiede zwischen den Nieren der männlichen und denen der weiblichen Tiere wurden beide Geschlechter getrennt voneinander betrachtet.

Das Gewicht der getrockneten Nieren der weiblichen Tiere betrug basal $37,88 \pm 1,11$ mg ($n=13$), 5 Tage nach der OP $47,67 \pm 2,00$ mg ($n=3$), 7 Tage danach $43,87 \pm 3,15$ mg ($n=3$) und 14 Tage post OP $53,4 \pm 0,56$ mg ($n=3$). Bei den männlichen Mäusen wogen die Nieren basal $61,35 \pm 1,95$ mg ($n=11$), 5 Tage post OP $67,35 \pm 1,25$ mg ($n=2$), 7 Tage post OP $75,47 \pm 4,17$ mg ($n=3$) und 14 Tage post OP $77,8 \pm 6,92$ mg ($n=3$, Abbildung 20).

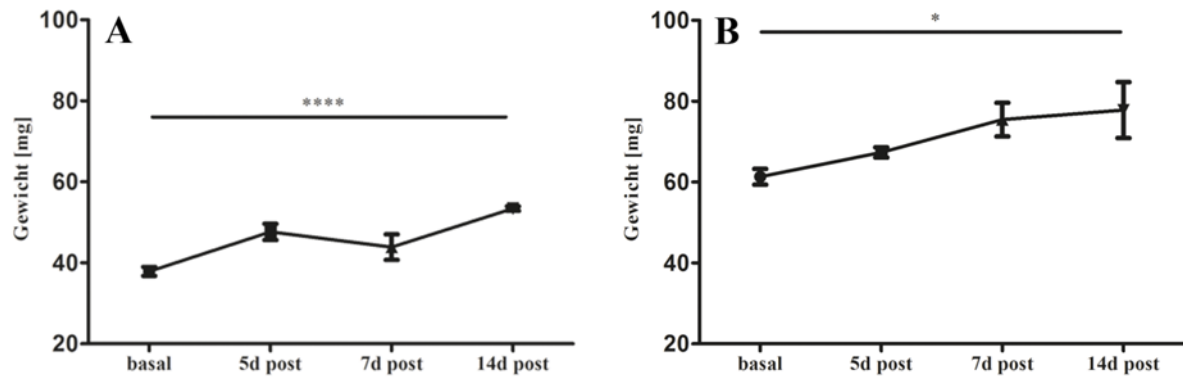


Abbildung 20: Entwicklung des Trockengewichtes der kontralateralen Niere nach unilateraler Nephrektomie Sowohl bei den weiblichen Tieren (A) als auch bei den männlichen Tieren (B) war das Trockengewicht der verbleibenden Niere 14 Tage post OP signifikant erhöht im Vergleich zu dem der bei der unilateralen Nephrektomie entfernten Niere (* zeigt $P \leq 0,05$; **** zeigt $P < 0,0001$).

Sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren hat eine unilaterale Nephrektomie einen Anstieg des Trockengewichtes der kontralateralen Niere innerhalb von 14 Tagen zur Folge.

4.4 Unilaterale Nephrektomie in Kombination mit ACE-Hemmer und salzarmer Diät

Da die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche zeigen, dass sowohl die Behandlung mit einem ACE-Hemmer in Kombination mit einer salzarmen Diät, als auch die unilaterale Nephrektomie einen Einfluss auf die Zellteilungsrate in der Niere haben, wurden die beiden Versuchsansätze als nächstes miteinander kombiniert. Eine Versuchsgruppe wurde bereits 7 Tage vor Durchführung der Operation mit Enalapril und der salzarmen Diät behandelt, die zweite Gruppe bekam beides ab dem Tag der Nephrektomie und bei der dritten Gruppe wurde lediglich eine unilaterale Nephrektomie durchgeführt, ohne dass die Tiere einer zusätzlichen Behandlung unterzogen wurden. Anschließend wurde mittels der Detektion des in der S-, G₂- und M-Phase des Zellzyklus exprimierten GFP die Proliferationsrate in den Nieren untersucht.

4.4.1 Zellteilungsaktivität nach unilateraler Nephrektomie in Kombination mit ACE-Hemmer und salzarter Diät

Bei den Tieren, die bereits eine Woche vor der unilateralen Nephrektomie mit Enalapril behandelt wurden und zusätzlich eine salzarme Diät erhielten, waren 7 Tage nach der Operation in der kontralateralen Niere $0,86 \pm 0,25$ Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Nierengewebe GFP-positiv ($n=18$), bei den ab der Nephrektomie behandelten Tieren waren es $1,24 \pm 0,35$ Zellen ($n=18$). Die abgesehen von der Nephrektomie unbehandelten Tiere wiesen $3,82 \pm 0,75$ GFP-positive Zellen pro definiertem Gewebavolumen auf ($n=12$; Abbildung 22).

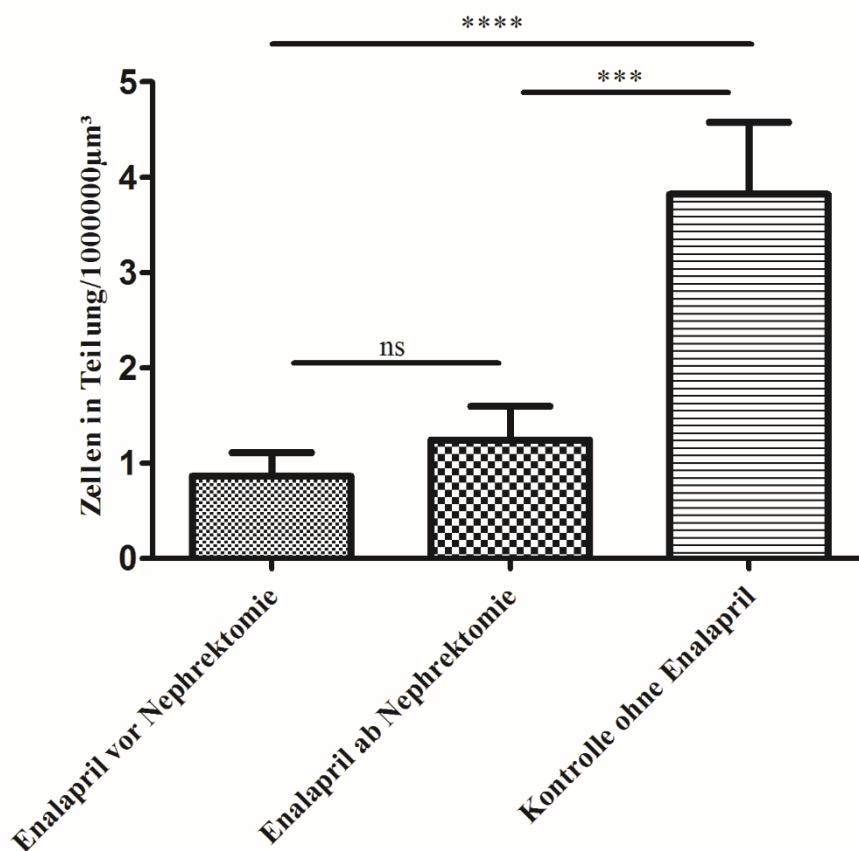


Abbildung 21: Proliferationsrate in der Niere 7 Tage nach unilateraler Nephrektomie Die Zellteilungsaktivität war bei den mit Enalapril und salzarter Diät behandelten Tieren signifikant niedriger als bei den unbehandelten Tieren. Zwischen den bereits vor und den ab der OP behandelten Tieren bestand kein Unterschied (***) zeigt $P \leq 0,001$; **** zeigt $P < 0,0001$).

In den Nieren der Tiere, die keinen ACE-Hemmer und normales Futter bekommen haben, teilten sich 7 Tage nach unilateraler Nephrektomie mehr Zellen, als bei den Tieren, die zusätzlich wie beschrieben behandelt wurden ($P \leq 0,001$ zwischen den ab der OP

behandelten und den unbehandelten Tieren; $P < 0,0001$ zwischen den vor der OP behandelten und den unbehandelten Tieren). Es bestand kein Unterschied in der Zellteilungsrate bei unterschiedlicher Behandlungsdauer.

Wie bei den bisher beschriebenen Versuchen wurde auch hier eine Unterteilung in Cortex und Medulla vorgenommen.

Im Cortex teilten sich bei den vor der Operation bereits behandelten Tieren 7 Tage post OP $0,97 \pm 0,32$ Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ Gewebe ($n=12$), bei den ab der Operation behandelten Tieren waren es $1,70 \pm 0,47$ ($n=12$) und bei den normal gefütterten Tieren $2,49 \pm 0,55$ ($n=8$).

In der Medulla waren in der ersten Gruppe $0,65 \pm 0,41$ Zellen GFP-positiv ($n=6$), in der zweiten Gruppe $0,32 \pm 0,22$ ($n=6$) und in der dritten $6,48 \pm 1,15$ Zellen pro $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ ($n=4$, Abbildung 23).

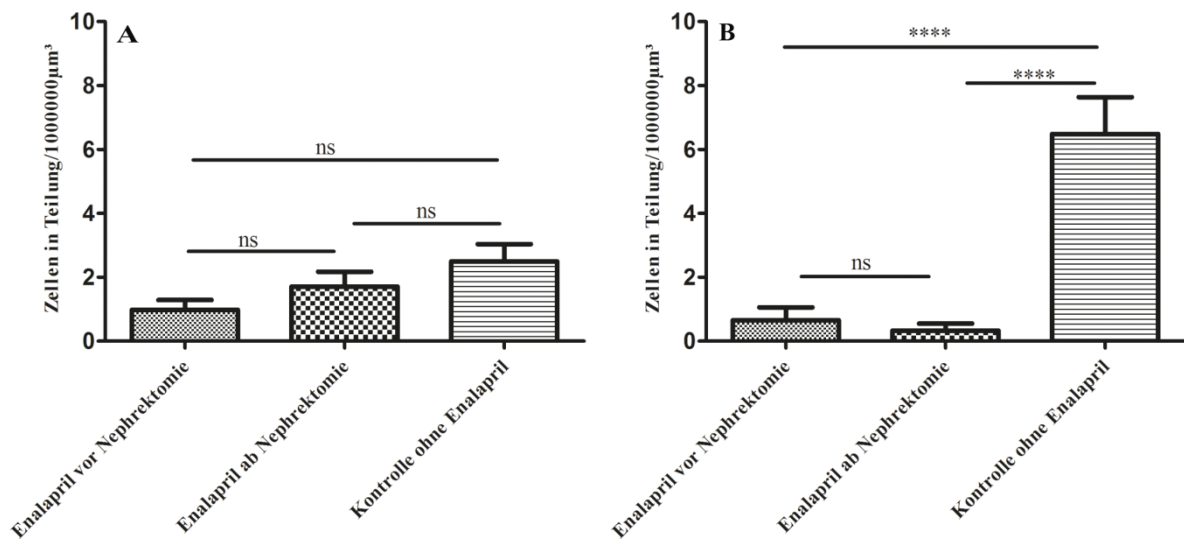


Abbildung 22: Zellteilung in Cortex (A) und Medulla (B) 7 Tage nach unilateraler Nephrektomie Im Cortex gab es keine Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen den einzelnen Gruppen. In der Medulla fand bei den Tieren nach Nephrektomie ohne zusätzliche Behandlung signifikant mehr Zellteilung statt als bei den mit Enalapril und Low Salt Diät behandelten. Die Behandlungsdauer hatte keinen Einfluss (**** zeigt $P < 0,0001$).

In der Nierenrinde gab es keinen Unterschied in der Zellteilungsrate zwischen den Nieren der einzelnen Versuchsgruppen. Im Mark dagegen war die Zellteilungsrate 7 Tage nach

Nephrektomie bei den mit Enalapril und Low Salt behandelten Tieren niedriger als bei den Tieren ohne zusätzliche Behandlung, ohne dass die Dauer der Behandlung einen Einfluss auf die Proliferationsrate hatte.

Eine Behandlung mit dem ACE-Hemmer Enalapril und zusätzlicher Fütterung einer salzarmen Diät führt zu einer erniedrigten Zellteilungsrate in der kontralateralen Niere nach unilateraler Nephrektomie im Vergleich zu Tieren, die ausschließlich der Operation unterzogen wurden. Ein Einfluss der Behandlungsdauer ist nicht ersichtlich. Eine Aufteilung von Cortex und Medulla macht deutlich, dass sich diese Unterschiede nur im Nierenmark zeigen, während in der Nierenrinde keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bestehen.

4.4.2 Zellteilungsaktivität nach unilateraler Nephrektomie in Kombination mit ACE-Hemmer ohne Fütterung einer salzarmen Diät

Um zu klären, ob der ACE-Hemmer alleine, ohne die zusätzliche Futterumstellung, die Zellteilungsrate in der Niere nach unilateraler Nephrektomie beeinflusst, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, für den ein Teil der Tiere zwar mit dem ACE-Hemmer behandelt wurde, wobei auf die salzarme Diät verzichtet wurde. Stattdessen bekamen die Tiere ihr gewohntes Futter ad libitum zur Verfügung gestellt. Verglichen wurde die Zahl GFP-positiver Zellen einer Versuchsgruppe, die ab der Nephrektomie mit Enalapril behandelt wurde mit der einer weiteren Gruppe, die zwar einer unilateralen Nephrektomie, nicht aber einer Behandlung mit Enalapril unterzogen wurde. Eine zusätzliche Gruppe ohne jede Behandlung diente der Kontrolle.

Die Zahl GFP-positiver Zellen betrug bei den mit Enalapril behandelten Mäusen 7 Tage nach unilateraler Nephrektomie $1,39 \pm 0,38$ pro $1 * 10^6 \mu\text{m}^3$ Nierengewebe (n=18). Bei den unbehandelten, aber operierten Tieren waren es $1,56 \pm 0,28$ (n=18) und bei den nicht operierten Kontrolltieren $0,23 \pm 0,12$ (n=12, Abbildung 24).

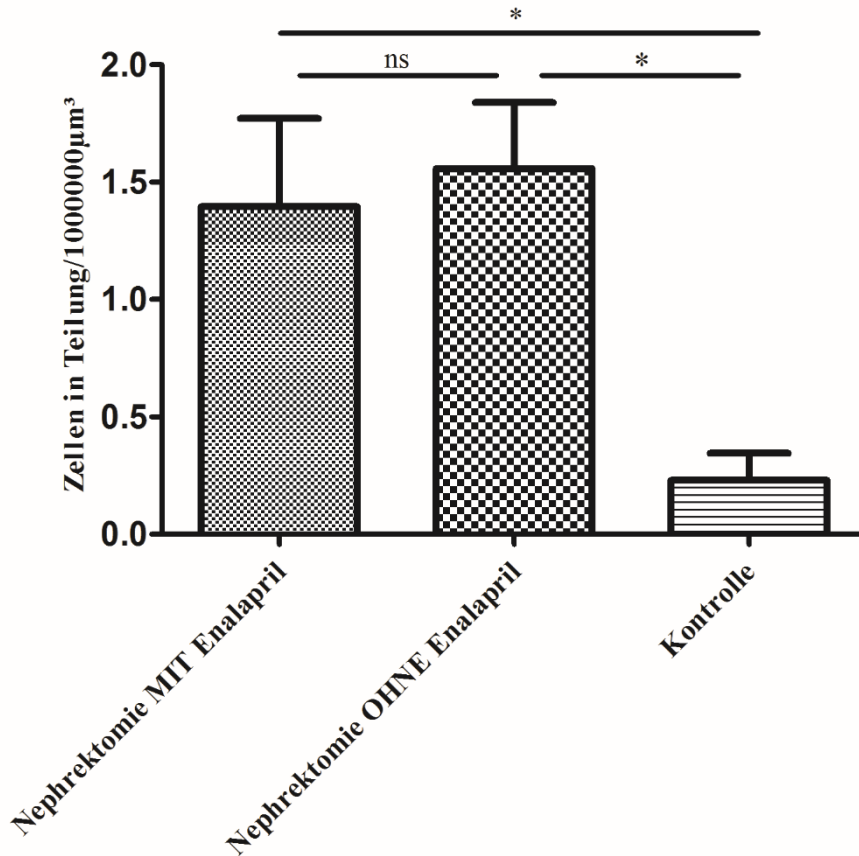


Abbildung 23: Proliferationsrate in der Niere 7 Tage nach unilateraler Nephrektomie Eine Woche nach der Nephrektomie war die Zellteilungsaktivität sowohl bei den mit Enalapril behandelten, als auch bei den unbehandelten Mäusen höher als bei den nicht operierten Kontrolltieren. Zwischen den mit dem ACE-Hemmer behandelten und den unbehandelten Tieren bestand kein Unterschied (* zeigt $P \leq 0,05$).

7 Tage nach unilateraler Nephrektomie ist die Proliferationsrate in der kontralateralen Niere erhöht. Die einwöchige Behandlung mit dem ACE-Hemmer Enalapril beeinflusst das Ausmaß dieses Anstiegs nicht.

4.5 Identifizierung der teilungsaktiven Zellen

Um einen Überblick darüber zu erlangen, welche Zellen in der Niere grundsätzlich in der Lage dazu sind, sich zu teilen, wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen durchgeführt und nach Colokalisationen der jeweiligen Färbung mit dem in den Zellen exprimierten GFP gesucht.

4.5.1 Rinde

Zunächst wurde das Augenmerk auf verschiedene Zelltypen im Cortex gelegt.

4.5.1.1 Tubulusepithelzellen

Um in Teilung befindliche Zellen im proximalen Tubulus zu identifizieren, wurde eine Megalin-Färbung durchgeführt (Abbildung 25). Megalin ist ein im proximalen Tubulus lokalisiertes Rezeptorprotein, das für die Endozytose verantwortlich ist.

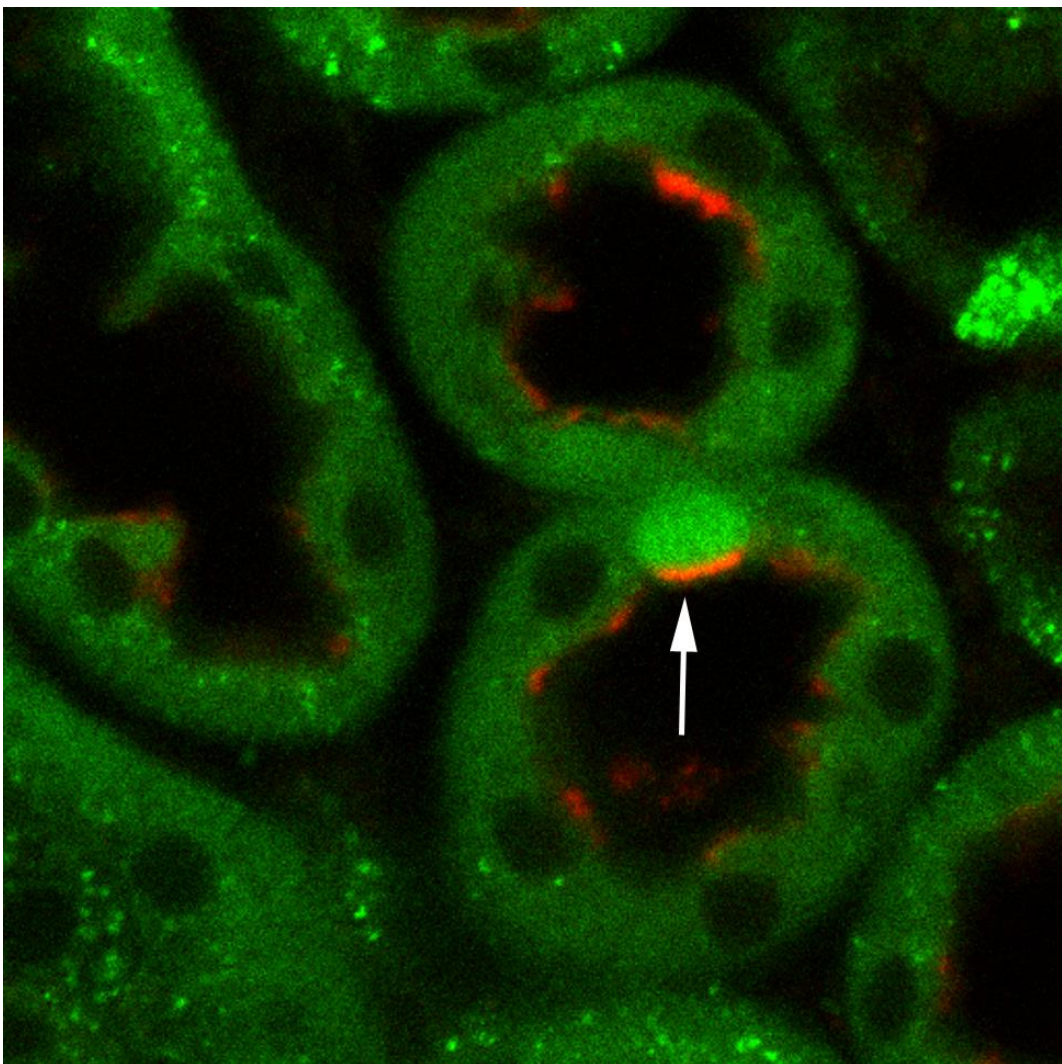


Abbildung 24: Megalin-Färbung im Nierencortex Die Färbung gegen das Rezeptorprotein Megalin in der Niere einer Pdk1-Cyclin B1-GFP transgenen Maus ist in rot dargestellt. Es gibt zahlreiche Überlagerungen mit von den Zellen exprimiertem und in grün dargestelltem GFP (Pfeil).

Zahlreiche GFP-positive und damit in der Teilung befindliche Zellen zeigten eine Überlagerung mit der Megalin-Färbung.

Epithelzellen des distalen Tubulus wurden mit Hilfe einer pNCC-Färbung identifiziert (Abbildung 26). Hierbei handelt es sich um einen im distalen Tubulus lokalisierten NaCl-Cotransporter.



Abbildung 25: pNCC-Färbung im Nierencortex Die Färbung gegen den NaCl-Cotransporter in der Niere einer Pdk1-Cyclin B1-GFP transgenen Maus ist in rot dargestellt. Der Pfeil deutet auf eine Colokalisation von GFP (grün) und pNCC.

Im distalen Tubulus zeigten GFP-positive Zellen Colokalisationen mit pNCC.

Sowohl Epithelzellen des proximalen, als auch des distalen Tubulus sind in der Lage, in die S-, G2- oder M-Phase des Zellzyklus einzutreten.

4.5.1.2 Corticale Fibroblasten

Die Teilungsfähigkeit von Fibroblasten im Cortex wurde durch eine SGCalpha1-Färbung überprüft (Abbildung 27). SGC steht für „soluble guanylyl cyclase“, es handelt sich um einen in den corticalen Fibroblasten lokalisierten NO-Rezeptor.

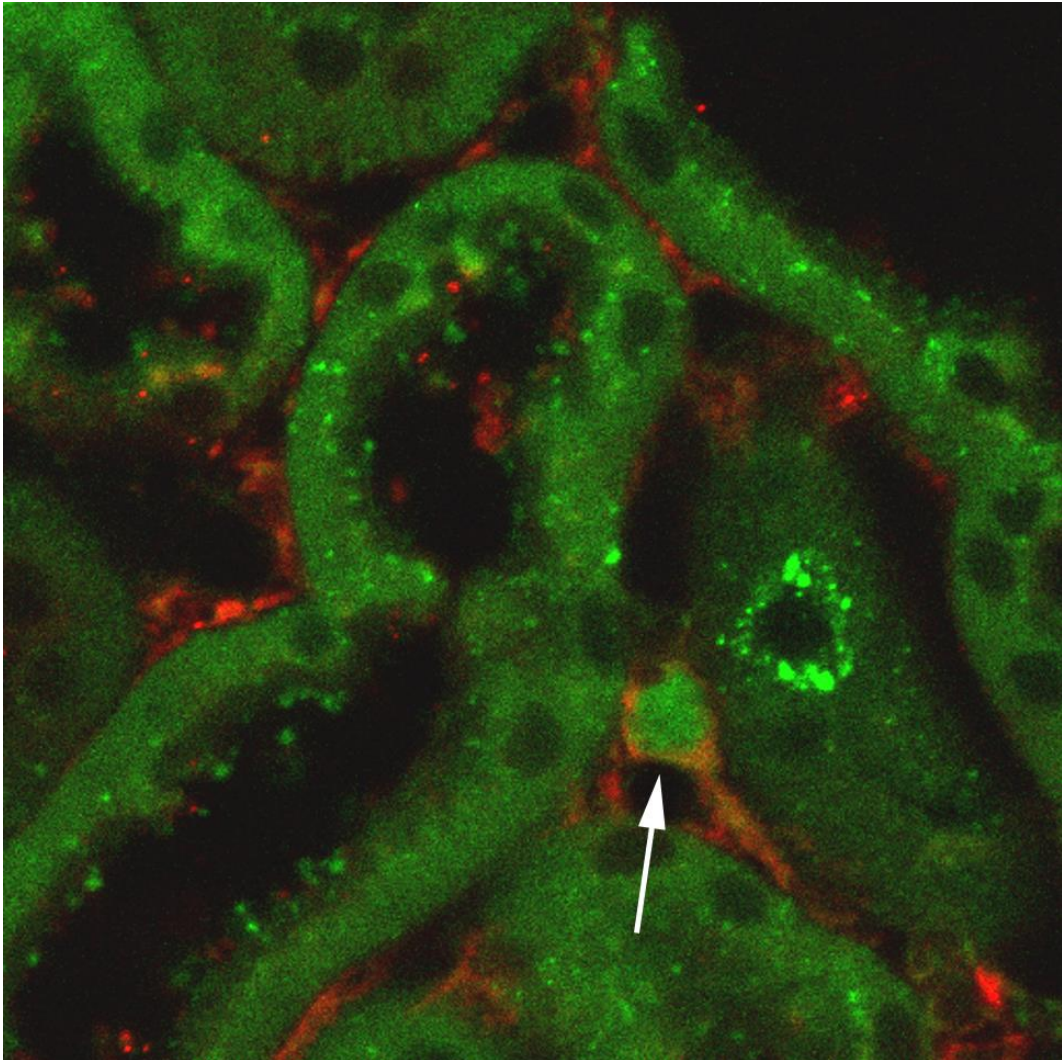


Abbildung 26: SGCalpha1-Färbung im Nierencortex Die Färbung gegen den NO-Rezeptor SGCalpha1 in der Niere einer Pdgfra-Cyelin B1-GFP transgenen Maus ist in rot dargestellt. Der Pfeil deutet auf eine Überlagerung mit einer GFP-exprimierenden Zelle.

Auch in corticalen Fibroblasten wurden Colokalisationen mit GFP gefunden.

4.5.1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen wurden mit dem Marker CD11c dargestellt (Abbildung 28). Bei diesen Zellen handelt es sich um antigenpräsentierende Zellen.

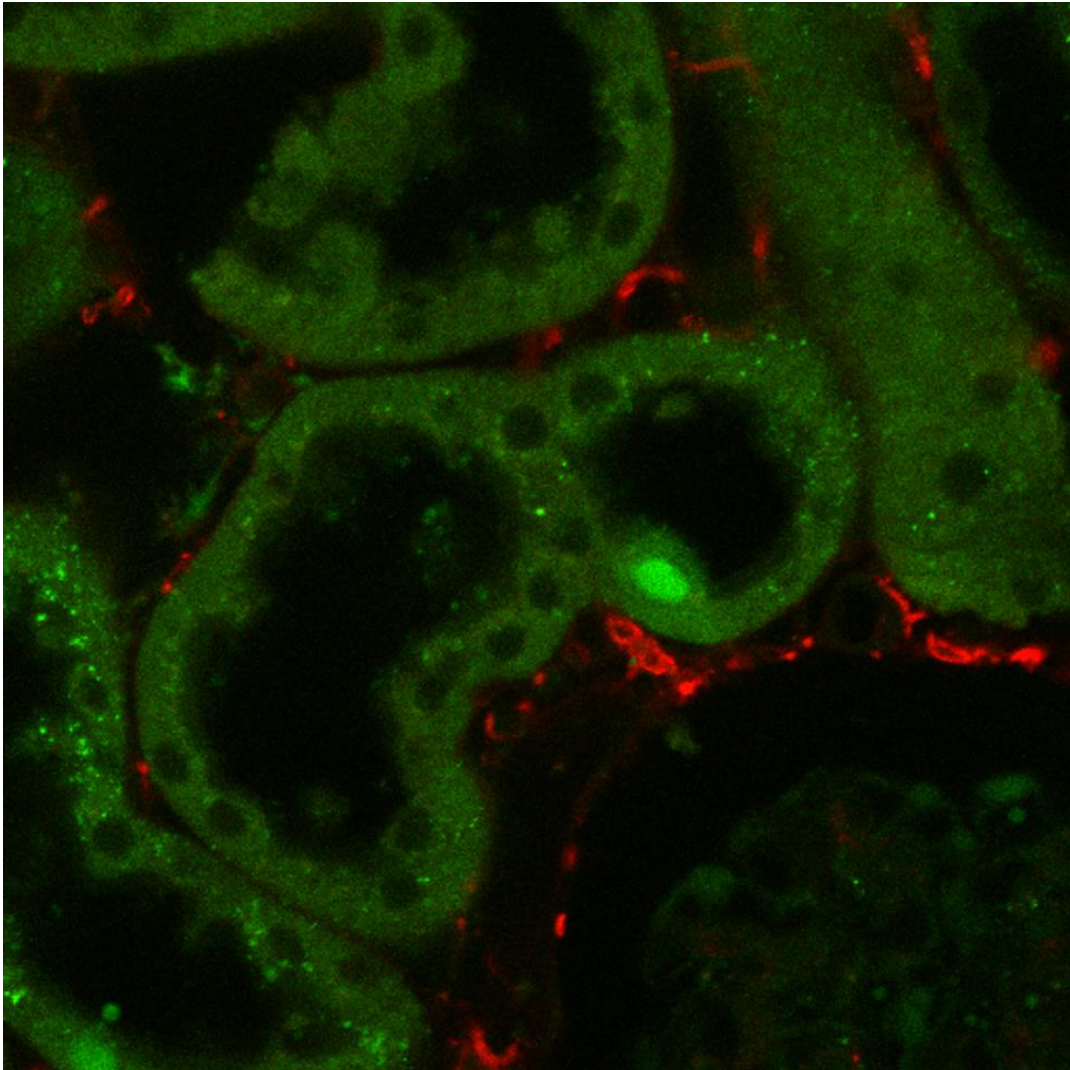


Abbildung 27: CD11c-Färbung im Nierencortex Es zeigten sich keine Colokalisationen von CD11c-positiven (rot) und GFP-positiven (grün) Zellen in den Nieren Pgk1-Cyclin B1-GFP transgener Mäuse.

Es konnten keine in Teilung befindlichen dendritischen Zellen detektiert werden.

Von den im Cortex untersuchten Zelltypen sind Epithelzellen des proximalen und des distalen Tubulus in der Lage zu proliferieren. Auch corticale Fibroblasten verfügen über diese Fähigkeit. Kein Teilungspotential zeigen dendritische Zellen des Cortex.

4.5.2 Mark

Auch in der Medulla wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen durchgeführt, um das Teilungspotential der verschiedenen Zelltypen zu ermitteln.

4.5.2.1 Sammelrohr

Um zu überprüfen, ob die im Sammelrohr lokalisierten Zellen zur Zellteilung fähig sind, wurde zunächst eine Aquaporin2-Färbung durchgeführt (Abbildung 29). Aquaporin 2 wird von den Hauptzellen im Sammelrohr ausgebildet.

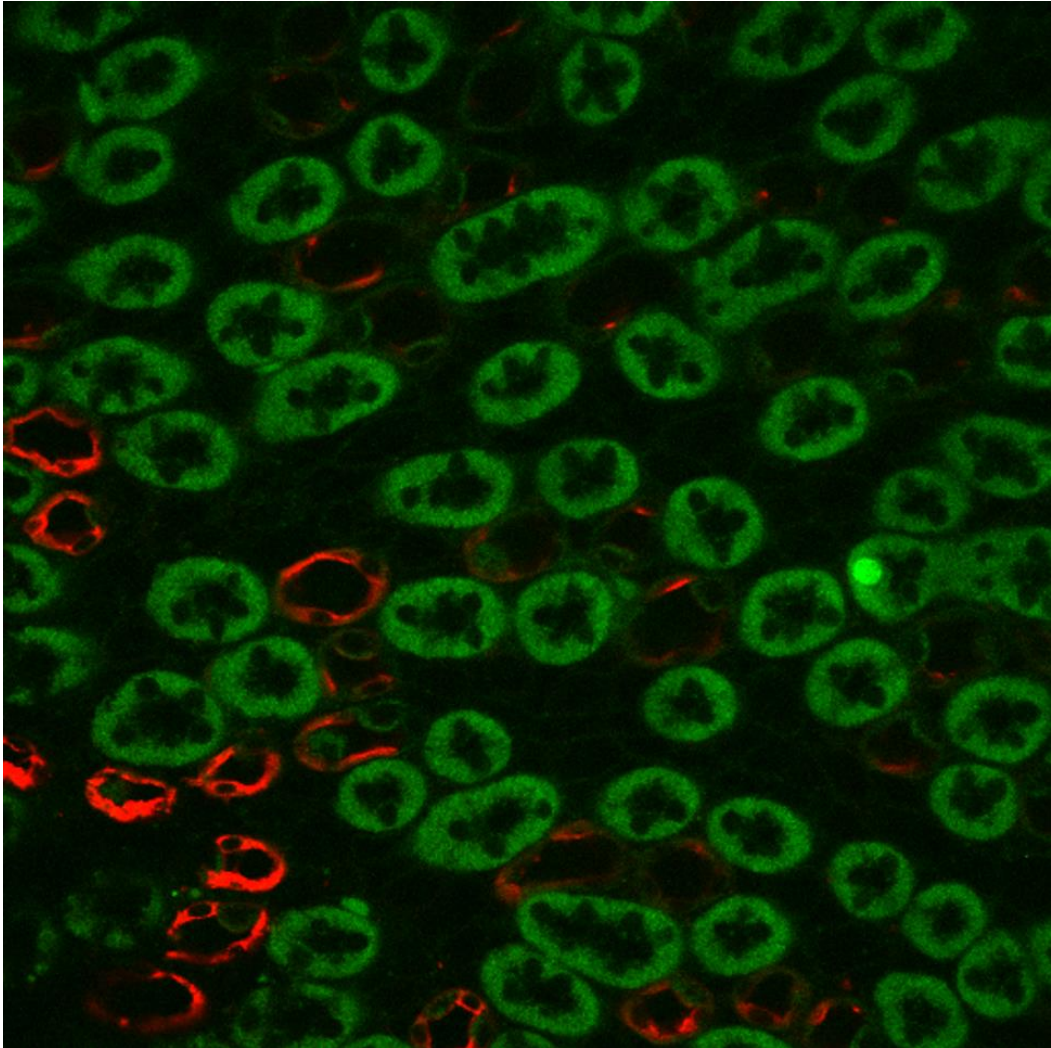


Abbildung 28: Aquaporin2-Färbung in der Medulla Die Färbung gegen Aquaporin2 in der Niere einer P_{gk1}-Cyclin B1-GFP transgenen Maus ist in rot dargestellt. Keine der so als Hauptzellen identifizierten Zellen zeigte eine Colokalisation mit GFP.

Keine der angefärbten Hauptzellen in den Sammelrohren der Niere exprimierte GFP.

Die α -Schaltzellen der Sammelrohre wurden mit Hilfe einer V-ATPase-Färbung identifiziert (Abbildung 30).

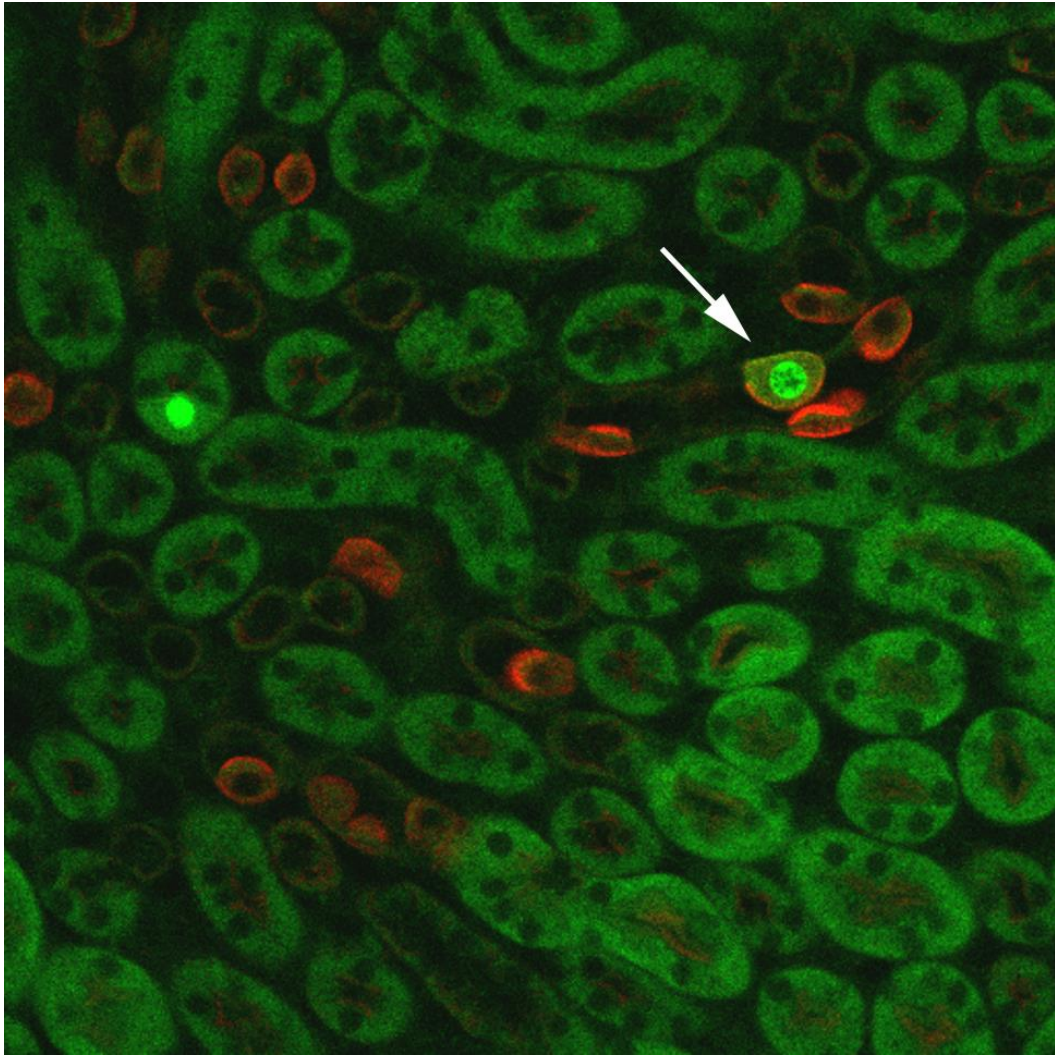


Abbildung 29: V-ATPase-Färbung in der Medulla Die V-ATPase-positiven α -Schaltzellen in der Niere einer P_{gk1}-Cyclin B1-GFP transgenen Maus sind in rot dargestellt. Der Pfeil deutet auf eine proliferierende α -Schaltzelle im Sammelrohr.

Einige der α -Schaltzellen im Sammelrohr exprimieren GFP.

Zur Untersuchung der β -Schaltzellen wurde eine Pendrin-Färbung genutzt (Abbildung 31). Pendrin ist ein im Sammelrohr lokalisierter Chlorid-Bicarbonat-Austauscher.

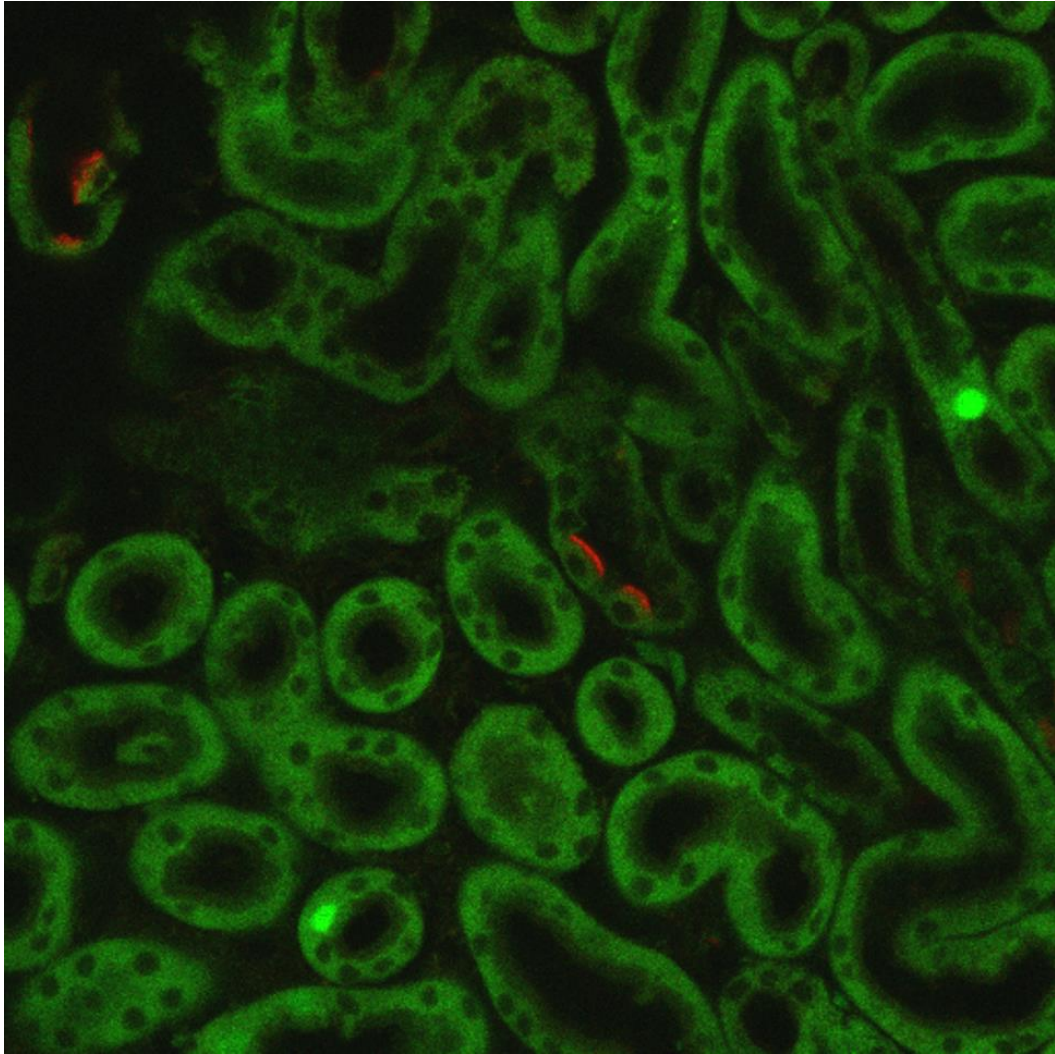


Abbildung 30: Pendrin-Färbung in der Medulla Die angefärbten β -Schaltzellen in der Niere einer Pgc1-Cyclin B1-GFP transgenen Maus sind in rot dargestellt. Keine dargestellten β -Schaltzellen exprimieren GFP (grün).

Es konnten keine in Teilung befindlichen β -Schaltzellen identifiziert werden.

4.5.2.2 Henle-Schleife

Weiterhin wurde eine Färbung gegen den Na-K-2Cl-Cotransporter NKCC2 durchgeführt (Abbildung 32). Dies diente dazu, Zellen im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife auf Zellteilungsaktivität zu untersuchen.

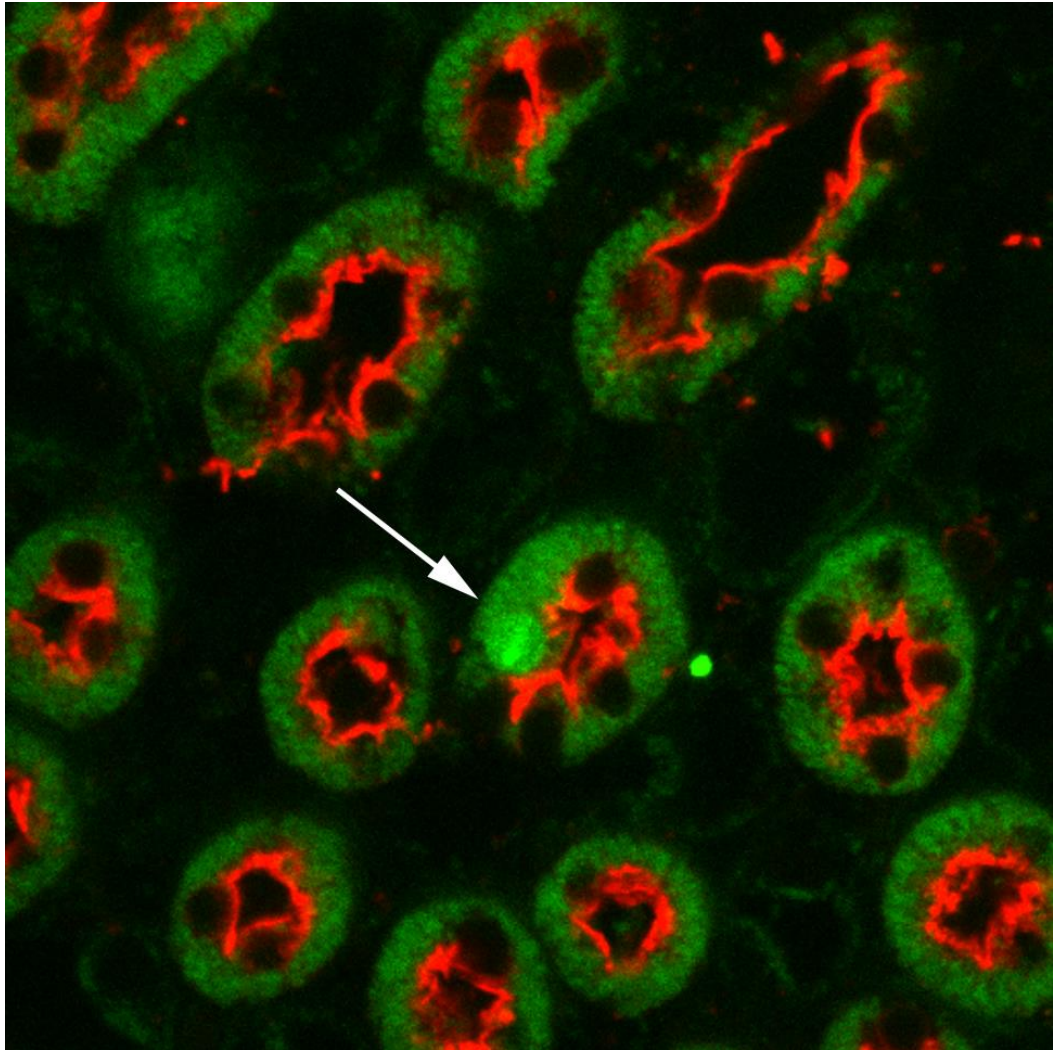


Abbildung 31: NKCC2-Färbung in der Medulla NKCC2-positive Zellen im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife (rot) in den Nieren Pgc1-Cyclin B1-GFP transgener Mäuse exprimieren häufig GFP (grün, Pfeil).

Viele der durch die NKCC2-Färbung identifizierten Zellen im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife zeigten Zellteilungsaktivität.

In der Medulla zeigen Haupt- und α -Schaltzellen im Sammelrohr Zellteilungsaktivität. Auch Zellen im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife exprimieren GFP. Bei β -Schaltzellen konnte keine Zellteilung nachgewiesen werden.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Zellen, die in der vorliegenden Arbeit als grundsätzlich fähig zur Proliferation identifiziert wurden.

	Colokalisation mit GFP	Keine Colokalisation mit GFP
Megalin (proximaler Tubulus)	X	
pNCC (distaler Tubulus)	X	
SGCa1 (corticale Fibroblasten)	X	
CD11c (dendritische Zellen)		X
AP2 (Hauptzellen Sammelrohr)		X
V-ATPase (α -Schaltzellen Sammelrohr)	X	
Pendrin (β -Schaltzellen Sammelrohr)		X
NKCC2 (Henle-Schleife)	X	

Tabelle 1: Übersicht über die angefertigten immunhistochemischen Färbungen

4.5.3 Zellteilung nach unilateraler Nephrektomie

Nachdem, wie oben beschrieben, einige Zelltypen in der Niere identifiziert wurden, die potentiell in der Lage sind, sich zu teilen, sollte als nächstes geklärt werden, welche Zelltypen nach unilateraler Nephrektomie vermehrt Teilungsaktivität zeigen. Da die erhöhte Zellteilungsaktivität besonders in der Medulla augenscheinlich war, wurde das Augenmerk zunächst auf diese Region in der Niere gerichtet.

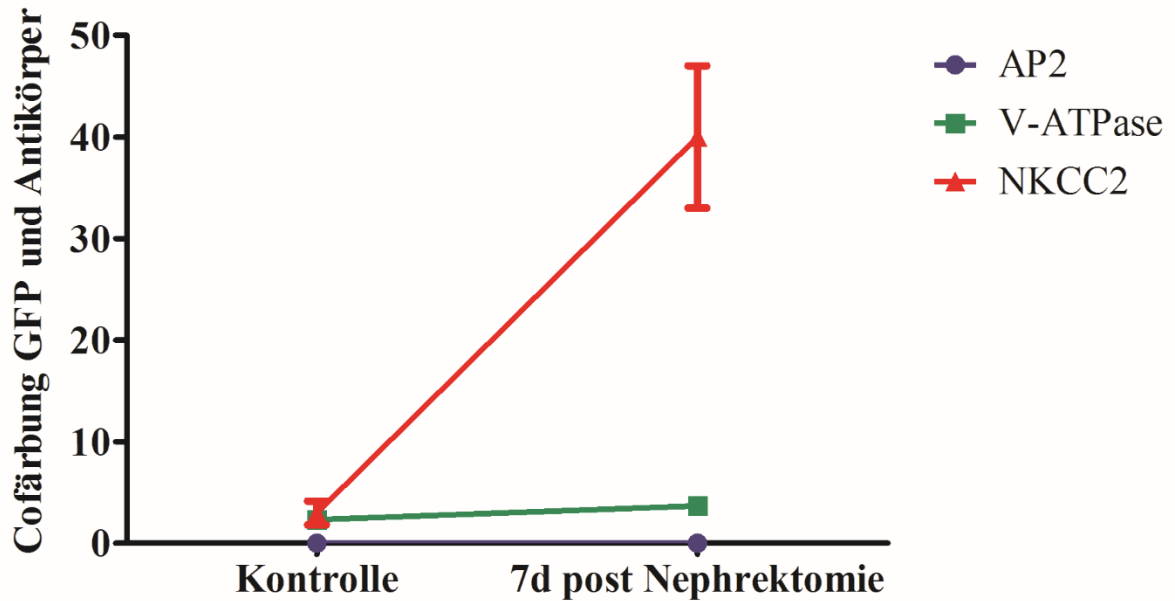


Abbildung 32: Veränderungen der Proliferationsrate von Zellen im Sammelrohr und in der Henle-Schleife nach unilateraler Nephrektomie In den Hauptzellen wurde weder vor noch nach der OP GFP exprimiert. Die α -Schaltzellen zeigten keine veränderte Proliferationsrate post OP. Die Zellteilungsaktivität in den NKCC2-positiven Zellen im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife war post OP signifikant erhöht.

Sowohl bei den nicht operierten Kontrolltieren als auch bei den 7 Tage nach unilateraler Nephrektomie untersuchten Mäusen konnte keine Zellteilungsaktivität in den Hauptzellen der Sammelrohre festgestellt werden. Die Teilungsaktivität in den α -Schaltzellen blieb nahezu gleich ($2,33 \pm 0,88$ vorher ($n=3$, entspricht der Anzahl der untersuchten Nierenschnitte) vs. $3,67 \pm 0,33$ nachher ($n=3$)). Deutlich erhöht war die Zellteilungsrate nach der Nephrektomie in den NKCC2-positiven Zellen der Henle-Schleife ($3 \pm 1,15$ vorher ($n=3$) vs. 40 ± 7 nachher ($n=3$; $P=0,0064$) Abbildung 33).

Eine unilaterale Nephrektomie führt im Nierenmark zu einem Anstieg der Zellteilungsrate im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife. In den Zellen des Sammelrohrsystems ändert sich die Teilungsaktivität nicht.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Zellteilungsaktivität in der Niere untersucht werden und hierbei besonderes Augenmerk auf den Einfluss des Alterungsprozesses, auf Möglichkeiten der pharmakologischen Beeinflussung dieser Aktivität und auf Veränderungen in Reaktion auf eine unilaterale Nephrektomie gelegt werden. Versuche, die sich mit der Proliferationsrate von Organen beschäftigen, waren bisher häufig an die Nutzung von Proliferationsmarkern gekoppelt. Dabei handelt es sich um proliferationsassoziierte Antigene, die mittels immunhistochemischer Färbungen dargestellt werden können (Schwechheimer 1990). Da es sich dabei um intrazellulär lokalisierte Marker handelt, birgt eine solche Färbung das Risiko einer Veränderung der Zellphysiologie. Die Verwendung eines noch nicht lange etablierten Mausmodells, der Pgl1-Cyclin B1-GFP transgenen Maus, ermöglichte es uns, die Zellteilung in der Niere zu untersuchen, ohne auf solche Marker zurückgreifen zu müssen. Die Tiere exprimieren GFP in allen Zellen, die die S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus durchlaufen, was die direkte Detektion dieser Zellen am Fluoreszenzmikroskop erlaubt (Klochender et al. 2012).

5.1 **Altersabhängigkeit der Zellteilungsrate**

Verglichen mit anderen Organen findet in der gesunden Niere nur wenig Zellteilung statt (Strehl et al. 2002). Hinsichtlich der Veränderung der Zellteilungsaktivität mit fortschreitendem Lebensalter gibt es in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. Grundsätzlich ist der Alterungsprozess auf zellulärer Ebene gekennzeichnet durch ein vermehrtes zu Grunde gehen der Zellen in Kombination mit einer Abnahme der Proliferationsrate (Richardson et al. 2014). Die Ergebnisse verschiedener Studien liefern bezüglich der Teilungsaktivität in der Niere in bestimmten Lebensabschnitten weit auseinander gehende Daten.

In einer Studie aus dem Jahr 2002 beispielsweise wurde die Proliferationsrate von Tubulusepithelzellen an F344-Ratten untersucht. Die mitotisch aktiven Zellen wurden hier anhand von Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) identifiziert. PCNA ist ein Protein, das an der DNA-Replikation beteiligt ist und von Zellen ausschließlich während der Teilung exprimiert wird. Eine immunhistochemische Färbung gegen dieses Antigen ermöglicht es demnach, Rückschlüsse auf die Proliferationsrate im untersuchten Gewebe zu ziehen (Juríková et al. 2016). Verglichen wurden Tiere im Alter von 4 Monaten mit 6-10 Monate alten und 23 Monate alten Ratten. Die Teilungsrate war bei den 6-10 Monate

alten Tieren deutlich höher als bei den 4 Monate alten. Im Alter von 23 Monaten war sie wieder gesunken (Cardani und Zavanella 2000).

Hinweise auf eine andere Entwicklung der Proliferationsrate liefert eine Studie aus dem Jahr 2007. Für diese Studie wurde die Aufnahme von Bromdesoxyuridin in die DNA als Marker genutzt. Mäusen verschiedener Altersstufen (5 bis 70 Wochen alt) wurde BrdU injiziert, bevor 30 Minuten später ihre Nieren entnommen und auf das Vorhandensein von Zellen untersucht wurden, die BrdU in ihre Zellen aufgenommen hatten. Im Cortex war die Zahl BrdU-positiver und somit mitotisch aktiver Zellen bei den 5 und 10 Wochen alten Tieren deutlich höher als bei den älteren Mäusen. Hier war kaum noch Teilungsaktivität zu beobachten. In der Medulla war die Proliferationsrate insgesamt sehr niedrig und unterschied sich lediglich zwischen 30 und 70 Wochen, wobei sie bei den 70 Wochen alten Mäusen etwas höher war als bei den 30 Wochen alten (Enoki et al. 2007). 2002 wurde die postnatale Entwicklung der Nieren von Wistar-Ratten untersucht und unter anderem die Zellteilungsrate zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Geburt mit der der Nieren von adulten Tieren verglichen. Genutzt wurde hierfür wiederum die Detektion der Expression von PCNA. In dieser Studie zeigten die adulten Tiere fast keine Expression von PCNA im Cortex, woraus die Autoren schlossen, dass bei ausgewachsenen Tieren im Grunde keine Proliferation der Zellen im Nierencortex mehr stattfindet (Márquez et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Zellteilung in den Nieren der Versuchstiere mit fortschreitendem Lebensalter gut beobachtet werden. Dadurch, dass die genutzten Mäuse in den Zellen, die die S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus durchlaufen GFP exprimieren, konnten die Untersuchungen durchgeführt werden, ohne dass auf Proliferationsmarker zurückgegriffen werden musste. Die proliferierenden Zellen waren mit Hilfe des 2-Photonenmikroskopes in den hergestellten Nierenschnitten direkt darzustellen. Untersucht wurden ausschließlich Tiere, bei denen die Entwicklung der Nieren zu funktionsfähigen Organen bereits vollständig abgeschlossen war (3-50 Wochen). Die Proliferationsrate war bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pgc1-Cyclin B1-GFP transgenen Mäusen im Alter von 4 Wochen am größten. Der Unterschied zur Teilungsrate in den Nieren der mit 3 Wochen jüngsten untersuchten Tieren war signifikant. Ebenso deutlich war der Abfall der Kurve nach dem Erreichen der höchsten Proliferationsrate mit 4 Wochen. In der gesunden Niere nimmt die Zellteilungsrate also auch nach Abschluss der Organentwicklung noch zu und fällt später dann mit zunehmendem Lebensalter wieder ab. Eine differenzierte Betrachtung von Cortex und

Medulla ergab, dass die beobachteten Veränderungen sich lediglich auf den Cortex beschränken, während die Zellen in der Medulla keinen altersabhängigen Veränderungen der Zellteilungsaktivität unterliegen. Zudem ist die Proliferationsrate der interstitiellen Zellen insgesamt als sehr niedrig zu bewerten und verändert sich in der gesunden Niere im Laufe des Lebens nicht in signifikantem Ausmaß. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse stimmen insoweit mit der Literatur überein, dass mit fortschreitendem Lebensalter die Zellteilungsaktivität in der Niere abnimmt. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der sogenannten renalen Seneszenz. Bei der zellulären Seneszenz handelt es sich um ein in den 1960er Jahren von Leonard Hayflick und Paul Moorhead entdecktes Phänomen und es beschreibt, dass Zellen nur eine bestimmte Anzahl an Teilungen leisten können, bevor sie in einen irreversiblen Zustand der Teilungsunfähigkeit übergehen (van Deursen 2014). Auch in der Niere ist dieser Alterungsprozess bekannt. Alterung in der Niere geht unter anderem einher mit dem Auftreten von Seneszenz-assoziiertes β -Galactosidase und ist neben anderen Charakteristika gekennzeichnet durch eine reduzierte Antwort auf mitogene Stimuli (Yang und Fogo 2010). Funktionell ist der Alterungsprozess in der Niere unter anderem mit einer verminderten GFR, Veränderungen der Reabsorptionsleistung der Tubuli und der Permeabilität der glomerulären Kapillaren und einer Zunahme der Apoptoserate renaler Zellen verbunden (Denic et al. 2016).

Eine weitere augenscheinliche Auffälligkeit ist die besonders hohe mitotische Aktivität in den Nieren der 4 Wochen alten Mäuse. Bei diesen Tieren befinden sich signifikant mehr Zellen in Mitose als es bei den 3 Wochen alten Tieren der Fall ist. Die Steigerung der Mitoserate in diesem Abschnitt ist möglicherweise als Reaktion auf das Absetzen von der Mutter im Alter von 21 Tagen zu erklären. Dies ist verbunden mit der Umstellung von Muttermilch auf feste Nahrung und der vermehrten Aufnahme von Wasser (Schmidt et al. 2013). Das Trinken von Wasser macht nach dem Absetzen eine vermehrte Konzentrierung des Harns notwendig und wird einigen Studien zufolge durch die in diesem Alter einsetzende Antwort auf das antidiuretische Hormon ermöglicht (Boss et al. 1963). Diese funktionellen Veränderungen nach dem Absetzen könnten als logische Konsequenz die in der vorliegenden Arbeit beobachteten strukturellen Veränderungen nach sich ziehen.

Des Weiteren fiel bei der Untersuchung des Alterungsprozesses auf, dass die beobachteten Veränderungen sich ausschließlich auf den Nierencortex beschränken. Die hohe Zahl an in Mitose befindlichen Zellen bei 4 Wochen alten Tieren und auch der

darauf folgende Rückgang der Zellteilungsaktivität mit zunehmendem Lebensalter, die in der gesamten Niere festgestellt wurden, waren so im Cortex nachzuvollziehen. In der Medulla dagegen war insgesamt sehr wenig Zellteilung festzustellen und auch eine Altersabhängigkeit ließ sich nicht erkennen. Dies deckt sich mit Daten aus der Literatur, so zum Beispiel mit den Erkenntnissen, die Enoki und Kollegen im Jahr 2007 gewonnen haben. Auch sie stellten eine deutlich geringere Zellteilungsaktivität in der Medulla verglichen mit der Nierenrinde fest (Enoki et al. 2007).

5.2 Pharmakologische Beeinflussung der Proliferationsrate renaler Zellen

Nachdem in der vorliegenden Arbeit zunächst die Zellteilungsaktivität in der gesunden Niere untersucht wurde, stellte sich als nächstes die Frage, inwieweit diese pharmakologisch beeinflusst werden könnte. Da in einer Studie aus dem Jahr 2016 neben der bekannten Funktion innerhalb der Kaskade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems der Einfluss des Angiotensin Converting Enzymes auf die Ca^{2+} -gesteuerte Proliferation von Zellen nachgewiesen werden konnte (Alvarenga et al. 2016), bot sich mit der Hemmung dieses Enzyms eine gute Möglichkeit, um pharmakologisch auf die Proliferationsrate einzuwirken. ACE fungiert in diesem Fall als Rezeptor für AngII, nach dessen Bindung über die Bildung von Inositol1,4,5-Trisphosphat intrazelluläre Ca^{2+} -Signalwege aktiviert werden (Guimarães et al. 2011). Eine Hemmung des Angiotensin Converting Enzymes müsste demnach also eine verminderte Proliferation von Zellen zur Folge haben. Auch AngII selbst wird ein proliferativer Effekt zugesprochen. So ist es zum einen an der Induktion wachstumsassoziierter Gene beteiligt und erhöht zum anderen die Bildung von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren (Huckle und Earp 1994). Eine Hemmung des Angiotensin Converting Enzymes bewirkt eine verminderte Synthese von AngII und müsste somit neben dem Einfluss auf ACE selbst auch den durch AngII bedingten proliferativen Effekt vermindern.

Daten in der Literatur unterstützen diese Annahme. So wurden in einer Studie aus dem Jahr 1999 5/6-Nephrektomien an Ratten durchgeführt, die ohne weitere Behandlung immer eine deutliche Gewichtszunahme des Nierenrestes innerhalb von vier Wochen nach sich zogen. Eine Behandlung mit dem ACE-Hemmer Enalapril bewirkte ein Ausbleiben dieses Wachstums, was die Autoren auf den antiproliferativen Effekt von Enalapril zurückführten (Krivosíková et al. 1999). Auch auf glatte Muskelzellen hat Enalapril einen proliferationshemmenden Effekt. Eine Behandlung weiblicher Ratten mit

Enalapril bewirkte in einer Studie aus dem Jahr 1999 ein Absinken der Proliferationsrate der glatten Muskelzellen in der Media des Ductus arteriosus und der Aorta ihrer Nachkommen. Untersucht wurde dies unter Verwendung von PCNA als Proliferationsmarker (TAKIZAWA et al. 1999). In vitro konnte mit Enalapril auch die Proliferation von orbitalen Fibroblasten gehemmt werden (Botta et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde als ACE-Hemmer Enalapril verwendet, was mit der Fütterung einer kochsalzarmen Diät kombiniert wurde. Eine salzarme Fütterung bewirkt in Kombination mit einem ACE-Hemmer eine vermehrte Synthese von Renin (Schweda 2015). Für die Therapie eines Hypertonus wird diese Kombination trotzdem häufig eingesetzt, da die kochsalzarme Fütterung die durch den ACE-Hemmer verminderte Rückresorption von NaCl und damit einhergehende Verringerung der NaCl-Konzentration noch verstärkt. Die benötigte Dosis des ACE-Hemmers lässt sich durch diese Maßnahme deutlich reduzieren (Richer-Giudicelli et al. 2004).

Die Zellteilungsrate in den Nieren der Mäuse war nach einer einwöchigen Behandlung signifikant erhöht im Vergleich zu der in den Nieren von unbehandelten Kontrolltieren. Diese Erhöhung der Zellteilungsaktivität zeigte sich nur im Cortex, in der Medulla dagegen ergaben sich keine Unterschiede. Diese Erkenntnisse stehen im Gegensatz zu den Daten in der Literatur, die, wie oben beschrieben, eher in die Richtung einer verminderten Zellteilungsaktivität durch die Behandlung mit Enalapril deuten. Für sich betrachtet liefert die Fütterung einer kochsalzarmen Diät durchaus eine Erklärung. Durch die verringerte Aufnahme von NaCl mit der Nahrung kommt es zu einer vermehrten Synthese von Renin und dadurch letztlich zu einer Erhöhung der AngII-Konzentration (Graudal et al. 2017). Berücksichtigt man nun den proliferationsfördernden Effekt von AngII, könnte dies den Anstieg der Zellteilungsaktivität durch die Behandlung erklären. Bereits 1999 konnte der proliferationsfördernde Effekt einer salzarmen Diät gezeigt werden. Untersucht wurde dabei allerdings die Nebenniere. Die restriktive Fütterung von Kochsalz bewirkte eine vermehrte Proliferation von Endothelzellen in der Zona glomerulosa (McEwan et al. 1999).

Die in der Literatur bisher beschriebenen Auswirkungen von Enalapril auf die Zellteilungsaktivität lassen keine Erklärung der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zu. Ganz neue Erkenntnisse deuten jedoch in eine andere, von AngII unabhängige Richtung. So scheinen Macula-densa-Zellen über verschiedene Signalwege die Differenzierung und Entwicklung von Zellen in der Niere zu beeinflussen. Eine Stimulierung dieser Zellen, die durch eine Verminderung der Salzkonzentration

hervorgerufen wird, führt unter anderem zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges, zur Synthese von parakrin wirkenden Substanzen und zu einer verstärkten Angiogenese (American Society of Nephrology: ASN Kidney Week 2018 - Abstract Supplement 10/28.). Dass die Aktivierung der Macula-densa-Zellen mittels ACE-Hemmer und salzreicher Diät auch auf die Proliferation von Zellen im Nierencortex Einfluss nehmen könnte, scheint eine durchaus zu berücksichtigende Möglichkeit zu sein und bedarf noch weiterer Untersuchungen.

5.3 Entwicklung der Proliferationsrate nach unilateraler Nephrektomie

Der Verlust einer Niere ist ein durch verschiedene Ursachen bedingtes Ereignis. So kann es beispielsweise durch verschiedene Erkrankungen zum Verlust der Funktion einer Niere kommen, oder eine Niere wird (z.B. aufgrund einer Tumorerkrankung) operativ entfernt. Jedoch kann auch ein ansonsten völlig gesunder Patient durch eine Lebendspende eines der paarig angelegten Organe verlieren. Unabhängig von der Ursache des Verlustes unterliegt die kontralaterale Niere gewissen Veränderungen, die dazu dienen, die diversen Funktionen der Nieren trotz der verringerten Anzahl an funktionsfähigen Nephronen aufrecht zu erhalten.

Als wichtigstes Instrument, um die Funktionsleistung der Niere zu überprüfen, dient die Messung der glomerulären Filtrationsrate. Auch nach der Durchführung einer unilateralen Nephrektomie wird diese Messung genutzt, um Rückschlüsse darauf ziehen zu können, inwieweit sich die kontralaterale Niere an die neuen Gegebenheiten anpasst (Ben-Haim et al. 2000). In der Literatur sind die Daten einheitlich in Bezug auf die Frage, ob es nach der unilateralen Nephrektomie zu einer Veränderung der GFR kommt. Als Antwort auf den Verlust einer Niere wird die Funktion der Nephrone der verbleibenden Niere gesteigert (Funahashi et al. 2011). Uneinigkeit herrscht jedoch hinsichtlich der Dauer, bis sich post OP die ersten Veränderungen zeigen. So gibt es Studien, denen zu Folge die GFR der einzelnen Niere innerhalb von 8 bis 12 Wochen nach der OP um 70% im Vergleich zum Ausgangswert ansteigt (Kim et al. 2010). Andere Daten legen nahe, dass der Anstieg nach etwa einem Monat erfolgt, jedoch mit ca. 22% deutlich geringer ausfällt und sich im weiteren Verlauf nicht mehr ändert (Chen et al. 2012). Wieder andere Ergebnisse zeigten schon fünf Tage nach der Nephrektomie einen Anstieg der GFR der verbleibenden Niere um ca. 30% (Strandgaard et al. 1988). Der Anstieg der GFR in Folge einer unilateralen Nephrektomie ist allerdings nicht nur ein wichtiges Kriterium zur Kontrolle der Entwicklung der Nierenfunktion, sondern kann auch ursächlich sein für

mögliche Folgeschäden bei Verlust einer Niere. Die kompensatorische glomeruläre Hyperfiltration in der kontralateralen Niere kann letztlich zur Entwicklung einer Glomerulosklerose führen, die wiederum zu Hypertonus, Proteinurie und dem Voranschreiten eines chronischen Nierenversagens beiträgt (Godron-Dubrasquet et al. 2017).

Unbestritten ist, dass die Entfernung einer Niere eine Zunahme von Masse, Länge und Durchmesser der kontralateralen Niere zur Folge hat (Bohlouli et al. 2010). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit auch so bestätigt werden. Sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen untersuchten Tieren stieg nach unilateraler Nephrektomie das Trockengewicht der verbleibenden Niere innerhalb eines Zeitraums von 14 Tagen signifikant an. Ob die Ursache für die Massenzunahme in einer Hypertrophie, einer Hyperplasie oder einer Kombination aus beidem liegt, wird in der Literatur jedoch sehr kontrovers diskutiert. Viele Studien deuten darauf hin, dass sie durch eine Vergrößerung ohne vermehrte Zellteilung, eine Hypertrophie, bedingt ist. Für diesen Ansatz spricht auch die bereits 1980 gewonnene Erkenntnis, dass der Verlust einer Niere keine Vermehrung der funktionsfähigen Nephrone im kontralateralen Organ nach sich zieht (Larsson et al. 1980). Der Hypertrophie wird daher ein Anteil von 75-80% am kompensatorischen Wachstum der kontralateralen Niere zugesprochen (Bridges et al. 2016; Wolf und Neilson 1991). Paulini und sein Team stellten 1969 eine gewisse Altersabhängigkeit hinsichtlich der Frage fest, ob die Massenzunahme durch Hypertrophie oder Hyperplasie zu erklären ist. Sie untersuchten männliche Albinoratten unterschiedlichen Alters 4 Wochen nach Durchführung einer unilateralen Nephrektomie. Die Untersuchung des DNA-Gehaltes in den Nieren diente als Kriterium, um eine Aussage über eine eventuell auftretende Hyperplasie zu treffen. Während eine Gewichtszunahme der verbleibenden Niere unabhängig vom Lebensalter eintrat, zeigten sich hinsichtlich des DNA-Gehaltes deutliche Unterschiede. Bei den jüngeren Tieren nahm dieser post OP deutlich zu, während die Zunahme im Alter von ca. 7 Monaten bereits wesentlich weniger deutlich ausfiel und mit fortschreitendem Alter sogar ganz ausblieb und eine Abnahme des DNA-Gehaltes beobachtet wurde. Dies deuteten die Autoren so, dass bei jüngeren Tieren eher eine Hyperplasie und bei älteren im Wesentlichen eine Hypertrophie die Massenzunahme der kontralateralen Niere bewirkt (Paulini, K., Beneke, G. & Kulka, R. Virchows 1970).

Andere Studien messen der Hyperplasie in diesem Prozess grundsätzlich mehr Bedeutung bei. So wurde bereits 1967 mit Hilfe einer Thymidin-Markierung der Mitoseindex von

Nierenzellen von Ratten bestimmt und die Werte von nicht-operierten Tieren mit denen von Tieren, die einer unilateralen Nephrektomie unterzogen wurden, verglichen. Sowohl bei jüngeren als auch bei älteren Tieren beobachtete man eine Erhöhung der Mitoserate post OP (Phillips, Leong 1967).

Die Pdk1-Cyclin B1-GFP transgene Maus bot ein gut geeignetes Modell, um zu klären, ob eine unilaterale Nephrektomie tatsächlich eine Hyperplasie, also eine Erhöhung der Zellteilungsrate zur Folge hat. Untersucht wurde dies an unterschiedlich alten Tieren, um einen möglichen Einfluss des Lebensalters zu erkennen. Die Untersuchung tiefer Gewebeschichten mit Hilfe der Multiphotonenmikroskopie erlaubte zudem Einblicke dahingehend, welche Kompartimente der Niere postoperativen Veränderungen unterliegen. Eine Woche post OP war die Zellteilung in allen untersuchten Gruppen (3 bis 50 Wochen alt) deutlich gestiegen. Eine Ausnahme bildeten lediglich die drei Wochen alten Tiere, bei denen der Anstieg nicht signifikant war. Die Hypothese, dass eine Hyperplasie zur Massenzunahme der kontralateralen Niere zumindest beiträgt, konnte also eindeutig bestätigt werden. Die Annahme, dass bei älteren Tieren die kompensatorischen Veränderungen weniger stark ausgeprägt sind, konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Bei den älteren untersuchten Tieren (30, 40 und 50 Wochen) war die Erhöhung der Proliferationsrate sogar noch ausgeprägter als bei den jüngeren Tieren. Wie bereits besprochen, legen die Daten in der Literatur nahe, dass das Wachstum der kontralateralen Niere nach unilateraler Nephrektomie möglicherweise neben einer Hyperplasie auch durch eine Hypertrophie bedingt sein könnte. Welchen Anteil am kompensatorischen Wachstum eine Hypertrophie neben der Erhöhung der Proliferationsrate eventuell zusätzlich noch hat, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und sollte Gegenstand zukünftiger Experimente sein.

Als Ursache für das kompensatorische Wachstum der Niere nach unilateraler Nephrektomie wird in der Literatur eine strukturelle Anpassung an die funktionellen Veränderungen diskutiert, die nach der Operation eintreten. Der Verlust der Hälfte der funktionsfähigen Nephrone macht eine Kompensation durch die übrig gebliebenen Nephrone erforderlich. Um unter anderem Salz- und Volumenhaushalt des Körpers trotz der Entfernung einer Niere aufrecht zu erhalten, müssen die übrigen Nephrone umso mehr leisten. Möglicherweise stellt dies den Stimulus für das kompensatorische Wachstum dar (Schnaper 2013).

Interessant ist, dass die beobachteten Veränderungen sich zwar auch im Cortex zeigen, allerdings in weniger deutlich und auch nur bei den älteren untersuchten Tieren.

Besonders eindrücklich war die Zunahme der Proliferationsrate aber in der Medulla und dies unabhängig vom untersuchten Lebensalter. Dies steht im Gegensatz zu der häufig in der Literatur vertretenen Aussage, dass das kompensatorische Wachstum in erster Linie im Cortex stattfindet (Moskowitz et al. 1996). Auf die beteiligten Zellen wird im Detail im nächsten Teil der Diskussion eingegangen.

Da der proliferationsfördernde Effekt einer Behandlung mit dem ACE-Hemmer Enalapril in Kombination mit einer kochsalzarmen Diät auf die Nieren von gesunden Versuchstieren verschiedener Altersgruppen in der vorliegenden Arbeit bereits beschrieben wurde, sollte zunächst der Einfluss dieser Behandlung auf Mäuse untersucht werden, die einer unilateralen Nephrektomie unterzogen wurden. Da beide Arten von Manipulation eine Erhöhung der Zellteilungsrate hervorrufen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich der stimulierende Einfluss auf die Zellteilungsaktivität durch eine Kombination potenziert. Sowohl die Behandlung mit Enalapril und salzarter Diät bereits eine Woche vor der Operation, als auch die Behandlung ab der unilateralen Nephrektomie hatten jedoch zur Folge, dass die Zellteilungsrate im Vergleich zu ausschließlich operierten Tieren signifikant niedriger blieb. Eine mögliche Erklärung dafür besteht darin, dass die Proliferation post OP auf einer Aktivierung des RAAS beruht (Schnaper 2013). Wird die Umwandlung von AngI in AngII durch den ACE-Hemmer verhindert, kann AngII seine proliferationsfördernde Wirkung nicht mehr entfalten. Außerdem wurde in diesem Versuch nicht überprüft, ob die GFR bei den untersuchten Tieren post OP tatsächlich gestiegen ist. Möglicherweise führt eine Behandlung mit dem ACE-Hemmer in Kombination mit der kochsalzarmen Diät zu einem sehr niedrigen arteriellen Druck, der dafür sorgt, dass die durch die unilaterale Nephrektomie bedingte Hyperfiltration in der kontralateralen Niere ausbleibt und somit keinen Auslöser für eine erhöhte Proliferation darstellt.

Wurden die Tiere lediglich mit Enalapril, aber ohne die zusätzliche Fütterung einer NaCl-armen Diät behandelt, bestand kein Unterschied mehr in der Zellteilungsrate verglichen mit den operierten, aber ansonsten unbehandelten Tieren, was die Hypothese eines proliferationsfördernden Effektes einer Hyperfiltration untermauern könnte. Durch die alleinige Behandlung mit dem ACE-Hemmer ohne zusätzliche Futterumstellung ist der Abfall des arteriellen Druckes möglicherweise nicht mehr so gravierend und dafür die Erhöhung der Filtrationsleistung deutlicher als bei der kombinierten Behandlung. Die Hyperfiltration würde in diesem Fall wieder einen möglichen Auslöser für die vermehrte

Proliferation darstellen. Um diese Hypothese zu testen, sind weitere Untersuchungen nötig.

5.4 Identifizierung der proliferierenden Zellen

Um später die Zellen zu identifizieren, die nach einer unilateralen Nephrektomie vermehrt proliferieren, sollten in der vorliegenden Arbeit zunächst Zelltypen identifiziert werden, die grundsätzlich zur Teilung fähig sind. Dies geschah mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen, bei denen die Gewebeschnitte jeweils auf Colokalisationen des jeweils verwendeten Markers und des in den proliferierenden Zellen exprimierten GFP untersucht wurden.

5.4.1 Zelltypen mit Fähigkeit zur Teilung

Dass die Niere über ein großes regeneratives Potential verfügt, ist unbestritten. Der Ursprung der an der Regeneration beteiligten Zellen und die Fähigkeit der einzelnen Zelltypen zur Zellteilung sind jedoch noch nicht abschließend geklärt (Humphreys et al. 2008). Um einen Überblick zu erhalten, welche Zellen in der Niere in die S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus eintreten können, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst die Tubulusepithelzellen auf ihr Teilungspotential untersucht. Sowohl eine Färbung gegen das im proximalen Tubulus lokalisierte Rezeptorprotein Megalin, als auch eine Färbung gegen pNCC, einen im distalen Tubulus exprimierten Natrium-Kalium-Cotransporter, zeigten Colokalisationen mit Zellen, die GFP exprimierten und sich somit in Teilung befanden. Epithelzellen des proximalen und auch des distalen Tubulus sind somit in der Lage zu proliferieren. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Aussagen verschiedener Studien (Humphreys et al. 2008; Fujigaki 2012).

Auch mit Hilfe von SGC α 1 (soluble guanylyl cyclase alpha 1), einem NO-Rezeptor, als corticale Fibroblasten identifizierte Zellen zeigten Teilungsaktivität. In der Literatur gehen die Daten hinsichtlich der Proliferation von renalen corticalen Fibroblasten auseinander. Während einige Studien ihnen die Fähigkeit zur Proliferation zusprechen (Strutz et al. 2000), haben sie anderen zu Folge kein regeneratives Potential (Yamashita et al. 2005).

Durch eine Färbung gegen das Oberflächenprotein CD11c wurden dendritische Zellen markiert. Es konnten keine CD11c-positiven proliferierenden Zellen beobachtet werden,

was die Vermutung nahelegt, dass dendritische Zellen in der Niere selbst nicht über die Fähigkeit zur Teilung verfügen, obwohl sie als Mediatoren eine wichtige Rolle bei diversen Regenerationsprozessen spielen (Rogers et al. 2014).

Die Hauptzellen im Sammelrohr wurden mit Hilfe einer Färbung gegen Aquaporin 2 angefärbt. Daten in der Literatur legen nahe, dass die Hauptzellen proliferieren können. Dies wurde beispielsweise durch Verwendung des Proliferationsmarkers PCNA herausgefunden (Christensen et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte das proliferative Potential dieser Zellen jedoch nicht bestätigt werden. Es konnten keine Zellen identifiziert werden, die sowohl AP2, als auch GFP exprimieren.

Die Teilungsfähigkeit der Schaltzellen wurde mit Hilfe zweier Marker analysiert. α -Schaltzellen wurden mit einer Färbung gegen V-ATPase (vakuoläre H⁺-ATPase), β -Schaltzellen mit einer Färbung gegen den Ionenkanal Pendrin markiert. In der Literatur ist beschrieben, dass α -Schaltzellen proliferieren können, während β -Schaltzellen über dieses Potential nicht verfügen (Welsh-Bacic et al. 2011). Dies konnte so auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Beim letzten hier untersuchten Zelltyp handelt es sich um Zellen des aufsteigenden Astes der Henle-Schleife. Als Marker wurde hier ein Antikörper gegen NKCC2, einen Na-K-2Cl-Cotransporter genutzt. Auch hier konnten Colokalisationen mit in den Zellen exprimiertem GFP beobachtet werden, was eine Teilungsfähigkeit von Zellen im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife nahelegt. Dieses Ergebnis deckt sich mit Daten in der Literatur, die Zellen in der Henle-Schleife ebenfalls die Fähigkeit zur Proliferation zusprechen (Cha et al. 2001).

Da es noch viele weitere Zelltypen in der Niere gibt, ist der hier gegebene Überblick noch längst nicht vollständig und erfordert weitere Untersuchungen.

5.4.2 Veränderungen der Proliferationsrate verschiedener renaler Zelltypen nach unilateraler Nephrektomie

Eine unilaterale Nephrektomie hatte bei den vorangegangenen Versuchen in der vorliegenden Arbeit in fast allen untersuchten Gruppen eine Erhöhung der Zellteilungsaktivität zur Folge. Nach der Erstellung eines ersten Überblickes über die Zelltypen, die grundsätzlich über Teilungspotential verfügen, sollte daher als nächstes näher eingegrenzt werden, welche Zelltypen diejenigen sind, die sich post OP vermehrt teilen. Da die Veränderungen im Nierenmark besonders auffällig waren, wurde der Fokus dabei zunächst auf dieses Kompartiment der Niere gelegt. Verglichen wurde die

Proliferationsrate von Haupt- und α -Schaltzellen des Sammelrohres von nichtoperierten Tieren und Mäusen nach unilateraler Nephrektomie, sowie die von NKCC2-positiven Zellen im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife.

In den Hauptzellen des Sammelrohres konnte auch nach der unilateralen Nephrektomie keinerlei Zellteilungsaktivität beobachtet werden. Es gab weder basal noch post OP Colokalisationen mit dem von den proliferierenden Zellen exprimierten GFP. Proliferierende α -Schaltzellen waren post OP zwar zu sehen, ihre Zahl war aber verglichen mit den Basalwerten unverändert. Dieses Ergebnis widerspricht den Angaben in der Literatur, laut denen es sowohl in Haupt-, als auch in Schaltzellen der kontralateralen Niere zu vermehrter Proliferation als Folge einer unilateralen Nephrektomie kommt. So wurden in einer Studie aus dem Jahr 1967 die Folgen einer unilateralen Nephrektomie auf die kontralaterale Niere von Albino-Ratten untersucht. Die Autoren stellten die Proliferation anhand verschiedener morphologischer Veränderungen der Zellen fest. Dazu zählten unter anderem die Dilatation von Zisternen des Golgi-Apparates und eine Zunahme des Anteils an Zytoplasma (Anderson 1967). Auffällig war jedoch die Zunahme an proliferierenden Zellen im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt bietet die Tatsache, dass in Folge eines einseitigen Nierenverlustes die Filtration in der kontralateralen Niere zunimmt. Somit kommt es auch zu einem Anstieg der Menge an Flüssigkeit, Natrium und Kalium im Bereich der Henle-Schleife, deren Aufgabe unter anderem in der Konzentrierung des Harns liegt (Diezi et al. 1976). Da daher auch die Funktion der Zellen in der Henle-Schleife erhöht werden muss, lässt sich dadurch möglicherweise die Notwendigkeit einer strukturellen Veränderung erklären.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine vom Lebensalter abhängige Veränderung der Proliferationsrate renaler Zellen. Die Zellteilungsrate konnte durch die Behandlung mit dem ACE-Hemmer Enalapril gesteigert werden, ebenso wurde eine vermehrte Proliferation nach Durchführung einer unilateralen Nephrektomie in der kontralateralen Niere beobachtet. In diesem Fall zeigt sich der Anstieg besonders deutlich in Zellen des aufsteigenden Astes der Henle-Schleife.

6 Zusammenfassung

Die Zellteilungsaktivität in der gesunden Niere wurde bisher nur unzureichend untersucht. Auch der Ursprung der Zellen, die prinzipiell zur Mitose fähig sind und somit die Grundlage für die Regeneration von zugrunde gegangenem Nierengewebe bilden könnten, wird kontrovers diskutiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zunächst die Mitoseaktivität der Zellen in der gesunden Niere mit fortschreitendem Lebensalter zu klären, um danach sowohl die Möglichkeit der pharmakologischen Beeinflussung, als auch Veränderungen in der kontralateralen Niere nach unilateraler Nephrektomie als Modell für eine Lebend-Nierenspende zu untersuchen. Dies ist von besonderem Interesse, da nicht abschließend geklärt ist, ob der nach der Operation auftretenden kompensatorischen Hypertrophie der kontralateralen Niere eine Zellhypertrophie oder eine Zellhyperplasie zugrunde liegt. Genutzt wurden für alle beschriebenen Versuche P_{gk1}-Cyclin B1-GFP transgene Mäuse, die in allen Zellen GFP exprimieren, die die S-, G₂- und M-Phase des Zellzyklus durchlaufen, während in der G₁- und G₀-Phase kein GFP exprimiert wird.

Die Zellteilungsrate in den Nieren der unbehandelten Mäuse nahm mit fortschreitendem Alter ab, nachdem sie zunächst von der mit 3 Wochen jüngsten untersuchten Gruppe zu den 4 Wochen alten Mäusen anstieg. Die beobachteten Unterschiede beschränkten sich auf die Nierenrinde, während die Zahl sich teilender Zellen im Mark in allen Altersgruppen konstant blieb.

Weiterhin wurde eine Versuchsgruppe über eine Woche mit dem ACE-Hemmer Enalapril in Kombination mit der Fütterung einer kochsalzarmen Diät behandelt, um die in der Literatur beschriebene Hemmung der Mitoserate durch Enalapril zu überprüfen. Dies hatte jedoch entgegen dieser Annahme eine erhöhte Mitoserate in den Nieren der behandelten Mäuse zur Folge. Diese stellte sich wiederum lediglich im Bereich des Cortex und hier in erster Linie in Zellen des Interstitiums dar.

Die Untersuchung der verbleibenden Niere eine Woche nach unilateraler Nephrektomie zeigte beim Vergleich verschiedener Altersstufen in fast allen Gruppen eine signifikant erhöhte Zellteilungsrate im Vergleich zu Kontrolltieren im gleichen Alter. Die kompensatorische Hypertrophie als Antwort auf eine unilaterale Nephrektomie ist also zumindest anteilig durch eine Zellhyperplasie bedingt. Diese stellte sich, abhängig vom Alter der untersuchten Tiere, sowohl in interstitiellen Zellen als auch in Zellen des tubulären Systems dar und wurde vor allem im Mark deutlich. Zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten post OP (5, 7 und 14 Tage) bestanden keine Unterschiede in

der Mitoserate. Das Trockengewicht der verbleibenden Nieren war 14 Tage post OP, wie in der Literatur beschrieben, höher als das der bei der unilateralen Nephrektomie entnommenen Nieren.

Eine Kombination der unilateralen Nephrektomie mit einer im Voraus oder ab der Operation begonnenen Behandlung mit Enalapril und salzarmer Diät führte dazu, dass die Erhöhung der Zellteilungsrate ausblieb. Bei alleiniger Behandlung mit Enalapril unter Verzicht auf die salzarme Diät zeigte sich kein Unterschied mehr zwischen behandelten und unbehandelten Tieren nach der Nephrektomie.

Um die zur Zellteilung fähigen Zellen zu bestimmen, wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Hierbei konnte Zellteilungsaktivität in Epithelzellen sowohl des proximalen als auch des distalen Tubulus, in corticalen Fibroblasten, in α -Schaltzellen des Sammelrohrs sowie in Zellen des aufsteigenden Astes der Henle-Schleife beobachtet werden. Nach der unilateralen Nephrektomie nahm vor allem in Zellen der Henle'schen Schleife die Mitoseaktivität deutlich zu.

Die vorliegende Arbeit konnte an Pdk1-Cyclin B1-GFP transgenen Mäusen zeigen, dass die Proliferation renaler Zellen altersabhängigen Veränderungen unterliegt. Nach dem Absetzen erreicht die Proliferationsrate ihren Höhepunkt, um danach mit zunehmendem Lebensalter abzufallen. Eine Hemmung des Angiotensin Converting Enzymes hat, so wie auch der Verlust einer Niere, einen proliferationsfördernden Effekt. Nach der unilateralen Nephrektomie unterliegen besonders die Zellen im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife einer vermehrten Teilung.

7 Summary

The proliferative activity of cell populations in the healthy kidney has not yet been sufficiently investigated. Discussions about the origin of renal cells that have the potential to proliferate and thus provide the basis of the regeneration of damaged kidney tissue are still controversial. So the first aim of this work was to give an overview about the changes in the proliferative activity of cells in healthy kidneys with advancing age. Then we investigated potential pharmacological influences on the proliferation rate in the kidney and the effect of unilateral nephrectomy on the proliferative activity in the contralateral kidney as a model of living donor kidney transplants. It's not yet finally clarified if the postoperative growth of the contralateral kidney is based on either hypertrophy or hyperplasia or even a combination of both events.

We used a transgenic mouse strain expressing a Cyclin-B1-GFP fusion reporter for all experiments. These mice express GFP in cells that are in the S-, G2- or M phase of the cell cycle, what makes them a well suited model for the investigation of the proliferative activity of different organs.

With advancing age, the proliferative activity of renal cells in the mouse kidneys declined significantly after reaching its highest value at the age of four weeks. The changes have only been seen in the renal cortex, the proliferation rate in the renal medulla remained unchanged.

The treatment with the ACE inhibitor Enalapril in combination with a low-salt diet over a period of one week led to an increased proliferation rate compared to an untreated control group. The changes were again limited to the renal cortex and especially visible in the interstitium. These findings contradict the existing data that describe a decreased proliferative activity in response to this treatment.

One week after unilateral nephrectomy, the proliferative activity of the remnant kidney was increased compared to control groups of the same age. This was confirmed in most of the investigated age groups. Cell proliferation was seen in interstitial cells as well as in cells belonging to the tubular system and especially visible in the renal medulla. Thus the compensatory growth of the remnant kidney is, at least in parts, based on hyperplasia. The variation of the time post nephrectomy (5, 7 and 14 days) had no impact on the proliferation rate. The dry weight of the contralateral kidney was increased 14 days after unilateral nephrectomy.

The combination of unilateral nephrectomy and the treatment with Enalapril and low-salt diet one week before surgery or from this day on led to the absence of the proliferative

effects. The proliferative activity remained unchanged compared to untreated control animals. The treatment with Enalapril in combination with a regular diet had no effect on the increase of proliferative activity in response to unilateral nephrectomy.

To determine the cells that have the potential to proliferate, we performed immunohistochemistry. Proliferative activity was shown in epithelial cells of the proximal and the distal tubule, in cortical fibroblasts, in α -intercalated cells of the collecting duct and in cells of the ascending branch of the henle loop. Unilateral nephrectomy led to an increased number of proliferating cells especially in the henle loop.

The present work used a transgenic mouse strain expressing GFP in replicating cells to show age-dependent changes in the proliferative activity of renal cell populations. The proliferation rate reaches its highest value immediately after weaning and declines constantly after that. Treatment with the ACE-Inhibitor Enalapril and unilateral nephrectomy both lead to an increase of the proliferative activity. After unilateral nephrectomy this increase is especially seen in the henle loop.

8 Literaturverzeichnis

Al-Awqati, Q.; Oliver, J. A. (2002): Stem cells in the kidney. In: *Kidney International* 61 (2), S. 387–395.

Al-Awqati, Q.; Oliver, J. A. (2006): The kidney papilla is a stem cells niche. In: *Stem cell reviews* 2 (3), S. 181–184.

Alvarenga, E. C.; Fonseca, M.; Carvalho, C. C.; Florentino, R. M.; França, A.; Matias, E. et al. (2016): Angiotensin Converting Enzyme Regulates Cell Proliferation and Migration. In: *PLoS ONE* 11 (12).

American Society of Nephrology: ASN Kidney Week 2018 - Abstract Supplement 10/28. FR-OR030 Oral Abstract Friday Cellular Crosstalk in Glomerular Diseases Macula Densa Cells Orchestrate Podocyte Neogenesis, S. 47–48

Anderson, W. A. (1967): The fine structure of compensatory growth in the rat kidney after unilateral nephrectomy. In: *The American journal of anatomy* 121 (2), S. 217–247.

Anglani, F.; Mezzabotta, F.; Ceol, M.; Cristofaro, R.; Del Prete, D.; D'Angelo, A. (2010): The Regenerative Potential of the Kidney: What Can We Learn from Developmental Biology? In: *Stem Cell Reviews and Reports* 6 (4), S. 650–657.

Ben-Haim, S.; Sopov, V.; Stein, A.; Moskovitz, B.; Front, A.; Mecz, Y. et al. (2000): Kidney function after radical nephrectomy: assessment by quantitative SPECT of ^{99m}Tc-DMSA uptake by the kidneys. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 41 (6), S. 1025–1029.

Berger, K.; Bangen, J.-M.; Hammerich, L.; Liedtke, C.; Floege, J.; Smeets, B.; Moeller, M.-J. (2014): Origin of regenerating tubular cells after acute kidney injury. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (4), S. 1533–1538.

Bianco, B.; Diaspro, A. (1989): Analysis of three-dimensional cell imaging obtained with optical microscopy techniques based on defocusing. In: *Cell biophysics* 15 (3), S. 189–199.

Bohlouli, A.; Tarzamni, M. K.; Zomorodi, A.; Abdollahifard, S.; Hashemi, B.; Nezami, N. (2010): Remnant kidney function and size in living unrelated kidney donors after

nephrectomy. In: *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia* 21 (2), S. 246–250.

Boss, J. M. N.; Dlouhá, H.; Kraus, M.; Křeček, J. (1963): The structure of the kidney in relation to age and diet in white rats during the weaning period. In: *The Journal of Physiology* 168 (1), 196-204.2.

Botta, R.; Lisi, S.; Marcocci, C.; Sellari-Franceschini, S.; Rocchi, R.; Latrofa, F. et al. (2013): Enalapril reduces proliferation and hyaluronic acid release in orbital fibroblasts. In: *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 23 (1), S. 92–96.

Brandeis, M.; Hunt, T. (1996): The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. In: *The EMBO Journal* 15 (19), S. 5280–5289.

Brandeis, M.; Rosewell, I.; Carrington, M.; Crompton, T.; Jacobs, M. A.; Kirk, J. et al. (1998): Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (8), S. 4344–4349.

Bridges, C. C.; Barfuss, D. W.; Joshee, L.; Zalups, R. K. (2016): Compensatory Renal Hypertrophy and the Uptake of Cysteine S-Conjugates of Hg²⁺ in Isolated S2 Proximal Tubular Segments. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 154 (2), S. 278–288.

Canaud, G.; Bonventre, J. V. (2014): Cell cycle arrest and the evolution of chronic kidney disease from acute kidney injury. In: *Nephrology Dialysis Transplantation* 30 (4), S. 575–583.

Cardani, R.; Zavanella, T. (2000): Age-related cell proliferation and apoptosis in the kidney of male Fischer 344 rats with observations on a spontaneous tubular cell adenoma. In: *Toxicologic pathology* 28 (6), S. 802–806.

Carretero, A.; Ruberte, J.; Navarro, M.; Nacher, V.; Espada, Y. (2017): Urinary organs. In: Jesus Ruberte, Ana Carretero und Marc Navarro (Hg.): Morphological mouse phenotyping. Anatomy, histology and imaging. Madrid, Spain: Academic Press, S. 179–194.

Cha, J. H.; Kim, Y. H.; Jung, J. Y.; Han, K. H.; Madsen, K. M.; Kim, J. (2001): Cell proliferation in the loop of henle in the developing rat kidney. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 12 (7), S. 1410–1421.

Chen, K. W.; Wu, M. W. F.; Chen, Z.; Tai, B. C.; Goh, Y. S. B.; Lata, R. et al. (2016): Compensatory Hypertrophy After Living Donor Nephrectomy. In: *Transplantation proceedings* 48 (3), S. 716–719.

Chen, Z.; Fang, J.; Li, G.; Zhang, L.; Xu, L.; Pan, G. et al. (2012): Compensatory changes in the retained kidney after nephrectomy in a living related donor. In: *Transplantation proceedings* 44 (10), S. 2901–2905.

Christensen, B. M.; Kim, Y.-H.; Kwon, T.-H.; Nielsen, S. (2006): Lithium treatment induces a marked proliferation of primarily principal cells in rat kidney inner medullary collecting duct. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 291 (1), F39-48.

Conlon, I.; Raff, M. (1999): Size Control in Animal Development. In: *Cell* 96 (2), S. 235–244.

Cotsarelis, G.; Cheng, S.-Z.; Dong, G.; Sun, T.-T.; Lavker, R. M. (1989): Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. In: *Cell* 57 (2), S. 201–209.

Deetjen, P.; Alzheimer, C. (Hg.) (2005): Physiologie. Mit 88 Tabellen ; plus CD-ROM mit Prüfungsfragen und allen Abbildungen ; [Online-Zugang + interaktive Extras www.studentconsult.de. 4., vollst. überarb. Aufl., [Nachdr.]. München: Elsevier Urban & Fischer.

Denic, A.; Glassock, R. J.; Rule, A. D. (2016): Structural and Functional Changes With the Aging Kidney. In: *Advances in chronic kidney disease* 23 (1), S. 19–28.

Diaspro, A.; Bianchini, P.; Vicidomini, G.; Faretta, M.; Ramoino, P.; Usai, C. (2006): Multi-photon excitation microscopy. In: *Biomedical engineering online* 5, S. 36.

Dicker, S. E.; Shirley, D. G. (1971): Mechanism of compensatory renal hypertrophy. In: *The Journal of Physiology* 219 (3), S. 507–523.

Dicker, S. E.; Shirley, D. G. (1973): Compensatory renal growth after unilateral nephrectomy in the new-born rat. In: *The Journal of Physiology* 228 (1), S. 193–202.

- Diezi, J.; Michoud, P.; Grandchamp, A.; Giebisch, G. (1976): Effects of nephrectomy on renal salt and water transport in the remaining kidney. In: *Kidney International* 10 (6), S. 450–462.
- Elledge, S. J. (1996): Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis. In: *Science* 274 (5293), S. 1664–1672.
- Engelhardt, W. von; Breves, G.; Aurich, C. (Hg.) (2010): Physiologie der Haustiere. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Enke.
- Enoki, N.; Kiyoshima, T.; Sakai, T.; Kobayashi, I.; Takahashi, K.; Terada, Y.; Sakai, H. (2007): Age-dependent changes in cell proliferation and cell death in the periodontal tissue and the submandibular gland in mice: a comparison with other tissues and organs. In: *Journal of molecular histology* 38 (4), S. 321–332.
- Freissmuth, M.; Offermanns, S.; Böhm, S. (Hg.) (2016): Pharmakologie und Toxikologie. Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch).
- Fujigaki, Y. (2012): Different modes of renal proximal tubule regeneration in health and disease. In: *World journal of nephrology* 1 (4), S. 92–99.
- Funahashi, Y.; Hattori, R.; Yamamoto, T.; Kamihira, O.; Sassa, N.; Gotoh, M. (2011): Relationship between renal parenchymal volume and single kidney glomerular filtration rate before and after unilateral nephrectomy. In: *Urology* 77 (6), S. 1404–1408.
- Gavet, O.; Pines, J. (2010): Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. In: *Developmental cell* 18 (4), S. 533–543.
- Ghosh, S.; Collier, A. (2012): Chronic complications. In: Sujoy Ghosh, Andrew Collier und Andrew J. Krentz (Hg.): Diabetes. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier (Churchill's pocketbooks), S. 165–226.
- Godron-Dubrasquet, A.; Didailler, C.; Harambat, J.; Llanas, B. (2017): Conduite à tenir devant un rein unique. In: *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* 24 (11), S. 1158–1163.
- Gomez, H. J.; Cirillo, V. J.; Irvin, J. D. (1985): Enalapril: a review of human pharmacology. In: *Drugs* 30 Suppl 1, S. 13–24.

- Göppert-Mayer, M. (1931): Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. In: *Ann. Phys.* 401 (3), S. 273–294.
- Graudal, N. A.; Hubeck-Graudal, T.; Jurgens, G. (2017): Effects of low sodium diet versus high sodium diet on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterol, and triglyceride. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 4, CD004022.
- Guimarães, P. B.; Alvarenga, É. C.; Siqueira, P. D.; Paredes-Gamero, E. J.; Sabatini, R. A.; Morais, R. L. T. et al. (2011): Angiotensin II binding to angiotensin I-converting enzyme triggers calcium signaling. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 57 (5), S. 965–972.
- Hartman, H. A.; Lai, H. L.; Patterson, L. T. (2007): Cessation of renal morphogenesis in mice. In: *Developmental biology* 310 (2), S. 379–387.
- Hato, T.; Winfree, S.; Dagher, P. C. (2017): Intravital imaging of the kidney. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 128, S. 33–39.
- Huckle, W. R.; Earp, H.S. (1994): Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II. In: *Progress in Growth Factor Research* 5 (2), S. 177–194.
- Humphreys, B. D.; Valerius, M. T.; Kobayashi, A.; Mugford, J. W.; Soeung, S.; Duffield, J. S. et al. (2008): Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. In: *Cell stem cell* 2 (3), S. 284–291.
- Innocente, S. A.; Abrahamson, J. L. A.; Cogswell, J. P.; Lee, J. M. (1999): p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (5), S. 2147–2152.
- Johnson, H. A.; Vera Roman, J. M. (1966): Compensatory renal enlargement. Hypertrophy versus hyperplasia. In: *The American Journal of Pathology* 49 (1), S. 1–13.
- Juers, D. H.; Matthews, B. W.; Huber, R. E. (2012): LacZ β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 21 (12), S. 1792–1807.

- Juríková, M.; Danihel, Ľ.; Polák, Š.; Varga, I. (2016): Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. In: *Acta histochemica* 118 (5), S. 544–552.
- Kahle, W.; Frotscher, M.; Spitzer, G. (Hg.) (2009): Taschenatlas Anatomie. Innere Organe. 10., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme (Taschenatlas der Anatomie, in 3 Bänden ; Bd. 3).
- Kakinuma, Y.; Kawamura, T.; Bills, T.; Yoshioka, T.; Ichikawa, I.; Fogo, A. (1992): Blood pressure-independent effect of angiotensin inhibition on vascular lesions of chronic renal failure. In: *Kidney International* 42 (1), S. 46–55.
- Kale, .S; Karihaloo, A.; Clark, P. R.; Kashgarian, M.; Krause, D. S.; Cantley, L. G. (2003): Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. In: *The Journal of clinical investigation* 112 (1), S. 42–49.
- Kim, H. O.; Chae, S.-Y.; Baek, S.; Moon, D. H. (2010): Factors Affecting Changes in the Glomerular Filtration Rate after Unilateral Nephrectomy in Living Kidney Donors and Patients with Renal Disease. In: *Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 44 (1), S. 69–74.
- Klinke, R.; Pape, H.-C.; Silbernagl, S. (Hg.) (2005): Physiologie. 5., komplett überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Klochender, A.; Weinberg-Corem, N.; Moran, M.; Swisa, A.; Pochet, N.; Savova, V. et al. (2012): A transgenic mouse marking live replicating cells reveals in vivo transcriptional program of proliferation. In: *Developmental cell* 23 (4), S. 681–690.
- Kohlstedt, K.; Brandes, R. P.; Müller-Esterl, W.; Busse, R.; Fleming, I. (2004): Angiotensin-converting enzyme is involved in outside-in signaling in endothelial cells. In: *Circulation research* 94 (1), S. 60–67.
- Kohlstedt, K.; Busse, R.; Fleming, I. (2005): Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 45 (1), S. 126–132.
- Kramann, R.; Kusaba, T.; Humphreys, B. D. (2015): Who regenerates the kidney tubule? In: *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 30 (6), S. 903–910.

- Krivosíková, Z.; Sebeková, K.; Spustová, V.; Lajdová, I.; Dzúrik, R. (1999): Enalapril in subantihypertensive dosage attenuates kidney proliferation and functional recovery in normotensive ablation nephropathy of the rat. In: *Physiological research* 48 (6), S. 429–435.
- Larsson, L.; Aperia, A.; Wilton, P. (1980): Effect of normal development on compensatory renal growth. In: *Kidney International* 18 (1), S. 29–35.
- Lin, F. (2003): Hematopoietic Stem Cells Contribute to the Regeneration of Renal Tubules after Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 14 (5), S. 1188–1199.
- Maeshima, A. (2003): Identification of Renal Progenitor-Like Tubular Cells that Participate in the Regeneration Processes of the Kidney. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 14 (12), S. 3138–3146.
- Márquez, M. G.; Cabrera, I.; Serrano, D. J.; Sterin-Speziale, N. (2002): Cell proliferation and morphometric changes in the rat kidney during postnatal development. In: *Anatomy and embryology* 205 (5-6), S. 431–440.
- McEwan, P. E.; Vinson, G. P.; Kenyon, C. J. (1999): Control of adrenal cell proliferation by AT 1 receptors in response to angiotensin II and low-sodium diet. In: *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 276 (2), E303-E309.
- McMahon, A. P. (2016): Development of the Mammalian Kidney. In: *Current topics in developmental biology* 117, S. 31–64.
- Moonen, L.; D’Haese, P. C.; Vervaet, B. A. (2018): Epithelial Cell Cycle Behaviour in the Injured Kidney. In: *International Journal of Molecular Sciences* 19 (7).
- Moskowitz, D. W.; Gillespie, K. N.; Sutera, S. P.; Druce, H. M.; Merli, C. A.; Simon, E. E. (1996): Evidence for acute renal cortical vasoconstriction after uninephrectomy. In: *Renal failure* 18 (6), S. 833–846.
- Mulisch, M.; Welsch, U. (Hg.) (2015): Romeis Mikroskopische Technik. 19. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

- Nadasdy, T.; Laszik, Z.; Blick, K. E.; Johnson, L. D.; Silva, F. G. (1994): Proliferative activity of intrinsic cell populations in the normal human kidney. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 4 (12), S. 2032–2039.
- Oheim, M.; Michael, D. J.; Geisbauer, M.; Madsen, D.; Chow, R. H. (2006): Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. In: *Advanced drug delivery reviews* 58 (7), S. 788–808.
- Oliver, J. A.; Maarouf, O.; Cheema, F. H.; Martens, T. P.; Al-Awqati, Q. (2004): The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. In: *The Journal of clinical investigation* 114 (6), S. 795–804.
- Pasala, S.; Carmody, J. B. (2017): How to use... serum creatinine, cystatin C and GFR. In: *Archives of disease in childhood. Education and practice edition* 102 (1), S. 37–43.
- Paulini, K., Beneke, G.; Kulka, R. Virchows (1970): Die Altersabhängigkeit der sog. Nierenhypertrophie nach einseitiger Nephrektomie.
- Phillips, T.; Leong G. F. (1967): Kidney cell proliferation after unilateral nephrectomy as related to age. In: *Cancer research*.
- Pill, J.; Kraenzlin, B.; Jander, J.; Sattelkau, T.; Sadick, M.; Kloetzer, H.-M. et al. (2005): Fluorescein-labeled sinistrin as marker of glomerular filtration rate. In: *European journal of medicinal chemistry* 40 (10), S. 1056–1061.
- Poulsom, R.; Forbes, S. J.; Hodivala-Dilke, K.; Ryan, E.; Wyles, S.; Navaratnasah, S. et al. (2001): Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. In: *The Journal of pathology* 195 (2), S. 229–235.
- Prescott, L. F. (1966): The normal urinary excretion rates of renal tubular cells, leucocytes and red blood cells. In: *Clinical science* 31 (3), S. 425–435.
- Richardson, R. B.; Allan, D. S.; Le, Y. (2014): Greater organ involution in highly proliferative tissues associated with the early onset and acceleration of ageing in humans. In: *Experimental gerontology* 55, S. 80–91.
- Richer-Giudicelli, C.; Domergue, V.; Gonzalez, M.-F.; Messadi, E.; Azizi, M.; Giudicelli, J.-F.; Ménard, J. (2004): Haemodynamic effects of dual blockade of the renin-angiotensin

system in spontaneously hypertensive rats: influence of salt. In: *Journal of hypertension* 22 (3), S. 619–627.

Rodrigues, M. A.; Gomes, D. A.; Leite, M. F.; Grant, W.; Zhang, L.; Lam, W. et al. (2007): Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (23), S. 17061–17068.

Rogers, N. M.; Ferenbach, D. A.; Isenberg, J. S.; Thomson, A. W.; Hughes, J. (2014): Dendritic cells and macrophages in the kidney: a spectrum of good and evil. In: *Nature reviews. Nephrology* 10 (11), S. 625–643.

Salic, A.; Mitchison, T. J. (2008): A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (7), S. 2415–2420.

Sanderson, M. J.; Smith, I.; Parker, I.; Bootman, M. D. (2014): Fluorescence microscopy. In: *Cold Spring Harbor protocols* 2014 (10), pdb.top071795.

Schießl, I. M.; Hammer, A.; Riquier-Brison, A.; Peti-Peterdi, J. (2016): Just Look! Intravital Microscopy as the Best Means to Study Kidney Cell Death Dynamics. In: *Seminars in nephrology* 36 (3), S. 220–236.

Schmidt, K.; Ripper, M.; Tegtmeier, I.; Humberg, E.; Sterner, C.; Reichold, M. et al. (2013): Dynamics of renal electrolyte excretion in growing mice. In: *Nephron. Physiology* 124 (3-4), S. 7–13.

Schmitt, R.; Cantley, L. G. (2008): The impact of aging on kidney repair. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 294 (6), F1265-72.

Schnaper, H. W. (2013): Remnant nephron physiology and the progression of chronic kidney disease. In: *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 29 (2).

Schwechheimer, K. (1990): Proliferationsmarker. In: K. Schwechheimer (Hg.): *Pathologie des Nervensystems IV. Spezielle Immunmorphologie neurogener Geschwülste*, 13 / 4. Berlin, Heidelberg: Springer (Spezielle pathologische Anatomie, Ein Lehr- und Nachschlagewerk, 13 / 4), S. 193–197.

Schweda, F. (2015): Salt feedback on the renin-angiotensin-aldosterone system. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 467 (3), S. 565–576.

Sequeira Lopez, M. L. S.; Gomez, R. A. (2011): Development of the renal arterioles. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 22 (12), S. 2156–2165.

Siegenthaler, W.; Amann-Vesti, B. R. (2006): *Klinische Pathophysiologie*: Thieme. Online verfügbar unter https://books.google.de/books?id=360YvLkY_5cC.

Stevens, L. A.; Levey, A. S. (2009): Measured GFR as a confirmatory test for estimated GFR. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 20 (11), S. 2305–2313.

Strandgaard, S.; Kamper, A.; Skaarup, P.; Holstein-Rathlou, N. H.; Leyssac, P. P.; Munck, O. (1988): Changes in glomerular filtration rate, lithium clearance and plasma protein clearances in the early phase after unilateral nephrectomy in living healthy renal transplant donors. In: *Clin. Sci.* 75 (6), S. 655–659.

Strehl, R.; Schumacher, K.; Vries, U. de; Minuth, W. W. (2002): Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering. In: *Tissue engineering* 8 (1), S. 37–42.

Strutz, F.; Zeisberg, M.; Hemmerlein, B.; Sattler, B.; Hummel, K.; Becker, V.; Müller, G. A. (2000): Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. In: *Kidney International* 57 (4), S. 1521–1538.

Sudakin, V.; Ganoth, D.; Dahan, A.; Heller, H.; Hershko, J.; Luca, F. C. et al. (1995): The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. In: *Molecular Biology of the Cell* 6 (2), S. 185–197.

Takizawa, T.; Kawahata, M.; Ikeda, Y.; Yamamoto, M.; Arishima, K.; Muto, M.; Masaoka, T. (1999): Smooth Muscle Cell Proliferation in the Ductus Arteriosus and the Descending Aorta, and Effects of Enalapril on SMC Proliferation in Perinatal Rats. In: *Journal of Veterinary Medical Science* 61 (11), S. 1215–1218.

van Deursen, J. M. (2014): The role of senescent cells in ageing. In: *Nature* 509 (7501), S. 439–446.

Vogetseder, A.; Karadeniz, A.; Kaissling, B.; Le Hir, M. (2005): Tubular cell proliferation in the healthy rat kidney. In: *Histochemistry and cell biology* 124 (2), S. 97–104.

Welsh-Bacic, D.; Nowik, M.; Kaissling, B.; Wagner, C. A. (2011): Proliferation of Acid-Secretory Cells in the Kidney during Adaptive Remodelling of the Collecting Duct. In: *PLoS ONE* 6 (10).

Wolf, G.; Neilson, E. G. (1991): Molecular mechanisms of tubulointerstitial hypertrophy and hyperplasia. In: *Kidney International* 39 (3), S. 401–420.

Yamashita, S.; Maeshima, A.; Nojima, Y. (2005): Involvement of renal progenitor tubular cells in epithelial-to-mesenchymal transition in fibrotic rat kidneys. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 16 (7), S. 2044–2051.

Yang, H.; Fogo, A. B. (2010): Cell senescence in the aging kidney. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21 (9), S. 1436–1439.

Ye, C.; Wang, J.; Wu, P.; Li, X.; Chai, Y. (2016): Prognostic role of cyclin B1 in solid tumors: a meta-analysis. In: *Oncotarget* 8 (2), S. 2224–2232.

Yoo, K. H.; Wolstenholme, J. T.; Chevalier, R. L. (1997): Angiotensin-converting enzyme inhibition decreases growth factor expression in the neonatal rat kidney. In: *Pediatric research* 42 (5), S. 588–592.

9 Anhang

9.1 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Mit dem 2-Photonenmikroskop aufgenommener Kachelscan eines Nierenschnittes.....	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Nephrons.....	2
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zellzyklus.	7
Abbildung 4: Beispiel einer Aufnahme aus dem Cortex.....	23
Abbildung 5: Visualisierung der proliferierenden Zellen.....	31
Abbildung 6: Zellteilungsaktivität in der gesamten Niere mit zunehmendem Lebensalter	32
Abbildung 7: Verteilung der Zellteilungsaktivität in der Niere mit zunehmendem Lebensalter.....	33
Abbildung 8: Teilungsrate in den Zellen des Interstitiums mit zunehmendem Lebensalter.....	34
Abbildung 9: Vergleich der Zellteilungsaktivität nach Behandlung mit einem ACE-Hemmer mit unbehandelten Kontrolltieren	35
Abbildung 10: Änderungen der Proliferationsrate in Cortex und Medulla nach Behandlung mit Enalapril und Low-Salt-Diät	36
Abbildung 11: Zellteilungsaktivität im Interstitium nach Behandlung mit Enalapril und Low-Salt-Diät im Vergleich mit Kontrolltieren	37

Abbildung 12: Entwicklung der Proliferationsrate eine Woche nach unilateraler Nephrektomie in verschiedenen Altersgruppen.....	39
Abbildung 13: Entwicklung der Zellteilungsrate im Cortex eine Woche nach unilateraler Nephrektomie	41
Abbildung 14: Entwicklung der Zellteilungsrate in der Medulla eine Woche nach unilateraler Nephrektomie.	42
Abbildung 15: Entwicklung der Zellteilungsaktivität im Interstitium eine Woche nach unilateraler Nephrektomie	43
Abbildung 16: Entwicklung der Zellteilungsaktivität im Interstitium des Cortex eine Woche nach unilateraler Nephrektomie	45
Abbildung 17: Entwicklung der Zellteilungsaktivität im Interstitium der Medulla eine Woche nach unilateraler Nephrektomie	46
Abbildung 18: Zellteilungsaktivität in der Niere zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach unilateraler Nephrektomie	47
Abbildung 19: Zellteilungsaktivität in Cortex (A) und Medulla (B) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach unilateraler Nephrektomie	48
Abbildung 20: Entwicklung des Trockengewichtes der kontralateralen Niere nach unilateraler Nephrektomie	49
Abbildung 21: Proliferationsrate in der Niere 7 Tage nach unilateraler Nephrektomie .	50
Abbildung 22: Zellteilung in Cortex (A) und Medulla (B) 7 Tage nach unilateraler Nephrektomie.....	51
Abbildung 23: Proliferationsrate in der Niere 7 Tage nach unilateraler Nephrektomie .	53

Abbildung 24: Megalin-Färbung im Nierencortex	54
Abbildung 25: pNCC-Färbung im Nierencortex	55
Abbildung 26: SCCalpha1-Färbung im Nierencortex.....	56
Abbildung 27: CD11c-Färbung im Nierencortex	57
Abbildung 28: Aquaporin2-Färbung in der Medulla	58
Abbildung 29: V-ATPase-Färbung in der Medulla	59
Abbildung 30: Pendrin-Färbung in der Medulla.....	60
Abbildung 31: NKCC2-Färbung in der Medulla	61
Abbildung 32: Veränderungen der Proliferationsrate von Zellen im Sammelrohr und in der Henle-Schleife nach unilateraler Nephrektomie	63
Tabelle 1: Übersicht über die angefertigten immunhistochemischen Färbungen	62

9.2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
α	alpha
β	beta
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μm^3	Kubikmikrometer
Aa.	Arteriae
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AK	Antikörper
AngI	Angiotensin I
AngII	Angiotensin II
AP2	Aquaporin 2
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CA^{2+}	ionisiertes Calcium
CD	Cluster of Differentiation
CK2	Casein- Kinase 2
Cl	Chlorid
Cy 5	Cyanine 5
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
GFP	Green Fluorescent Protein
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
HS	Horse Serum
I.E.	internationale Einheiten
K	Kalium
kg	Kilogramm

KGW	Körpergewicht
l	Liter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NCC	Natrium-Chlorid-Cotransporter
NKCC2	Na-K-Cl-Cotransporter
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
ns	nicht signifikant
OP	Operation
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Proliferative Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SGC	Soluble Guanylyl Cyclase
TGFβ1	Transforming Growth Factor beta 1
V-ATPase	vakuoläre H ⁺ -ATPase
Vol%	Volumenprozent

10 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Castrop für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Möglichkeit, Einblicke in die Forschung zu gewinnen und für die Betreuung während der Entstehung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Wanke danke ich für die Übernahme der Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und für seine Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Außerdem danke ich Katharina Fremter für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen und für die Betreuung meiner Versuchstiere. Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter des Institutes, die stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatten und sich immer die Zeit genommen haben, eine Lösung für Probleme zu finden.

Vera Ziegler danke ich für ihre Hilfe bei den GFR-Messungen und für das freundschaftliche Miteinander in der Arbeitsgruppe – schade, dass du erst so spät zu uns gestoßen bist.

Mein ganz besonderer Dank gilt Carla Gerhard, die im Laufe der zwei Jahre von einer Kollegin zur Freundin geworden ist und viel dazu beigetragen hat, dass ich mich in Regensburg wohlfühlt habe. Durch dich ist die gute Laune neben der Arbeit nie verloren gegangen und ich finde, wir waren ein tolles Team.

Meinen Freunden danke ich dafür, dass die Fernbeziehung nach Regensburg wunderbar funktioniert hat!

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die mich immer unterstützen und mir stets ermöglicht haben, meine Ziele zu verfolgen. Ohne euch wäre diese Arbeit nie entstanden! Vielen Dank auch an meine Schwester Viktoria für ihre Unterstützung und die vielen aufmunternden Worte, wenn zwischendurch auch mal schwierige Phasen überwunden werden mussten.

Vor allem gilt mein Dank meinem Freund Lars, der ohne zu zögern mit mir nach Regensburg gezogen ist. Danke für deine Geduld, für deine gute Laune und dafür, dass du es immer wieder geschafft hast, mich aufzubauen, wenn es zwischendurch mal schwierig geworden ist.