

## 5. Zusammenfassung

Rainer Cermak

Elektrophysiologische Untersuchungen der Wirkungen natriuretischer Peptide auf verschiedene Zelltypen der Niere

\*\*\*

Natriuretische Peptide bewirken in der Niere eine Natriuresis und Diuresis. Sie üben ihre Wirkung dabei v.a. über eine Erhöhung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) und durch die Hemmung der  $\text{Na}^+$ -Absorption im papillären Sammelrohr aus.

In kultivierten Mesangialzellen des Glomerulus (MZ) können sie die von Vasokonstriktoren wie Angiotensin II (A II) -induzierte Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) und die daraufhin erfolgende Kontraktion dieser Zellen inhibieren, was ihren GFR-steigernden Effekt zum Teil erklären kann.

Im proximalen Tubulus und im kortikalen Sammelrohr ist eine mögliche Wirkung dieser Peptide umstritten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß natriuretischer Peptide auf das Membranpotential ( $V_m$ ) und Membranleitfähigkeiten ( $G_m$ ) verschiedener Nierenzellen mit der *patch clamp* Technik untersucht. Hierbei handelte es sich um MZ der Ratte in Primärkultur, die porcine Nierenzelllinie LLC-PK<sub>1</sub> als Modell für den proximalen Tubulus und Hauptzellen des frisch isolierten kortikalen Sammelrohrs der Ratte (*cortical collecting duct / CCD*). Neben den natriuretischen Peptiden Cardiodilatin/Atriales Natriuretisches Peptid-99-126 (CDD/ANP-99-126; ANP), Cardiodilatin/Atriales Natriuretisches Peptid-95-126 (CDD/ANP-95-126; Urodilatin), B-Typ natriuretisches Peptid (BNP) und C-Typ natriuretisches Peptid (CNP) wurden auch die Peptide Guanylin und Uroguanylin, welche ebenfalls über eine membranständige Guanylatzyklase als Rezeptor wirken, getestet.

Es konnte erstmals gezeigt werden, daß in MZ CDD/ANP-99-126, CDD-95-126 und BNP über ihren intrazellulären Botenstoff cGMP eine  $K^+$ -Leitfähigkeit aktivierten, während CNP, Guanylin und Uroguanylin keine Wirkung auf  $V_m$  zeigten. Diese  $K^+$ -Leitfähigkeit ließ sich weder durch den  $K^+$ -Kanalinh inhibitor 293 B, noch durch den  $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanalöffner Cromakalim beeinflussen und war additiv zu der durch Adenosin in MZ induzierten  $K^+$ -Leitfähigkeit. CDD/ANP-99-126 war nicht in der Lage, die Höhe der durch A II ausgelösten Depolarisation in MZ zu modulieren, beschleunigte allerdings die anschließende Repolarisation von  $V_m$  zu basalen Werten.

Der Mechanismus, über den natriuretische Peptide die Effekte der Vasokonstriktoren auf  $[Ca^{2+}]_i$  und Kontraktion antagonisieren, ist demnach weiterhin unklar; er scheint aber unabhängig von  $V_m$  zu sein.

In LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen konnte keines der untersuchten Peptide einen signifikanten Einfluß auf  $V_m$  zeigen. Dies steht im Widerspruch zu Untersuchungen, die einen direkten Effekt der Peptide auf elektrogene Transportprozesse in diesen Zellen vermuten lassen. Die Übertragbarkeit der an dieser Dauerzelllinie gewonnenen Daten auf die *in vivo* Situation im proximalen Tubulus ist allerdings begrenzt.

Auch in den Hauptzellen des kortikalen Sammelrohrs der Ratte zeigte keines der Peptide eine Wirkung auf  $V_m$ . Dieses Ergebnis unterstützt andere Untersuchungen, welche ebenfalls keinen Effekt der Peptide auf elektrogene Transportprozesse in diesem Nephronsegment zeigen konnten. Damit kann eine physiologische Bedeutung der natriuretischen Peptide bei der Elektrolytregulation im CCD ausgeschlossen werden.

Die Frage nach einem physiologischen Agonisten für nachgewiesene cGMP-gesteuerte  $K^+$ -Kanäle in diesen Zellen bleibt dagegen offen.

## 6. Summary

Rainer Cermak

Electrophysiological studies of natriuretic peptide effects on different cell types in the kidney

\*\*\*

Natriuretic peptides induce natriuresis and diuresis in the kidney. They increase, hereby, glomerular filtration rate (GFR) and block  $\text{Na}^+$  absorption in the papillary collecting duct.

In cultivated glomerular mesangial cells (MC), natriuretic peptides inhibit the angiotensin II (A II) induced rise in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -activity ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) and, therefore, the constriction of MC induced by this and other vasoconstrictors. This mechanism partly explains the GFR-accelerating effect of natriuretic peptides.

For the proximal tubule and the cortical collecting duct, possible effects of natriuretic peptides are discussed controversially in literature.

In this thesis, the effect of natriuretic peptides on membrane voltage ( $V_m$ ) and membrane conductances ( $G_m$ ) of several different kidney cells was studied with the patch clamp technique. The different cell types were rat MC in primary culture, porcine LLC-PK<sub>1</sub> kidney-cells as a model for the proximal tubule, and principal cells of freshly isolated rat cortical collecting ducts (CCD). Besides the natriuretic peptides Cardiodilatin/Atrial Natriuretic Peptide-99-126 (CDD/ANP-99-126; ANP), Cardiodilatin/Atrial Natriuretic Peptide-95-126 (CDD/ANP-95-126 Urodilatin), B-type natriuretic peptide (BNP) and C-type natriuretic peptide (CNP), the peptides Guanylin and Uroguanylin, which act via a membrane bound guanylate cyclase, were also tested.

In MC CDD/ANP-99-126, CDD/ANP-95-126 and BNP could increase a  $K^+$  conductance via their putative second messenger cGMP, whereas CNP, Guanylin and Uroguanylin had no effect on  $V_m$ . This  $K^+$  conductance could neither be modulated by the  $K^+$  channel blocker 293 B, nor by the  $K^+$  channel opener cromakalim. It was additive to the adenosine induced  $K^+$  conductance in MC. CDD/ANP-99-126 failed to influence the AII induced depolarisation, but accelerated the repolarisation to basal values.

The mechanism, by which natriuretic peptides antagonize vasoconstrictor effects on  $[Ca^{2+}]_i$  and constriction, is still not clear. This mechanism however does not seem to involve  $V_m$  changes.

None of the tested peptides could induce significant membrane voltage changes in LLC-PK<sub>1</sub> cells. This is in contradiction to other studies which suppose an effect of natriuretic peptides on electrogenic ion transport in this cell line. The interpretation of these data for the situation in the proximal tubule has to be considered carefully, however.

In principal cells of rat cortical collecting duct, all peptides also failed to induce significant  $V_m$  changes. This result supports other studies, which were unable to show an effect of natriuretic peptides on electrolyte transport in this nephron segment. A physiological role for natriuretic peptides on electrogenic ion transport in rat CCD can, therefore, be denied.

The possibility for another physiological agonist of cGMP activated  $K^+$  channels in these cells is still open.