

**Der Podozyt als Zielstruktur
der renalen Wirkungen
der kardialen natriuretischen Peptide**



DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Janina Staffel

aus
Arnstadt

im Jahr
2016

Die vorliegende Doktorarbeit entstand im Zeitraum von August 2012 bis Juli 2016 unter der Anleitung von Prof. Dr. med. Frank Schweda am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Teile der Arbeit wurden im „Journal of the American Association of Nephrology“ veröffentlicht. Die Erlaubnis des Journals zur Verwendung der Daten wurde eingeholt und vom Journal bewilligt. Beteiligte Personen, die Versuche angeleitet oder maßgeblich durchgeführt haben, sind im Methodenteil namentlich erwähnt.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 01.07.2016

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. med. Richard Warth
1. Gutachter / Prüfer:	Prof. Dr. med. Frank Schweda
2. Gutachter / Prüfer:	Prof. Dr. rer. nat. Hayo Castrop
3. Prüfer:	Prof. Dr. rer. nat. Jens Schlossmann
Ersatzprüfer:	Prof. Dr. med. vet. Dr. rer. nat. Michael Krahn

Unterschrift:

(Janina Staffel)

Meiner Mutter

Karin Staffel

(1957 - 2008)

"Unsere größte Schwäche liegt im Aufgeben.

Der sicherste Weg zum Erfolg ist immer,

es doch noch einmal zu versuchen."

(Thomas Alva Edison)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung und Zielsetzung	3
3 Grundlagen und bisherige Erkenntnisse.....	5
3.1 Grundlagen der Nierenanatomie und -funktion.....	5
3.1.1 Die Regulation der glomerulären Filtrationsrate	7
3.1.2 Der Feinbau des glomerulären Filters.....	9
3.2 Anatomie und (Patho-) Physiologie des Podozyten	12
3.2.1 Komponenten des podozytären Zytoskeletts und der Schlitzmembran	12
3.2.2 Kontraktilität der Podozyten und mögliche Bedeutung für die GFR.....	15
3.2.3 Schädigung des Podozyten und Entstehung der Proteinurie	17
3.3 Die natriuretischen Peptide	20
3.3.1 ANP und BNP - Ein Vergleich.....	21
3.3.2 Topologie, Aktivierung und Expression der GC-A.....	24
3.3.3 cGMP abhängige Signalmechanismen	26
3.3.4 Physiologische Bedeutung der kardialen natriuretischen Peptide	28
3.3.5 Elimination der kardialen natriuretischen Peptide	31
3.3.6 Pathophysiologische Bedeutung der kardialen natriuretischen Peptide	32
4 Methoden.....	35
4.1 Generierung und Genotypisierung der Mauslinien.....	35
4.1.1 Podo GC-A KO.....	35
4.1.2 Podo GC-A KO mTmG	36
4.1.3 Genotypisierung	36
4.2 Haltung der Versuchstiere	38
4.3 Behandlungs-Modelle.....	39
4.3.1 Unilaterale Nephrektomie	39
4.3.2 BNP-Infusion	39
4.3.3 Das „DOCA-Salt“ Modell.....	41

4.4	Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate.....	42
4.4.1	FITC-Sinistrin- „Single shot“ Clearance im wachen Tier	43
4.4.2	FITC-Sinistrin-Clearance im narkotisierten Tier.....	43
4.5	Blutdruckmessung	44
4.5.1	„Tail cuff“- Methode	44
4.5.2	Katheterisierung der Arteria carotis	45
4.6	Blutanalysen	45
4.6.1	Blut- und Plasmavolumenbestimmung	45
4.6.2	Bestimmung der Plasma-Renin-Konzentration.....	46
4.6.3	Bestimmung der Plasma-Konzentrationen von ANP und BNP	47
4.6.4	Bestimmung der Plasma-Albumin-Konzentration	47
4.6.5	Bestimmung der Plasma-Kreatinin-Konzentration	48
4.7	Urinalysen.....	48
4.7.1	Spontanurinsammlung	48
4.7.2	Stoffwechsellkäfige	48
4.7.3	Bestimmung der Natrium-Ausscheidung	48
4.7.4	Bestimmung der Albumin-Ausscheidung.....	49
4.7.5	Bestimmung der Kreatinin-Ausscheidung.....	50
4.8	Isolierung der Glomeruli und der Podozyten	50
4.8.1	„Magnetic Beads“ – Methode	50
4.8.2	Mikrodissektion	50
4.8.3	Isolierung der Podozyten durch FACS	51
4.9	RNA-Isolierung und -Analyse.....	52
4.9.1	Isolierung der Messenger-RNA aus Zellen.....	52
4.9.2	Reverse Transkription	53
4.9.3	Quantitative Echtzeit-PCR.....	53
4.10	Histologische Untersuchung der Nieren.....	54
4.10.1	Perfusionsfixierung mit Paraformaldehyd	55
4.10.2	Anfertigung und Einbettung der Nierenschnitte	55
4.10.3	Histochemische Analysen	56

4.10.4	Licht- / Fluoreszenzmikroskopie	58
4.10.5	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	59
4.10.6	Western Blot-Analyse	59
4.11	Bestimmung des podozytären Ca ²⁺ -Influx	61
4.12	Statistische Analyse	62
5	Ergebnisse	63
5.1	Generierung und Charakterisierung der podozyten-spezifischen GC-A Knockout-Maus	64
5.1.1	Generierung der <i>NPHS2</i> -Cre x GC-A ^{flox/flox} (Podo GC-A KO) Maus.....	64
5.1.2	Untersuchung der GC-A Expression.....	67
5.1.3	Charakterisierung der Podo GC-A KO Maus	68
5.2	Einfluss von ANP und BNP auf die Regulation der GFR durch Aktivierung der podozytären GC-A.....	71
5.2.1	Untersuchungen zur funktionellen renalen Kompensation nach Uninephrektomie	71
5.2.2	BNP-Infusion in anästhesierten Podo GC-A KO und WT Mäusen	73
5.3	Untersuchung der nephroprotektiven Wirkung der kardialen natriuretischen Peptide durch Aktivierung der GC-A im Podozyten	76
5.3.1	Das „DOCA-Salz“ Modell.....	76
5.3.2	Untersuchung der funktionellen Rolle des TRPC6-Kanals in DOCA-behandelten Podo GC-A KO und WT Mäusen.....	94
6	Diskussion	107
6.1	Regulation der GFR durch die natriuretischen Peptide über die Aktivierung der GC-A in Podozyten.....	107
6.2	Nephroprotektive Wirkung der kardialen natriuretischen Peptide.....	110
6.3	Fazit	116
7	Quellenverzeichnis.....	117
8	Anhang I	132
8.1	Materialien und Geräte	132
8.1.1	Verbrauchsmaterial	132
8.1.2	Reagenzien	132

8.1.3	Assay Kits	133
8.1.4	Futtermittel	134
8.1.5	Primer	134
8.1.6	Antikörper	135
8.1.7	Puffer und Lösungen	135
8.1.8	Geräte	137
8.1.9	Verwendete Software	138
8.2	Abkürzungsverzeichnis	139
8.3	Abbildungsverzeichnis	141
8.4	Tabellenverzeichnis	143
8.5	Erklärungen zum Copyright	144
9	Anhang II	145
9.1	Publikationen	145
9.2	Präsentationen	145
9.2.1	Posterpräsentationen	145
9.2.2	Vorträge	146
9.3	Danksagung	147

1 Zusammenfassung

Einer der wichtigsten Parameter der Nierenfunktion ist die Filtration des Blutplasmas im Glomerulus. Das Blut wird von endo- und exogenen Stoffwechselabbauprodukten befreit und gereinigt. Zudem tragen die Nieren durch die Modulation der glomerulären Filtrationsrate (GFR) maßgeblich zur Regulation des Flüssigkeitshaushalts und des arteriellen Blutdrucks bei. Die kardialen natriuretischen Peptide, atriales natriuretisches Peptid (ANP) und B-Typ natriuretisches Peptid (BNP), spielen hierbei eine wichtige Rolle. Durch die Aktivierung ihres gemeinsamen Rezeptors, der membranständigen Guanylatzyklase A (GC-A) und der nachfolgenden cGMP-Ausschüttung bewirken sie im Glomerulus eine Steigerung der GFR, fördern die Natriuresis und Diuresis im Tubulussystem und modulieren den Blutgefäßwiderstand durch die Relaxation glatter Muskelzellen. Die GC-A ist im gesamten Nephron in verschiedenen Zelltypen exprimiert, unter anderem auch in den Podozyten, die einen wichtigen Teil der glomerulären Filtrationsbarriere bilden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Aktivierung der Guanylatzyklase A durch die kardialen natriuretischen Peptide ANP und BNP im Podozyten auf die Regulation der glomerulären Filtrationsrate ausübt. Anhand einer podozytenspezifischen GC-A Knockout-Maus (Podo GC-A KO) wurden renale und kardiovaskuläre Parameter sowohl nach unilateraler Nephrektomie als auch nach Infusion von BNP untersucht und mit den Wurfgeschwistern (Podo GC-A WT) verglichen. Der Verlust einer Niere führte sowohl in den Podo GC-A WT als auch in den Podo GC-A KO Mäusen innerhalb kurzer Zeit zu einem rapiden Anstieg der GFR. Auch die BNP-Infusion in narkotisierten Versuchstieren ging in beiden Genotypen mit einer Steigerung der GFR sowie einer Diuresis und Natriuresis einher. Somit scheinen die Podozyten, obwohl sie, verglichen mit allen anderen glomerulären Zellen die höchste Expression der GC-A aufweisen, keinen Einfluss auf die Regulation der glomerulären Filtrationsrate durch die natriuretischen Peptide zu nehmen.

In einem weiteren Experiment wurde eine mögliche direkte nephroprotektive Wirkung von ANP und BNP in den Podozyten untersucht. Die Applikation des Mineralokortikoids Deoxycorticosteronacetat (DOCA) in Kombination mit einer unilateralen Nephrektomie und einer Hochsalzdiät führte sowohl in den Podo GC-A KO als auch in den Podo GC-A WT Mäusen zu einer leichten Hypertension, einer Hyperfiltration und einem Anstieg des Nierengewichts. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen zeigten die Podo GC-A KO Mäuse jedoch eine massive Albuminurie (5400-fach vs. basal; 200-fach vs. DOCA-behandelte Podo GC-A WT), die mit einer Hypoalbuminämie und einer reduzierten glomerulären Filtrationsrate einherging. Zudem wiesen die Nieren der Podo GC-A KO Mäuse

gravierende Schädigungen auf, die durch eine Expansion des glomerulären Mesangiums sowie interstitielle und tubuläre Fibrose gekennzeichnet waren. Unter dem Elektronenmikroskop waren stark veränderte Podozyten mit verbreiterten, verschmolzenen Fußfortsätzen in den Glomeruli der DOCA-behandelten Knockout-Mäuse erkennbar, während die podozytären Ausläufer der DOCA-behandelten Podo GC-A Wildtyp-Mäuse eine typische Form aufwiesen und normal miteinander interagierten. Die Podozyten der Podo GC-A KO Mäuse zeigten außerdem eine verminderte Expression der Schlitzmembran-assoziierten Proteine Podocin und Synaptopodin, während die Expression des „Transient receptor potential canonical channel 6“ (TRPC6) in den Knockouts, verglichen mit den gleich behandelten Wildtypen, erhöht war. Weiterhin wurde in den Podozyten frisch isolierter Knockout-Glomeruli nach DOCA-Behandlung ein erhöhter ATP-induzierter Calcium-Influx gemessen, der durch die Applikation des TRPC-Kanal-Blockers SKF 96365 inhibiert werden konnte. *In vivo* führte die begleitende Behandlung der Podo GC-A KO Mäuse mit SKF 96365 zu einer deutlichen Verminderung der durch DOCA verursachten Albuminurie und der glomerulären Schädigung sowie zum Erhalt der podozytären Proteine und der Struktur der podozytären Fußfortsätze.

Somit zeigen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zum ersten Mal, dass die kardialen natriuretischen Peptide ANP und BNP, zumindest unter pathologischen Bedingungen, über die Aktivierung ihres Rezeptors GC-A eine direkte, zelluläre nephroprotektive Wirkung besitzen, die wahrscheinlich über die Suppression des TRPC6-Kanals in den Podozyten vermittelt wird.

2 Einleitung und Zielsetzung

Durch die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme sowie durch Salz- und Wasserverluste über den Harn, den Schweiß und die Atmung ist unser Organismus einer ständigen Veränderung des Flüssigkeitsvolumens und der Konzentration der enthaltenen Elektrolyte ausgesetzt. Eine ausgeglichene Zusammensetzung der Körperflüssigkeit und ein konstantes Volumen sind jedoch sehr wichtig für die Aufrechterhaltung lebenswichtiger Körperfunktionen, wie z.B. des Blutdrucks und des Blutvolumens. Hier sorgen vor allem die Nieren innerhalb kürzester Zeit für die Wiederherstellung des Gleichgewichts, indem über die Regulation der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und die Kontrolle der Zusammensetzung des Endharns im Tubulussystem die Elektrolyt- und Wasserausscheidung dem Bedarf angepasst werden kann. Die kardialen natriuretischen Peptide (NP) ANP und BNP spielen hierbei eine wichtige Rolle. Sie sind in der Lage, die glomeruläre Filtrationsrate zu steigern und durch Natriurese und Diurese das Flüssigkeitsvolumen zu modulieren. Außerdem senken sie durch die Aktivierung ihres gemeinsamen Rezeptors, der membranständigen Guanylatzyklase A (GC-A), den Gefäßwiderstand, was zusätzlich zur Regulation des arteriellen Blutdrucks beiträgt.

Die Mechanismen der GFR-Regulation durch ANP und BNP sind noch nicht abschließend geklärt. Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen eine maßgebliche Rolle der natriuretischen Peptide für die funktionelle Anpassung der Niere im Rahmen der renalen kompensatorischen Hypertrophie. Die Aktivierung der GC-A ist essentiell für den initialen, schnellen Anstieg der GFR, der schon innerhalb von drei bis vier Tagen nach unilateraler Nephrektomie stattfindet. In welchen Zellen die funktionssteigernde Wirkung von ANP und BNP vermittelt wird, steht derzeit im Fokus der Forschung.

Eine mögliche Beteiligung der kontraktilen Podozyten an der Regulation der GFR wird gegenwärtig kontrovers diskutiert. Diese hochspezialisierten Zellen schränken mit ihren Fußfortsätzen und durch die Ausbildung einer Schlitzmembran die Filtration von Makromolekülen wie Albumin in den Primärharn ein und bilden somit einen wesentlichen Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere. Da die GC-A im Podozyten exprimiert ist und da ANP und BNP die GFR durch die Beeinflussung des Filtrationskoeffizienten und des Kapillardrucks steigern, ist eine Beteiligung der podozytären GC-A an der Regulation der GFR durch natriuretische Peptide durchaus denkbar. Diese Hypothese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit an einer podozytenspezifischen GC-A Knockout-Maus untersucht.

Aktuelle Studien zeigen eine nephroprotektive Wirkung natriuretischer Peptide. Die Überexpression von BNP in der Leber oder auch die perioperative Infusion von ANP im

Rahmen herzchirurgischer Maßnahmen wirkten sich positiv auf die Nierenfunktion und die Erhaltung funktionsfähigen Nierengewebes aus. Wie die natriuretischen Peptide ihre nephroprotektive Wirkung entfalten ist bisher nicht ausreichend erforscht. Da sie maßgeblich zur Senkung des Blutdrucks durch Volumenregulation und Antagonisierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und des sympathischen Nervensystems beitragen, wäre es möglich, dass sie ihre nephroprotektive Wirkung über diese systemischen Mechanismen entfalten. Eine weitere Option ist ein direkter zellulärer Angriff der natriuretischen Peptide in den Podozyten des Glomerulus.

Mutationen der podozytären Schlitzmembranproteine gehen mit einer Proteinurie einher und auch primäre Nierenerkrankungen wie die idiopathische fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) sind durch eine erhöhte Ausscheidung von Proteinen wie Albumin charakterisiert. Darüber hinaus können auch im Rahmen sekundärer renaler Erkrankungen, wie diabetischer oder hypertensiver Nephropathie, große Mengen an Protein im Endharn detektiert werden. Eine Protektion der Podozyten durch natriuretische Peptide würde der Schädigung des glomerulären Filters und der damit einhergehenden Proteinurie vorbeugen und langfristig die Funktion des Nephrons bewahren. Auch diese Hypothese wurde anhand einer podozytenspezifischen GC-A Knockout-Maus untersucht.

Ziel dieser Arbeit war somit die Beantwortung der folgenden Fragestellungen:

- I. Ist die Aktivierung der GC-A durch die kardialen natriuretischen Peptide im Podozyten an der Regulation der glomerulären Filtrationsrate beteiligt?
- II. Geht die nephroprotektive Wirkung von ANP und BNP von der direkten Protektion und Erhaltung der Integrität des Podozyten aus?

Damit sollen die nephroprotektiven und funktionserhaltenden Mechanismen der natriuretischen Peptide genauer charakterisiert werden, um neue Therapieoptionen für Nierenerkrankungen herauszustellen, die mit dem Funktionsverlust der Glomeruli und einer Proteinurie einhergehen.

3 Grundlagen und bisherige Erkenntnisse

3.1 Grundlagen der Nierenanatomie und -funktion

Für die einführende Darstellung der grundlegenden Nierenanatomie und -funktion wurden, soweit nicht anders angegeben, die Bücher „Kidney physiology“¹, „Physiologie“² und „Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen“³ verwendet.

Die paarig angeordneten, bohnenförmigen Nieren eines Erwachsenen sind ca. zwölf Zentimeter groß, fünf bis sechs Zentimeter breit und wiegen jeweils ca. 150 g. Sie befinden sich unterhalb des Zwerchfells im Retroperitonealraum beiderseits der Wirbelsäule, wobei die rechte Niere aufgrund der ipsilateralen Lage der Leber etwa drei bis vier Zentimeter tiefer als die linke liegt.

Auf einem Querschnitt (Abb. 3-1) erkennt man schon makroskopisch eine farbliche Unterteilung der Niere in die hellere Nierenrinde (Kortex) und das dunklere Nierenmark (Medulla). Die pyramidenförmigen Abschnitte der Medulla stehen an der Basis mit dem Kortex in Verbindung. Über die Spitze der Pyramiden, die Nierenpapillen, wird der durch die Nierenkelche geleitete Harn in die Nierenbecken übergeleitet und dann über den Ureter zur Blase geführt, wo er bis zur Miktion gesammelt wird.

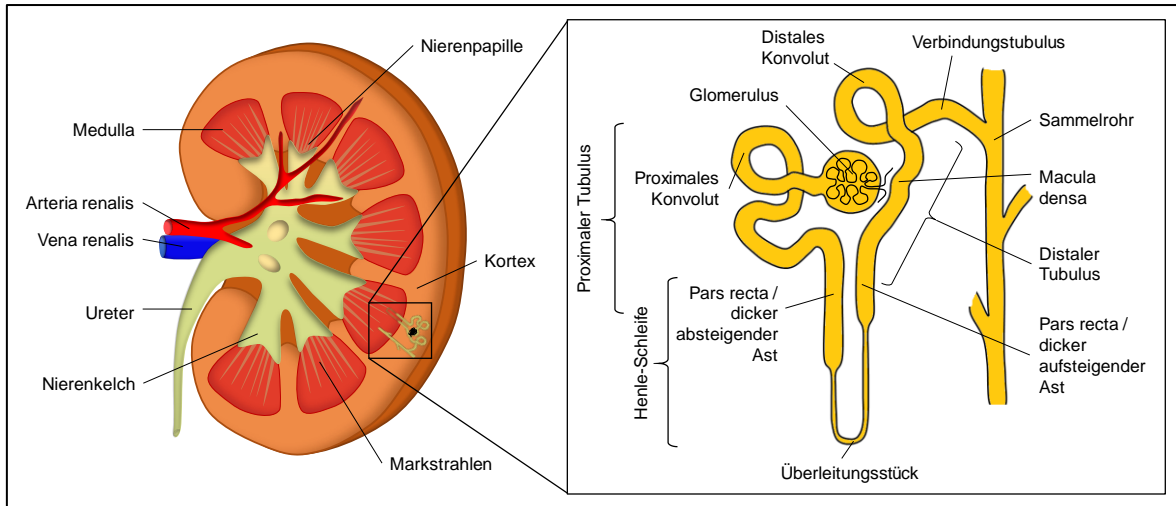


Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Niere und des Nephrons.

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere bildet das Nephron, das aus dem Nierenkörperchen und dem Tubulussystem besteht. Jede Niere besitzt ca. eine Million Nephrone. In den Nierenkörperchen, bestehend aus dem Glomerulus und der ihn umgebenden Bowman-Kapsel, wird das Ultrafiltrat aus dem Blutplasma abgepresst und in das nachfolgende Tubulussystem geleitet. Hier wird der in den Glomeruluskapillaren abgepresste Primärharn modifiziert und zum Endharn aufkonzentriert.

Das Tubulussystem besteht aus verschiedenen hochdifferenzierten und spezialisierten Teilsegmenten, denen bei der Bildung des Endharns spezifische Funktionen zukommen. Das primäre Ultrafiltrat wird am Harnpol in den proximalen Tubulus geleitet, der aus einer Pars convoluta und einer Pars recta besteht, und dessen Ende den dicken absteigenden Ast der Henle-Schleife bildet. Über ein Überleitungsstück gelangt der nun schon modifizierte Harn in den dicken aufsteigenden Ast, dessen letzter Abschnitt den geraden Teil des distalen Tubulus bildet. Dieser Teil steht kurz vor seiner Aufwindung zum distalen Konvolut in engem Kontakt mit der afferenten Arteriole des zum selben Nephron gehörenden Glomerulus. Nach der Passage des distalen Konvoluts wird der Harn über den Verbindungstubulus in das Sammelrohr geleitet. Jedes dieser Tubulussegmente besitzt in seinen apikalen und basolateralen Membranen Transportsysteme, die für die Resorption und Sekretion der verschiedenen Bestandteile des Urins verantwortlich sind.

Abbildung 3-2 zeigt die Komponenten des Glomerulus. Das Blut wird, ausgehend von der Aorta, über die Arteria renalis in die Arteriae interlobares geleitet, von wo aus es über die Aa. arcuatae und die Aa. interlobulares in die afferenten Arteriolen strömt. Von hier gelangt es in die glomerulären Kapillaren, in denen der Filtrationsprozess stattfindet. Über die efferente Arteriole wird das filtrierte Blut dem venösen Kreislauf zugeführt. Beide Arterien enthalten wie alle Blutgefäße glatte Muskelzellen, über deren Kontraktion bzw. Relaxation der Gefäßtonus reguliert wird. Die Endothelzellen der Kapillaren sind zusammen mit den Podozyten und der Basalmembran Teil der glomerulären Filtrationsbarriere.

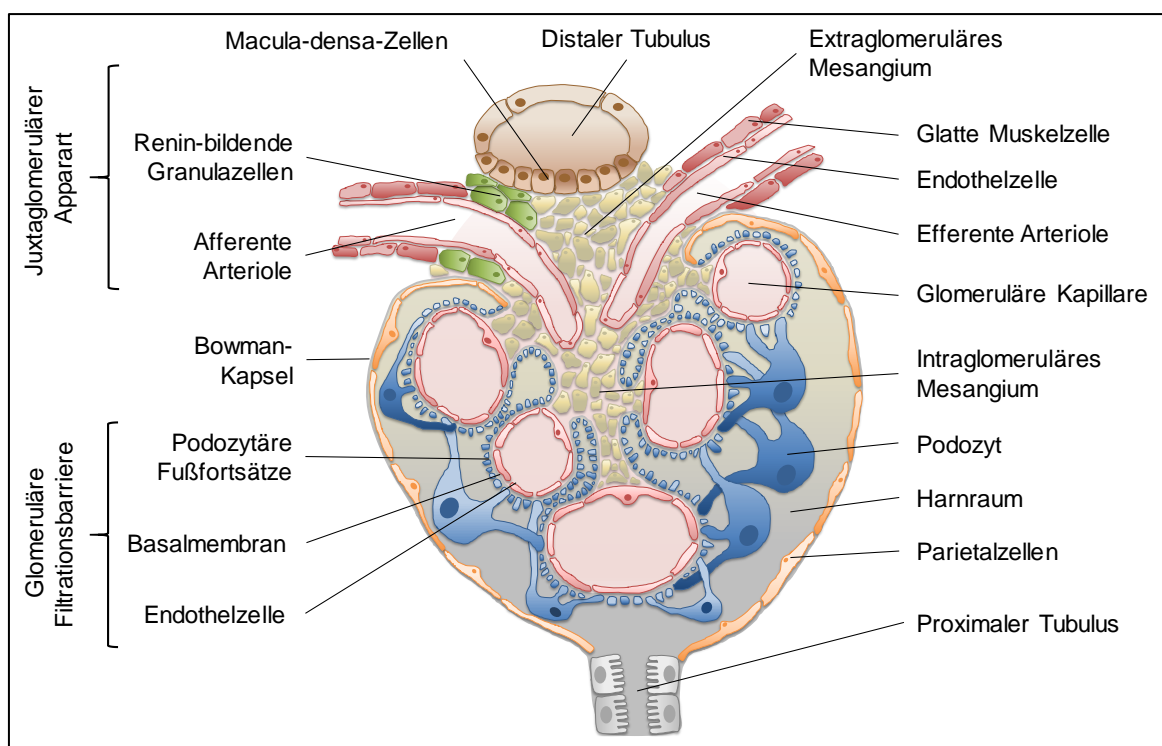


Abb. 3-2: Schematische Darstellung des Glomerulus.

Die Podozyten bilden das viszerale epitheliale Blatt der Bowman-Kapsel und sitzen den glomerulären Kapillaren an ihrer Außenseite auf. Der nach Filtration des Blutes abgepresste Primärharn sammelt sich im Harnraum der Bowman-Kapsel. Diese geht am Harnpol in die Epithelzellen des proximalen Tubulus über. Am Gefäßpol stehen die glatten Muskelzellen der afferenten Arteriolen mit den Macula-densa-Zellen des distalen Tubulus in enger Verbindung. Zusammen mit den Renin-produzierenden Granulazellen bilden sie den juxtaglomerulären Apparat. Die intra- und extraglomerulären Mesangialzellen stellen den Stützapparat des Glomerulus dar. Sie besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose und entfernen Ablagerungen aus dem Filterbereich. Des Weiteren zeigen diese Zellen durch das Vorhandensein von Aktin und Myosin kontraktile Eigenschaften.

Die Hauptfunktionen der Nieren bestehen in der Ausscheidung von harnpflichtigen körpereigenen und körperfremden Stoffen, und in der Kontrolle und Aufrechterhaltung des Flüssigkeits- und Elektrolytgleichgewichts. Außerdem sind sie an der Regulierung des Blut-pH-Wertes beteiligt. Neben diesen homöostatischen Funktionen kommt den Nieren durch die Bildung und Sekretion von Hormonen auch eine endokrine Rolle zu. Die Synthese von Renin in den juxtaglomerulären Zellen trägt maßgeblich zur Regulation des Blutdrucks und -volumens bei. Des Weiteren wird das für die Blutbildung essentielle Erythropoetin in interstitiellen Zellen der Nieren gebildet und 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitrol) aus 25-Hydroxy-Vitamin D₃ synthetisiert, das eine wichtige Rolle im Calciumstoffwechsel spielt.

3.1.1 Die Regulation der glomerulären Filtrationsrate

Der primäre Schritt zur Ausscheidung von gelösten Abfallprodukten sowie von Salz und Wasser besteht in der Filtration des Blutplasmas in den Glomeruli der Niere. Das hierbei gebildete Ultrafiltrat wird als Primärharn bezeichnet. Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) definiert sich als filtriertes Flüssigkeitsvolumen pro Zeiteinheit. Sie beträgt beim Menschen ca. 120 ml pro Minute, was pro Tag ungefähr 180 Litern entspricht.

Die GFR wird maßgeblich durch zwei Parameter bestimmt: den Nettofiltrationsdruck (P_{NET}) und den Filtrationskoeffizienten (K_F). Der Filtrationskoeffizient ist das Produkt der Filtrationsfläche A und der osmotischen Wasserpermeabilität L der glomerulären Kapillaren. Der Nettofiltrationsdruck errechnet sich aus der Differenz des hydrostatischen Drucks in den glomerulären Kapillaren (P_{GK}) und in der Bowman-Kapsel (P_B) abzüglich der onkotischen Druckdifferenz in diesen beiden Kompartimenten (π_{GK} und π_B).

Abb. 3-3 zeigt eine Übersicht der Druckverhältnisse im Glomerulus und ihren Einfluss auf die glomeruläre Filtrationsrate. Da unter physiologischen Bedingungen nur sehr wenige Proteine aus dem Blut in den Primärharn gelangen, ist der onkotische Druck in der Bowman-Kapsel entsprechend niedrig und kann nahezu vernachlässigt werden. Der onkotische Druck in den Kapillaren steigt mit zunehmender Filtration aufgrund des Flüssigkeitsverlustes und der Retention der Plasmaproteine an. Somit nimmt der Nettofiltrationsdruck zur efferenten Arteriole hin ab. Eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks in den glomerulären Kapillaren steigert P_{NET} und damit die GFR, steigt der Druck jedoch in der Bowman-Kapsel an, führt dies zu einer Abnahme des Nettofiltrationsdrucks, was eine Senkung der glomerulären Filtrationsrate bewirkt.

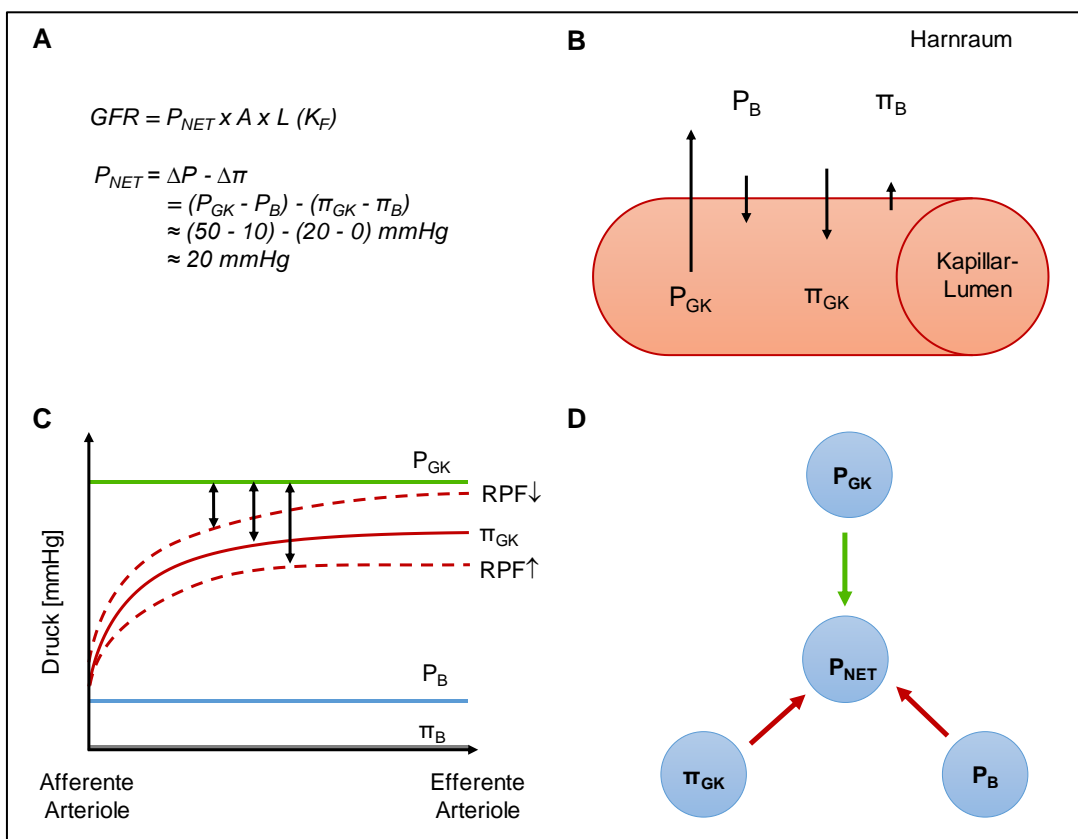


Abb. 3-3: **A.** Determinanten der GFR und Berechnung des Nettofiltrationsdrucks. **B.** Hydrostatischer (P) und onkotischer Druck (π) in den glomerulären Kapillaren (GK) und im Harraum (B). Die Pfeile geben die Druckrichtung an, ihre Länge zeigt die verhältnismäßige Stärke. **C.** Änderung der Einzeldrücke entlang der glomerulären Kapillaren, ausgehend von der afferenten Arteriole bis zur efferenten Arteriole, und Einfluss des renalen Plasmaflusses (RPF). **D.** Einfluss des hydrostatischen und onkotischen Drucks auf den Nettofiltrationsdruck. Grüner Pfeil: Erhöhung führt zu Zunahme; roter Pfeil: Erhöhung führt zu Abnahme.

Veränderungen all dieser Parameter führen somit zu Veränderungen der GFR. P_{GK} wird maßgeblich durch den Gefäßwiderstand der afferenten Arteriole bestimmt. So kommt es bei einer Vasodilatation der afferenten Arteriole zu einer Zunahme von P_{GK} und damit zu einem Anstieg von P_{NET} und der GFR; Veränderungen des Widerstands in der efferenten Arteriole wirken sich genau gegensätzlich aus, da hier eine Vasokonstriktion durch die postglomeruläre Stauung eine Zunahme des hydrostatischen Drucks in den Kapillaren und in der Folge den Anstieg des Nettofiltrationsdrucks und der GFR bewirkt. Veränderungen des Durchmessers der glomerulären Arteriolen können sowohl durch vasoaktive Substanzen wie die kardialen natriuretischen Peptide (NP), Stickstoffmonoxid (NO) und Angiotensin II (ANG II) als auch durch Veränderungen des Sympathikotonus hervorgerufen werden.

Der hydrostatische Druck in der Bowman-Kapsel kann sich durch eine Obstruktion im Harntrakt, z.B. durch eine Ureterstenose, verändern. Hierbei steigt P_B akut an und vermindert dadurch P_{NET} . Eine chronische Obstruktion führt jedoch durch die verminderte GFR wieder zu einer Normalisierung von P_B . Der onkotische Druck in den glomerulären Kapillaren wird von der Plasma-Protein-Konzentration und vor allem vom renalen Plasmafluss (RPF) beeinflusst. Der RPF beträgt im Normalfall ca. 600 ml pro Minute. Steigt er an, verringerte sich π_{GK} , was eine Steigerung der GFR zur Folge hätte, ist er zu niedrig, verringert sich auch die GFR. Entlang der glomerulären Kapillaren würde sich dieser Effekt noch verstärken und starke Veränderungen der glomerulären Filtration verursachen (Abb. 3-3 C). Im Normalfall werden Plasmafluss und GFR allerdings durch die renale Autoregulation relativ konstant gehalten.

Eine Änderung der Parameter der Filtrationskoeffizienten wirkt sich proportional auf die GFR aus. So führen die Vergrößerung der Filtrationsoberfläche sowie die Steigerung der hydraulischen Permeabilität der glomerulären Kapillaren zu einer Erhöhung der GFR. Für die Modulation von K_f könnten die Mesangialzellen oder auch die Podozyten, die die glomerulären Kapillaren umgeben, eine wichtige Rolle spielen.

3.1.2 Der Feinbau des glomerulären Filters

Die glomeruläre Filtrationsbarriere, die das Blut vom Primärharn trennt und den Filterapparat bildet, besteht aus drei Schichten: dem fenestrierten Endothel der Glomeruluskapillaren, der glomerulären Basalmembran und den Podozyten. Jede dieser Schichten trägt zur Größen- und Ladungsselektivität der Filtrationsbarriere bei (Abb. 3-4).

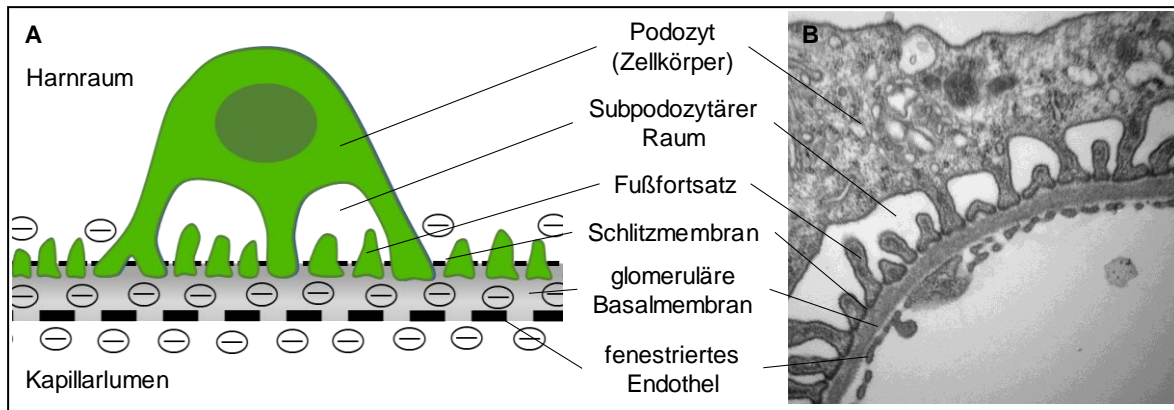


Abb. 3-4: Schematische Darstellung (A) und elektronenmikroskopische Aufnahme (B) der glomerulären Filtrationsbarriere.

3.1.2.1 Das fenestrierte Endothel

Wie bei jedem anderen Blutgefäß bildet das Endothel die innerste, luminal gerichtete Schicht der Kapillarwand. Die glomerulären Kapillaren weisen hier allerdings eine Besonderheit auf. Ihr Endothel ist fenestriert, also von ca. 60 nm großen Poren unterbrochen, die ca. 20 % der gesamten endothelialen Fläche ausmachen⁴. Zudem besitzen die Endothelzellen eine ungewöhnlich flache Form mit einer Zelldicke von ca. 50-150 nm⁵. Aus der hohen Porendichte (ca. 70 Poren pro μm^2) resultiert eine hohe Durchlässigkeit des Endothels für Wasser und darin gelöste, niedermolekulare Substanzen⁶. Lange Zeit war man der Meinung, dass das Endothel keinen wesentlichen Beitrag zur selektiven Permeabilität der Filtrationsbarriere leistet, da Makromoleküle, wie z.B. Albumin mit einer Größe von 3,6 nm, die großen „Fenster“ passieren müsste. In den letzten 30 Jahren wurde jedoch festgestellt, dass das fenestrierte Endothel auch zur Ladungselektivität des Filters beiträgt und negativ geladene Makromoleküle an der Passage hindert. Hierfür sind negativ geladene Proteoglykane verantwortlich, die sich in den Poren befinden. Zudem liegt dem Endothel eine weitere Schicht auf, die die Fenster bedeckt. Die sogenannte „ESL“ (engl. „Endothelial surface layer“) besteht aus einer negativ geladenen Glykokalyx und einem „Endothelzell-Mantel“, der sich aus negativ geladenen Glykoproteinen, Glucosaminoglykanen und Proteoglykanen zusammensetzt⁵ und eine Dicke von ca. 50-100 nm aufweist⁷. Durch die negative Ladung dieser Barrierschicht werden neben den mikrometergroßen Blutzellen auch Makromoleküle, die kleiner als 60 nm sind, am Durchtritt gehindert.

3.1.2.2 Die glomeruläre Basalmembran

Die glomeruläre Basalmembran (GBM) liegt zwischen Endothel und Podozyten und wird initial von diesen Schichten synthetisiert. Sie weist eine gelartige Struktur auf, die zu 90% aus Wasser besteht⁸ und mit einer Dicke von 240-370 nm fünf- bis sechsmal so dick ist wie die Basalmembran anderer Gefäße⁵. Die Hauptkomponenten der GBM sind das Typ-IV-Kollagen, Laminin, Nidogen (auch Entactin) und die Heparansulfat-konjugierten Proteoglykane Agrin und Perlecan, wobei Agrin überwiegt⁹. Kollagen-Typ-IV formt ein fibröses Netzwerk aus verzahnten Fasern und bildet das Rückgrat der GBM, an das die anderen Matrixkomponenten gebunden sind. Das Alport-Syndrom, das mit einer schweren Glomerulonephritis und massiver Proteinurie einhergeht, beruht auf einer Mutation des Kollagen-IV-Gens¹⁰. Laminin interagiert mit den Zelladhäsionsproteinen der anderen Schichten der glomerulären Filtrationsbarriere und trägt somit zum Strukturerehalt dieser bei⁶. Mutationen des Laminin- β 2-Gens führen zum sogenannten „Pierson-Syndrom“, einer Art des kongenitalen nephrotischen Syndroms, das mit mesangialer Sklerose und neurologischen Veränderungen einhergeht^{11,12}. Das sulfatierte Glycoprotein Nidogen bindet sowohl an Kollagen-IV als auch an Laminin und verlinkt die Strukturen untereinander⁶. Perlecan und Agrin tragen durch die negativ geladenen Disaccharid-Einheiten von Glucosaminen und Glucuronsäuren zusammen mit der ESL des Endothels maßgeblich zur Ladungsselektivität der glomerulären Filtrationsbarriere bei¹³.

3.1.2.3 Die Podozyten

Die Podozyten bilden das viszerale epitheliale Blatt der Bowman-Kapsel und sitzen den glomerulären Kapillaren an ihrer Außenseite auf. Diese hochdifferenzierten, komplexen Zellen stellen den Feinfilter der glomerulären Filtrationsbarriere dar und tragen maßgeblich zu ihrer Größenselektivität bei. Die podozytären Fußfortsätze greifen fingerartig ineinander und bilden ca. 30-40 nm breite Filtrationsschlitze¹⁴, die durch ein Diaphragma, die sogenannte Schlitzmembran, miteinander verbunden sind. Durch diese verengen sich die Poren auf gerade einmal 4-14 nm, so dass Makromoleküle, die größer sind als Albumin, an der Filtration gehindert werden. Durch Sialoproteine wie Podocalyxin ist die Schlitzmembran und auch die luminale Membran der Fußfortsätze negativ geladen, wodurch auch Albumin im physiologischen Zustand nur zu 0,01-0,05% (Siebkoeffizient 0,0001-0,0005¹⁵) filtrierte wird. Auf die Anatomie und Physiologie der podozytären Fußfortsätze sowie die Ursachen und Folgen einer Schädigung des Podozyten wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

3.2 Anatomie und (Patho-) Physiologie des Podozyten

3.2.1 Komponenten des podozytären Zytoskeletts und der Schlitzmembran

Die molekulare Struktur der Podozyten und vor allem ihrer Fußfortsätze ist sehr komplex und hoch differenziert. In den Arbeiten von Pavenstädt et al.¹⁶, Greka und Mundel¹⁷ und Reiser et al.¹⁸ wurden die Forschungsergebnisse der letzten beiden Jahrzehnte, in denen der Podozyt als essentieller Teil der glomerulären Filtrationsbarriere immer mehr in den Fokus rückte, zusammengefasst.

Podozyten sind stark polarisierte Zellen mit einer apikalen und einer basalen Zelldomäne. Den apikalen Teil bildet der voluminöse Zellkörper, der in den Harnraum hineinragt und von dem sich primäre Ausläufer dendritenartig verzweigen und an ihrem basalen Ende die Fußfortsätze (engl. „foot processes“) bilden. Die Zellorganellen befinden sich größtenteils im Zellkörper, der sowohl anabole als auch katabole Eigenschaften besitzt. Zum Beispiel wird ein Großteil der Komponenten der Basalmembran (z.B. Kollagen-Typ-IV, Laminin, Nidogen und Agrin)¹⁹ und der für die Entstehung des fenestrierten Endothels essentielle VEGF-A (engl. „vascular endothelial growth factor-A“) ^{20,21} von den Podozyten synthetisiert, Abbauprodukte werden hingegen vesikulär phagozytiert. Die Fußfortsätze benachbarter Podozyten greifen fingerartig ineinander, umschließen die glomerulären Kapillaren und bedecken somit die Filtrationsfläche von außen. Neben ihrer Filterfunktion bilden sie auch einen Stützapparat und mechanischen Widerstand gegen den verhältnismäßig hohen Kapillardruck und die damit entstehenden Kräfte, die gegen die Kapillarwand wirken²².

Das Zytoskelett der Podozyten bildet das strukturelle und funktionelle Rückgrat der Zellen. Es durchzieht die primären Ausläufer bis hin zu den Fußfortsätzen, an deren „Sohle“ es bis in die glomeruläre Basalmembran hineinstrahlt und somit für eine stabile Verankerung der Podozyten im Glomerulus sorgt. Außerdem fixiert es die Komponenten der Schlitzmembran, bildet eine Verbindung zwischen ihr, den Fußfortsätzen und den Bestandteilen der Basalmembran und stellt somit eine Möglichkeit zur „Kommunikation“ zwischen den Filtrationsschichten her.

Während die primären Ausläufer der Podozyten von Mikrotubuli und Intermediärfilamenten durchzogen sind²³, finden sich in den podozytären Fußfortsätzen Mikrofilamente, deren Hauptbestandteil - wie auch in glatten Muskelzellen - Aktin ist^{24,25}. Die Aktinfilamente (auch F-Aktin = filamentöses Aktin) besitzen eine hochdynamische Struktur, die durch rapides Wachstum, Verzweigung und einen schnellen Abbau gekennzeichnet ist. In den Fußfortsätzen liegen sie entweder als loses Netzwerk oder in eng gepaarten Bündeln vor und formen schlaufenförmige Knäuel, deren Äste entlang der

Längsachse der Fußfortsätze verlaufen und mit den Mikrotubuli der Primärfortsätze verbunden sind²⁶. Die Art der Komprimierung wird durch Vernetzungsmoleküle wie α -Actinin-4 und Myosin definiert²⁵. Durch diese besitzt das Zytoskelett sowohl statische als auch dynamische Eigenschaften, wobei die strukturelle Organisation der Aktinfilamente je nach Situation durch eine unterschiedliche molekulare Zusammensetzung geändert werden kann. α -Actinin-4 stellt auch eine wichtige Komponente für den Erhalt der Barrierefunktion dar. Mutationen des Gens (ACTN4) führen sowohl beim Menschen²⁷ als auch im podozytenspezifischen Mausmodell²⁸ zu massiver Proteinurie und FSGS. Auch für Myosin konnte anhand podozytenspezifischer Knockout-Mäuse eine essentielle antiproteinurische Rolle nachgewiesen werden²⁹.

Faul et al. geben in ihrem Bericht aus dem Jahr 2007 einen sehr guten Überblick über die Linker- und Adapterproteine, über welche die Aktinfilamente sowohl mit den Komponenten der apikalen als auch basalen Zellmembran der Fußfortsätze verbunden sind (Abb. 3-5)³⁰. Zelladhäsionsmoleküle, wie Integrine, wirken über spezifische „Integrin-linked“-Kinasen (ILK) grundlegend auf die besondere Struktur des Zytoskeletts ein. Diese ist wichtig für die einzigartige Form und den Erhalt der Fußfortsätze und damit auch für die Instandhaltung der Filtrationsbarriere. Eine podozytenspezifische Deletion der ILK im Mausmodell führt zum Verlust der Integrität der podozytären Fußfortsätze, die mit einer ausgeprägten Proteinurie einhergeht³¹. Des Weiteren sind wichtige Bestandteile der Basalmembran unter anderem über Integrine mit den Aktinfilamenten verbunden. Dabei bilden die Matrix-Moleküle der GBM (Kollagen-IV, Fibronectin, Laminin, Nidogen) die Liganden der Transmembran-Adhäsions-Rezeptoren der Fußfortsätze³²⁻³⁴. Diese Zell-Matrix-Kontakte sind wichtig für die Aufrechterhaltung der Struktur der Fußfortsätze³⁵.

An der apikalen Membran der Fußfortsätze ist das Aktin-Netzwerk über Proteine wie Ezrin an Podocalyxin gebunden. Podocalyxin fungiert nicht nur als Ladungsbarriere, sondern auch als „Spacer“-Molekül zwischen benachbarten Fußfortsätzen³⁶. Ein weiteres wichtiges Protein des Aktin-Zytoskeletts ist Synaptopodin. Es ist direkt mit den Filamenten verbunden und spielt eine wichtige Rolle für deren Regulierung und Reorganisation³⁷. Damit ist es auch in die Motilität des Zytoskeletts involviert³⁸.

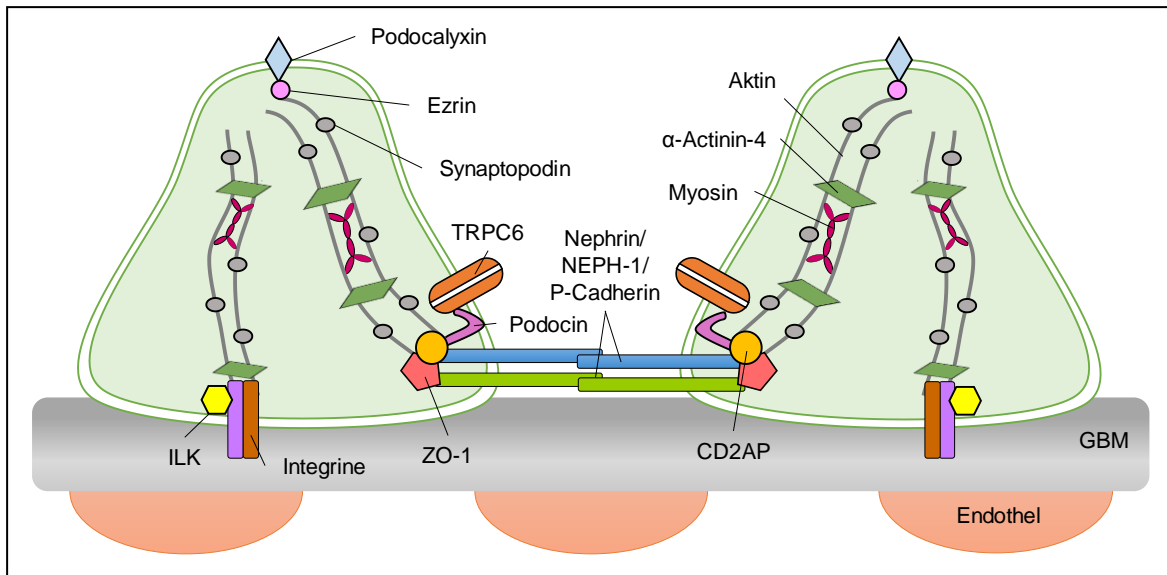


Abb. 3-5: Podozytäre Schlitzmembran und Komponenten des Zytoskeletts der Fußfortsätze (angelehnt an Pavenstädt 2003¹⁶ und Noris 2012³⁹).

Zwischen den Fußfortsätzen benachbarter Podozyten befinden sich ca. 30-40 nm große Schlitz, die von einer Schlitzmembran überbrückt werden. Die Schlitzmembran bildet die Grenze zwischen der luminalen und der basalen Plasmamembran der Fußfortsätze. Durch die reißverschlussartige Anordnung⁴⁰ der stäbchenförmigen Einheiten der Schlitzmembran verkleinert sie die Schlitzporen noch einmal auf die ungefähre Größe von Albumin⁴¹ und verleiht ihnen eine rechteckige Form, die starke Ähnlichkeit mit sogenannten „Adherens Junctions“ hat^{40,42}. Sowohl die Schlitzmembran als auch die luminalen Membran der Fußfortsätze werden von Sialoglykoproteinen wie Podocalyxin überzogen, durch welche sie eine negative Ladung erhalten und somit auch zur Ladungselektivität beitragen⁴³⁻⁴⁵. In der Schlitzmembran sind die sogenannten Schlitzmembranproteine verankert. Diese bilden einen hochspezialisierten Proteinkomplex, der die Selektivität dieses Teils der Filtrationsbarriere ausmacht.

In den letzten Jahrzehnten wurden wesentliche Fortschritte im Verständnis des Aufbaus der Schlitzmembran gemacht. So wurden die Schlitzmembranproteine Nephrin, Podocin und CD2-assoziiertes Protein (CD2AP) identifiziert und ihre zentrale Rolle in der Bildung der Filtrationsbarriere durch die Entdeckung entsprechender Mutationen bei proteinurischen Erkrankungen oder durch gezielte Experimente an entsprechenden Knockout-Mäusen untermauert. Im Jahr 1998 konnten Kestila et al. das „Kongenitale nephrotische Syndrom vom finnischen Typ“, das schon postnatal mit einer massiven Proteinurie einhergeht, mit einer Mutation des für Nephrin codierenden *NPHS1*-Gens in Verbindung bringen⁴⁶. Shi et al. zeigten nur ein Jahr später mit Hilfe von Knockout-Mäusen die essentielle Rolle des CD2-assoziierten Proteins für die Ausbildung der

Schlitzmembran. Die Versuchstiere litten zwar aufgrund des entstandenen T-Zell-Defekts auch an einer Immundefizienz, starben jedoch nach sechs bis sieben Wochen an Nierenversagen⁴⁷. Eine Mutation des *NPHS2*-Gens, das für Podocin codiert, wurde von Boute et al. als Ursache für das Kortikosteroid-resistente nephrotische Syndrom identifiziert⁴⁸. In den letzten Jahren wurde eine große Anzahl weiterer Proteine ermittelt, die Teil der Schlitzmembran sind oder diese mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden. Die Adapterproteine sind essentiell für die Modulation der Schlitzporen, die durch die Umordnung des Zytoskeletts stattfindet. Das mit Aktin interagierende „Tight junction zonula adherens“-assoziierte Protein (ZO-1)⁴⁹ steht z.B. auch mit dem Schlitzmembranprotein Neph-1 in Beziehung⁵⁰. Auch das CD2-assoziierte Protein wird zu den Adapterproteinen gezählt, da es über eine Aktin-bindende Stelle verfügt und mit α -Actinin-4 überlappt⁵¹. Über die Bindung an CD2AP stehen somit auch Podocin^{48,52} und Nephrin⁵³ mit dem Aktin-Zytoskelett in Verbindung.

Neu in den Fokus rückten in den letzten Jahren einige Vertreter der TRPC-Kanal-Familie. Unter anderem konnte der „Transient receptor potential canonical channel 6“ (TRPC6) in der Membran der podozytären Fußfortsätze nachgewiesen und mit der Schlitzmembran in Verbindung gebracht werden³⁰. Mutationen der codierenden Gene führen auch hier zu einer Proteinurie, wobei es sich bei TRPC6 um „Gain-of-function“-Mutationen handelt. Diese führen zu einer Überaktivität des Kanals, was einen erhöhten Calcium-Einstrom in die Podozyten und eine Schädigung dieser zur Folge hat^{54,55}. Die Rolle der TRPC-Kanäle in der Entstehung einer Proteinurie durch die Schädigung der Podozyten und die zugehörigen Signalmechanismen ist noch nicht vollständig geklärt.

3.2.2 Kontraktilität der Podozyten und mögliche Bedeutung für die GFR

Obwohl kontrovers diskutiert, zeigen einige Untersuchungen, dass die kontraktile Eigenschaften der Podozyten möglicherweise zur Regulation der glomerulären Filtrationsrate beitragen^{16,22}.

Die komplexe Struktur der hochdifferenzierten Podozyten weist zum Beispiel Merkmale mesenchymaler glatter Muskelzellen auf. So finden sich das schwere Meromyosin⁵⁶, Smoothelin, Calponin und Myocardin⁵⁷ sowie das bereits erwähnte Myosin und α -Aktin²⁵ im Zytoskelett der podozytären Fußfortsätze. Sowohl isometrische als auch isotonische Kontraktionen der Aktinfilamente wurden von Gordon et al. schon im Jahr 2000 gezeigt⁵⁸ und Saleem et al. bestätigten 2008 die starke Kontraktilität in ausdifferenzierten Podozyten in Kultur⁵⁷.

Reguliert werden könnte die Kontraktilität der Podozyten durch einen Ligand-gesteuerten Ca^{2+} -Einstrom, zum Beispiel über den bereits erwähnten Ca^{2+} -permeablen TRPC6-Kanal. Der extrazelluläre Ca^{2+} -Influx scheint - wie auch in Kardiomyozyten - eine zusätzliche Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum („Store-Release“) zur Folge zu haben, der den Hauptanteil des cytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs ausmacht⁵⁹. Die erhöhte Calcium-Konzentration in den Zellen könnte wie in glatten Muskelzellen zur Kontraktion der Aktin-Myosin-Komplexe führen. Hierbei könnten Stoffe wie ANG II⁶⁰ und ATP⁶¹ den Calcium-Influx modulieren. Die Expression der Rezeptoren beider Proteine konnte in den Podozyten gezeigt werden^{62,63}.

Die Calcium-Ausschleusung aus den Zellen erfolgt vornehmlich über Ca^{2+} -ATPasen, die durch cGMP aktiviert werden. Auch dieser, für die Relaxation glatter Muskelzellen wichtige, Second Messenger konnte in Podozyten nachgewiesen werden⁶⁴. In ihrem Bericht aus dem Jahr 2002 zeigen Lewko et al., dass die Bildung von cGMP vornehmlich über die Aktivierung der membranständigen Guanylatzyklase initiiert wird. Obwohl auch im Podozyten exprimiert, scheint die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase, z.B. durch NO, eine eher untergeordnete Rolle zu spielen⁶⁵.

Wie bereits erwähnt verbindet das Aktin-Zytoskelett die Fußfortsätze mit der glomerulären Basalmembran. Diese ist zusammen mit den Kapillaren ständig zyklischen Dehnungen durch den pulsierenden Blutstrom ausgesetzt. Dementsprechend muss sie sowohl ein hohes Maß an Festigkeit als auch an Flexibilität aufweisen. Darauf nehmen die Podozyten in mehrerlei Hinsicht Einfluss. Einerseits produzieren sie die Bestandteile der Basalmembran und modulieren dadurch ihre Zusammensetzung. Andererseits gehen die mechanischen Kräfte, die auf die Kapillaren und die GBM wirken, durch die Verbindung über die Zell-Matrixkomplexe auf die Podozyten über. Durch ihre eigene Flexibilität können sie dadurch eben diesen Kräften entgegenwirken^{22,25}. Hierbei könnten sie über die Modulation des Kapillartonus die Filtrationsfläche und damit den Filtrationskoeffizienten verändern und somit auch zur Regulation der glomerulären Filtrationsrate beitragen.

Die zellulären Konsequenzen, die die mechanische Belastung auf die Fußfortsätze hat, wurden von Endlich et al. in Zellkulturstudien nachempfunden. Sie konnten zeigen, dass mechanischer Stress, hervorgerufen durch wechselnde Auf- und Abwärtsbewegungen des Zelluntergrunds, im Podozyten zu einer Neuordnung des Zytoskeletts führt, die durch eine verringerte Zellgröße und dünnere Hauptfortsätze gekennzeichnet ist. In den Fußfortsätzen findet ein reversibler Umbau des F-Aktins zu radialen Stressfasern statt, der Calcium- und Rho-Kinase abhängig ist. Dies kann unter Umständen zu einer dauerhaften Schädigung der Podozyten führen⁶⁶.

3.2.3 Schädigung des Podozyten und Entstehung der Proteinurie

Eine Schädigung der Podozyten oder der Schlitzmembran führt fast immer zu einer vermehrten Ausscheidung von Proteinen im Urin. Von einer Proteinurie spricht man, wenn täglich mehr als 150 mg Protein im Endharn ausgeschieden werden. Da Albumin den Hauptbestandteil der Plasmaproteine ausmacht, wird in der Klinik oft der Grad der Albuminurie bestimmt. Eine Albuminurie liegt vor, wenn sich mehr als 30 mg / d im Endharn befinden. Die Proteinurie bzw. Albuminurie kann sowohl Ursache als auch Folge von Nierenschädigungen sein und sie geht nicht immer mit einer Schädigung des glomerulären Filters einher. Störungen in der tubulären Rückresorption sowie die vermehrte Bildung und / oder Sekretion von Proteinen in den nachfolgenden Segmenten des Tubulussystems und der ableitenden Harnwege können auch zu einer vermehrten Anhäufung dieser im Endharn führen. In diesem Abschnitt werden jedoch nur Proteinurien mit Beteiligung des glomerulären Filters besprochen. Eine umfangreiche Übersicht über die an der Entstehung und Progression der Proteinurie beteiligten podozytären Proteine und Mechanismen bietet der Bericht von Jochen Reiser und Memeth Altintas aus dem Jahr 2016¹⁸.

Wie bereits erwähnt führen Mutationen der Komponenten des podozytären Zytoskeletts und der Schlitzmembran zu Nierenschädigungen, die mit einer massiven Proteinurie einhergehen. Auch genetische Veränderungen der Komponenten der Basalmembran resultieren in Erkrankungen, die eine Proteinurie beinhalten. Tabelle 3-1 zeigt eine Auswahl der betroffenen Proteine zusammen mit den für sie codierenden Genen und den daraus resultierenden Krankheiten.

Protein	Gen	Erkrankung	Quelle
Nephrin	NPHS1	Kongenitales nephrotisches Syndrom vom finnischen Typ	Kestila 1998 ⁴⁶
Podocin	NPHS2	Kortikosteroid-resistentes Nephrotisches Syndrom	Boute 2000 ⁴⁸
CD2AP	CD2AP	Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS)	Kim 2003 ⁶⁷
alpha-Aktinin-4	ACTN4	Sporadische FSGS	Kaplan 2000 ²⁷
Laminin β 2	LAMB2	Pierson's Syndrom	Zenker 2004 ¹²
TRPC6	TRPC6	FSGS	Reiser 2005 ⁵⁴
LMX1B	LMX1B	Nail-patella Syndrom (Osteonychodysplasie)	Dreyer 1998 ⁶⁸
WT1	WT1	Frasier's Syndrom (FS)	Pelletier 1991 ⁶⁹
Synaptopodin	SYNPO	Sporadische FSGS	Dai 2010 ⁷⁰

Tabelle 3-1: Gene, deren Mutationen die Podozyten-Struktur und -Funktion beeinträchtigen und mit einer Proteinurie einhergehen (angelehnt an Greka und Mundel 2012¹⁷).

Neben genetischen Erkrankungen können auch erworbene Krankheiten wie die diabetische⁷¹ und die hypertensive Nephropathie⁷² über die Schädigung der Podozyten zu einer Proteinurie führen. Hierbei spielt die Entstehung von reaktiven Sauerstoffmolekülen eine Rolle, die zur Apoptose der Podozyten führt⁷³. Auch die HIV-induzierte Nephropathie geht mit einer massiven Proteinurie und glomerulären Schädigung einher⁷⁴.

Das sogenannte „Foot process Effacement“, also das Fusionieren, Simplifizieren und Ablösen der Fußfortsätze führt zum Verlust der Filterfunktion und somit zur Ausscheidung von Makromolekülen in den Primärharn. Die Mechanismen, die hierbei eine Rolle spielen und letztendlich zum Verlust der Integrität der podozytären Fußfortsätze führen, sind derzeit noch unklar. Bekannt ist, dass die Veränderung der Faserstruktur des Aktin-Zytoskeletts in dem Prozess eine wesentliche Rolle spielt. Diskutiert wird hierbei die Rolle von Rho-Kinasen wie RhoA, die durch TRPC6 stimuliert werden und zu einer Erhöhung der Anzahl an Stressfasern im Zytoskelett der Fußfortsätze führen⁷⁵ oder von Phosphatasen wie GLEPP-1, die die Tyrosin-Phosphorylierung in den Fußfortsätzen regulieren und damit deren Struktur beeinflussen⁷⁶. Auch eine übermäßige Phosphorylierung von Strukturproteinen, wie z.B. Ezrin führt zu einem verstärkten Umbau des F-Aktin-Skeletts⁷⁷. El-Aouni et al. zeigten im Jahr 2006 anhand einer podozytenspezifischen KO Maus die Beteiligung der Integrine. Die Versuchstiere wiesen eine Verdickung der Basalmembran, FSGS und Proteinurie auf³¹. Über den ILK-Antagonist Puromycin existieren zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien, die die Beteiligung der Signalmoleküle der Integrine belegen¹⁸. Puromycin führt in Zellkultur zu einer CD2AP-assoziierten Proliferation und Ablösung der Podozyten⁷⁸.

Ein pathophysiologischer Anstieg von Calcium-Ionen im podozytären Zytoplasma, der z.B. durch vasoaktive Substanzen wie Angiotensin II ausgelöst werden kann, kann eine Ursache der Podozytenschädigung darstellen⁷⁹. Tsunoda et al. haben im Jahr 2001 gezeigt, dass die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) zur Progression einer Glomerulosklerose durch die übermäßige Produktion von Typ-IV-Kollagen und Fibronectin führt⁸⁰. Außerdem kann es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, engl. „Reactive oxygen species“) kommen⁸¹, deren pathophysiologisches Vorhandensein, z.B. in der Heymann-Nephritis, zu einer Proteinurie führt.

Eine Unterdrückung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems hat nephroprotektive Auswirkungen, was in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien bestätigt wurde. Remuzzi et al. zeigten z.B. im Jahr 1990, dass die Inhibierung des Angiotensin-Converting-Enzyms durch Enalapril und damit die unterdrückte Bildung von Angiotensin II die Größenselektivität der Filtrationsbarriere erhält⁸². Des Weiteren konnten Benigni et al.

2001 die Verhinderung der Herunter-Regulation von Nephrin durch AT1-Blocker und ACE-Hemmer nachweisen⁸³.

Auffällig ist, dass sekundär entstandene Nephropathien oft erst spät und in weit fortgeschrittenen Stadien der Primärerkrankungen auftreten. So können Diabetiker jahrzehntelang ohne eine Einschränkung der Nierenfunktion leben⁸⁴ und auch Bluthochdruck führt erst nach Jahren zu einer Einschränkung der Nierenfunktion⁸⁵. Dies lässt vermuten, dass es protektive und Reparaturmechanismen gibt, die die Niere vor morphologischen Veränderungen und einem Funktionsverlust schützen. Die Aufklärung dieser Mechanismen steht derzeit im Fokus vieler nephrologischer Forschungsprojekte.

3.3 Die natriuretischen Peptide

Im Jahr 1981 konnten deBold et al. zeigen, dass die Infusion eines Extraktes aus atrialen Kardiomyozyten in anästhesierten Ratten zu einem Anstieg der Diurese und Natriurese in der Niere führt. Damit war zum ersten Mal eine direkte Verbindung zwischen Herz und Niere hergestellt⁸⁶. Nur vier Jahre später isolierten Kangawa et al. das atriale natriuretische Peptid (ANP) als erstes einer Reihe von ähnlichen Peptiden, die natriuretische, diuretische und / oder Glattmuskel-relaxierende Wirkung zeigten⁸⁷. Nach ANP folgte im Jahr 1988 die Isolierung des B-Typ-natriuretischen Peptids (BNP) aus porcinem Hirngewebe, weshalb es auch als „Brain natriuretisches Peptid“ bezeichnet wurde⁸⁸. Zwei Jahre später wurde von der gleichen Arbeitsgruppe ein weiteres Peptid aus Schweinehirnen isoliert und nach alphabetischer Reihenfolge als C-Typ natriuretisches Peptid (CNP) bezeichnet⁸⁹. Die Bezeichnung „natriuretisches Peptid“ ist beim CNP etwas irreführend, da es nur in Spuren im Blutplasma detektierbar ist und kaum natriuretische Wirkungen zeigt⁹⁰. CNP wird vor allem in den Zellen des vaskulären Endothels gebildet, wo es als auto- und / oder parakriner Regulator des Gefäßtonus und des Zellwachstums fungiert. Außerdem spielt es eine wesentliche Rolle in der Proliferation der Epiphysenfuge und der Chondrozytendifferenzierung. So zeigen CNP Knockout-Mäuse Zwergwuchs durch eine gestörte endochondriale Ossifikation^{91,92}. Ebenfalls zur Gruppe der natriuretischen Peptide zählt das in der Niere aus dem ANP-Präkursor-Protein synthetisierte Urodilatin⁹³.

Die Grundstruktur von ANP, BNP und CNP ist ähnlich, alle drei Peptide enthalten eine Ringstruktur, bestehend aus 17 Aminosäuren, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind und sich bei den verschiedenen Peptiden teilweise in ihrer Sequenz gleichen (Abb. 3-6). Diese Ringstruktur ist essentiell für die Bindung der Peptide an ihre jeweiligen Rezeptoren.

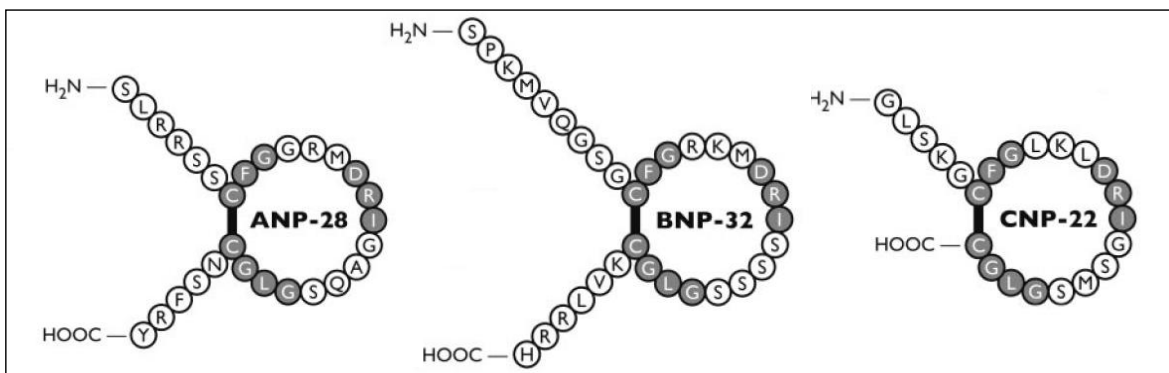


Abb. 3-6: Aminosäuresequenz und Struktur der natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP (modifiziert nach Potter et al. 2006⁹⁴).

Die Rezeptoren der natriuretischen Peptide gehören zu den sieben bekannten Plasmamembranständigen Guanylatzyklasen (GC-A bis GC-G)⁹⁵, die nach Aktivierung zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) synthetisieren. ANP und BNP binden mit unterschiedlicher Affinität an den gleichen Rezeptor, die Guanylatzyklase A (GC-A), die auch als natriuretischer Peptid Rezeptor-A (NPR-A) bezeichnet wird. CNP bindet an die Guanylatzyklase B (GC-B). Alle drei Peptide binden mit ähnlicher Affinität an den Natriuretischen Peptid Rezeptor-C (NPR-C). Der NPR-C zeigt keine katalytische Aktivität und fungiert als Clearance-Rezeptor.

Im Folgenden werden die kardialen natriuretischen Peptide ANP und BNP und ihre Rezeptoren hinsichtlich ihrer Bildung, Funktion und Regulation näher betrachtet. Ausführliche Berichte hierzu erschienen von u.a. von Michaela Kuhn^{90,96}, Potter et al.^{94,97} und Franziska Theilig⁹⁸.

3.3.1 ANP und BNP - Ein Vergleich

Die aktiven Formen beider Peptide werden aus Vorläuferproteinen synthetisiert, die durch spezifische Proteasen an ihrem N-terminalen Ende gespalten werden. Die Prohormone werden beide durch die Protease Corin in die aktiven Formen umgewandelt⁹⁹, wodurch dieses Enzym auch zur Regulation der Aktivität des natriuretischen Peptid-Systems beiträgt. Mäuse mit einer Deletion des Corin-Gens zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie ANP-KO-Mäuse^{100,101}. Sowohl ANP als auch BNP regulieren ihre Synthese und Freisetzung auch selbst über einen negativen Feedback-Mechanismus¹⁰². Der Hauptstimulus für die Freisetzung der beiden Peptide ist eine Erhöhung der Wanddehnung des Atriums (ANP) bzw. des Ventrikels (BNP) aufgrund einer Volumen- und / oder Druckzunahme, wobei die Volumenänderung den Hauptstimulus ausmacht^{103,104}. Zudem können Faktoren wie Hypoxie¹⁰⁵ und diverse Hormone wie Angiotensin II^{106,107}, Endothelin¹⁰⁸, Glucocorticoide¹⁰⁹ oder Katecholamine¹¹⁰ die Freisetzung der NP veranlassen. Nach ihrer Freisetzung zirkulieren sie im Blutstrom und entfalten ihre Wirkungen in verschiedenen Zielgeweben (siehe Abschnitt 3.3.4).

Obwohl beide Peptide den gleichen Rezeptor aktivieren, zeigen sich doch einige Unterschiede zwischen ANP und BNP hinsichtlich ihrer Struktur, Verfügbarkeit und Wirkung. Eine Übersicht hierzu bietet Tabelle 3-2.

Peptid	ANP	BNP
Anzahl der AS	28	32
Länge des Präkursors	151 AS (Präpro-ANP)	134 AS (Präpro-BNP)
Länge des Prohormons	126 AS (pro-ANP)	108 AS (pro-BNP)
Hauptsyntheseort	Atrium	Ventrikel
Molekulargewicht	3080 Da	3464 Da
Haupt-Sekretions-Stimulus	Erhöhung der atrialen Wandspannung	Dehnung der ventrikulären Wand
Affinität zur GC-A	> BNP	< ANP
Second messenger	cGMP	cGMP
Physiolog. Plasma-Konz.	13 pmol / L (human) ¹¹¹ 159 pmol / L (murin) ¹¹²	1,5 pmol / L (human) ¹¹¹ < 60 pmol / L (murin) ¹¹³
Halbwertszeit im Plasma	2-5 min.	21 min.
Speicherung des Prohormons	in atrialen Granulazellen	nahezu keine Speicherung, akute Synthese und Sekretion
Gen	NPPA	NPPB
Phänotyp des murinen Gen-Knockouts	starker Hypertonus kardiale Hypertrophie	kein Hypertonus kardiale Fibrose

Tabelle 3-2: Vergleich von ANP und BNP (zusammengefasst aus^{94,114,115})

3.3.1.1 Das atriale natriuretische Peptid

Die ANP-Synthese erfolgt in den Kardiomyozyten des Atriums zunächst als Präpro-ANP, einem aus 151 Aminosäuren bestehenden Vorläuferpeptid¹⁰⁴. Dieses wird durch die Abspaltung von 25 Aminosäuren am N-terminalen Ende zum pro-ANP, das bis zur Stimulierung der Sekretion in den Granulazellen des Atriums gespeichert wird. Aus pro-ANP entsteht nach der weiteren Abspaltung von 98 Aminosäuren durch die Serin-Protease Corin das biologisch aktive, 28 Aminosäuren enthaltende ANP⁹⁹. Aus pro-ANP wird in der Niere zusätzlich das 32 Aminosäuren starke Urodilatin gebildet⁹³. Über eine Rolle des Urodilatins in der lokalen Regulation der Natrium- und Wasserausscheidung wird kontrovers diskutiert¹¹⁶.

Neben den Kardiomyozyten wurde die mRNA-Expression von ANP bzw. die pro-ANP-Immunoreaktivität u.a. auch in den Geweben der Lunge, des Aortenbogens, des Hirns, der Nebennieren, des Gastrointestinaltrakts und der Chorioidea detektiert¹¹⁷. Da die gemessenen Konzentrationen aber nur ca. 1-2 % der ANP-Level in den Atrien ausmachen, tragen sie vermutlich kaum zur zirkulierenden Plasmakonzentration des Peptids bei. Da auch die GC-A in diesen Geweben exprimiert ist, ist es wahrscheinlicher, dass ANP hier lokale, auto- oder parakrine Wirkungen hat.⁹⁶ Auch in der Niere wurde ANP auf transkriptioneller Ebene detektiert. Die mRNA-Expression konnte in den Podozyten, im proximalen Tubulus und im Sammelrohr nachgewiesen werden¹¹⁸.

Das Molekulargewicht von humanem ANP beträgt 3080 Da, es kann die glomeruläre Filtrationsbarriere somit ungehindert passieren. Die physiologische Plasma-Konzentration beträgt ca. 13 pmol / L und die Halbwertszeit ist mit 2-5 min. geringer als die von BNP. Dafür zeigt es eine höhere Affinität zur GC-A als BNP¹¹⁹.

Die Deletion des ANP-Gens NPPA im Mausmodell führt zu einem ausgeprägten Bluthochdruck und zu kardialer Hypertrophie¹²⁰. Damit ähnelt dieser Phänotyp sehr dem von konventionellen GC-A Knockout-Mäusen (Tabelle 3-3). Eine Überexpression führt hingegen zu einem merklichen Abfall des arteriellen Blutdrucks. Dies weist darauf hin, dass ANP einen hohen Einfluss auf die physiologische Regulation des Blutdrucks hat.

3.3.1.2 Das B-Typ-natriuretische Peptid

Auch die Synthese des B-Typ natriuretischen Peptids geht von einem Präkursor-Protein, dem 134 AS großen Präpro-BNP aus. Nach Abspaltung von 26 Aminosäuren entsteht das Prohormon pro-BNP, das vermutlich auch durch Corin in das biologisch aktive, 32 AS-lange BNP umgewandelt wird⁹⁸. Während die Anzahl der Aminosäuren von ANP in Säugetierspezies hochkonserviert ist, unterscheiden sich diese für BNP teilweise. Porcines BNP besteht wie das humane aus 32 Aminosäuren, das von Ratten und Mäusen enthält dagegen 45 Aminosäuren.

Im Gegensatz zu ANP wird BNP nicht oder kaum gespeichert, sondern im Falle der Erhöhung der ventrikulären Wandspannung vermehrt synthetisiert und direkt sezerniert. Weitere, bereits bei ANP genannte Stimuli (ANG II etc.) spielen auch für BNP eine untergeordnete Rolle.

Anders als bei ANP führt die Deletion des BNP-Gens NPPB im Mausmodell nicht zu einer Hypertension. Die Mäuse sind normotensiv und weisen laut Tamura et al. keine Hypertrophie der Herzen auf. Jedoch zeigt sich in den Ventrikeln eine massive Fibrose¹²¹. Die physiologische Plasmakonzentration ist mit ca. 1,5 pmol / L deutlich geringer als die von ANP (Tabelle 3-2) und auch die Bindungsaffinität zur Guanylatzyklase A ist schwächer¹¹⁹. Kommt es jedoch zu pathologischen Veränderungen, die zu einer mechanischen Überlastung der Ventrikel führen, steigen die BNP-Plasma-Level stärker an als die ANP-Level¹²². Im Rahmen kardio-renaler Erkrankungen wie chronischer Herz- oder Niereninsuffizienz steigen die Plasma-Level sogar auf das 200- bis 300-fache des Ausgangswertes an⁹⁴, so dass BNP einen wirksamen diagnostischen Indikator darstellt. Durch die bessere Stabilität des N-terminalen Fragments NT-pro-BNP wird dieses in der Klinik als Marker-Peptid bei der Einstufung von kardio-renalen Erkrankungen verwendet.

Aus diesen Gründen wird BNP auch als „kardiales Stresshormon“ bezeichnet, das nur in pathophysiologischen Situationen in hohen Konzentrationen im Plasma zirkuliert.

3.3.2 Topologie, Aktivierung und Expression der GC-A

Der natriuretische Peptidrezeptor A (NPR-A) entspricht der membranständigen Guanylatzyklase A (GC-A), die nach Aktivierung die Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) katalysiert¹²³.

Im Jahr 2001 stellten Potter und Hunter ein Model der Struktur des Rezeptors auf⁹⁷. Im basalen, nicht aktivierten Zustand, liegt die Guanylatzyklase oligomerisiert und phosphoryliert vor (Abb. 3-7). Vor allem Dimere, aber auch Tetra- und Hexamere sind bekannt. Der extrazellulären, N-terminalen Ligandenbindungsdomäne schließt eine einzelne, hydrophobe Transmembrandomäne an, der eine intrazelluläre Kinase-ähnliche Domäne folgt, deren Funktion nicht abschließend geklärt ist. Eine Kinase-Aktivität dieser Domäne konnte bisher nicht nachgewiesen werden, jedoch scheint diese Region wichtig für die Modulierung der Enzymaktivität der Zykase-Domäne zu sein¹²⁴. Die für die cGMP-Synthese essentielle katalytische Zykase-Domäne liegt im inaktivierten Zustand noch monomer vor. Sie ist über eine flexible, sog. Anker-Region (engl. „hinge region“) mit der Kinase-ähnlichen Domäne verbunden, die auch als Dimerisierungs-Domäne bezeichnet wird. Nach Bindung der natriuretischen Peptide kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die die unterdrückende Funktion der Kinase-ähnlichen Domäne aufhebt und die Dimerisierung und Aktivierung der Zykase-Domänen veranlasst^{90,94}. Die Regulation der Rezeptor-Aktivität erfolgt durch verschiedene Mechanismen. Zum einen führt eine langanhaltende Bindung von ANP zur Dephosphorylierung und Desensitisierung des Rezeptors¹²⁵. Möglicherweise ist in diesen Prozess eine cGMP-abhängige Proteinkinase involviert¹²⁶. Zum anderen können Proteine, wie ANG II und ET-1, die Phosphorylierung der Kinase-ähnlichen Domäne modulieren und damit eine Inaktivierung des Rezeptors veranlassen. Man spricht dann von einer heterologen Desensitisierung¹²⁷. Die zelluläre Internalisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes konnte bisher nur in Zellkulturstudien gezeigt werden¹²⁸.

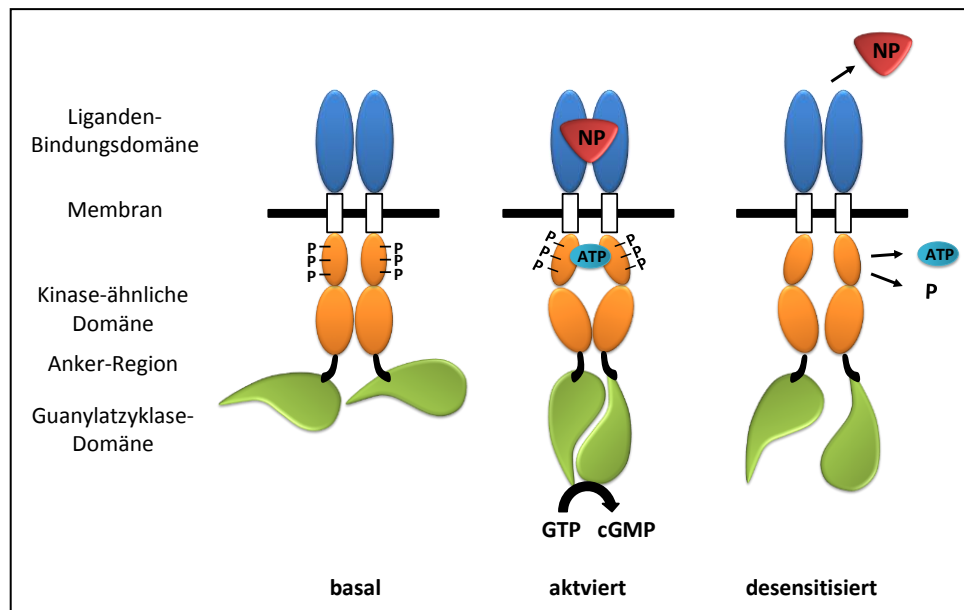


Abb. 3-7: Topologie der GC-A im basalen, aktivierten und desensibilisierten Zustand (angelehnt an Kuhn 2003⁹⁰ und Potter 2001⁹⁷).

Die GC-A wird im gesamten Organismus in zahlreichen Geweben exprimiert, in denen sie an der Regulation vieler Körperfunktionen beteiligt ist. In der Literatur finden sich sowohl Daten zur Detektion des Rezeptors auf transkriptioneller Ebene als auch radioaktive Ligand-Bindungs-Studien sowie immunhistochemische Nachweise in Säugetiergeweben und primären Zelllinien. So wurde die GC-A in den vaskulären glatten Muskelzellen sowie im Endothel der Blut- und Lungengefäße, im zentralen und peripheren Nervensystem, im braunen und weißen Fettgewebe, im Herzen, in der Milz, in der Nebenniere und in der Niere gefunden^{90,94,129,130}, in der der Rezeptor über einen weiten Bereich des Nephrons exprimiert wird. Ritter et al. detektierten die GC-A immunhistochemisch in den Glomeruli, in der Henle-Schleife und in den Haupt- und Schaltzellen der kortikalen und medullären Sammelrohre¹³¹. Nonogushi et al. bestätigten die GC-A-Aktivität nach ANP-Infusion über cGMP-Bildung im Glomerulus und im Sammelrohr¹³². Zudem konnte der Rezeptor in den Renin-produzierenden juxtaglomerulären Zellen¹³³, in proximalen Tubuluszellen und in den Vasa recta detektiert werden¹³⁴. Im Glomerulus wird die GC-A in den afferenten und efferenten Arteriolen¹³⁵⁻¹³⁷, in den Mesangialzellen^{138,139} und in den Podozyten^{64,139,140} exprimiert. Kawagushi et al. detektierten den Rezeptor mithilfe von radioaktiv markiertem ANP (125I-gelabelt) in den Endothelzellen der glomerulären Kapillaren, in der Basalmembran und im Interstitium¹³⁰.

Die essentielle Rolle der GC-A für die Regulation des Blutdrucks und Blutvolumens wurde in zahlreichen Studien an transgenen Mäusen gezeigt, die entweder eine globale oder zellspezifische Deletion des für die GC-A codierenden Gens aufweisen oder den Rezeptor überexprimieren. Eine Zusammenfassung der genetisch veränderten Mausmodelle und

der daraus resultierenden Phänotypen bietet Tabelle 3-3. Durch die Deletion bzw. Überexpression der GC-A in den Kardiomyozyten wird auch die kardioprotektive Rolle des Rezeptors deutlich.

genetische Veränderung der GC-A	Phänotyp	Quelle
globale Deletion	arterielle Hypertension, Herzhypertrophie und -fibrose, plötzlicher Herztod Erhöhtes Plasmavolumen massive glomeruläre Schädigung und Proteinurie	Lopez 1995 ¹⁴¹ und 1997 ¹¹² , Oliver 1997 ¹⁴² , Demerath 2014 ¹⁴³ , Demerath 2014 ¹⁴³ , Ogawa 2012 ¹⁴⁴
globale Überexpression	Arterielle Hypotension	Oliver 1998 ¹⁴⁵
Deletion in glatten Gefäßmuskelzellen	Normotension, Unfähigkeit der Kompensation einer akuten Hypervolämie, daraus resultierend: akute arterielle Hypertension	Holtwick 2002 ¹⁴⁶
Deletion in Endothelzellen	Arterielle Hypertension, Herzhypertrophie, erhöhtes Plasmavolumen	Sabrane 2005 ¹⁴⁷
Deletion in Kardiomyozyten	Arterielle Hypotension durch hohe zirkulierende ANP-Level, kardiale Hypertrophie, gestörte diastolische Relaxation	Holtwick 2003 ¹⁰²
Überexpression in Kardiomyozyten	Unterdrückung des Druck-induzierten Herzwachstums	Kishimoto 2001 ¹⁴⁸

Tabelle 3-3: Mausmodelle mit genetischer Veränderung der GC-A.

3.3.3 cGMP abhängige Signalmechanismen

Obwohl bereits in den 60er Jahren identifiziert, trat das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) erst zusammen mit der Entdeckung von ANP in den 80er Jahren in den Fokus der Forschung¹⁴⁹. Neben der GC-A kann auch die zytosolische bzw. lösliche Guanylatzyklase nach Aktivierung durch Stickstoffmonoxid cGMP synthetisieren.

Die Ausschüttung des Second messengers zieht die Aktivierung einer Reihe von Signalkaskaden nach sich. Ausführliche Übersichtsarbeiten hierzu liefern Lucas et al.¹⁵⁰ und Pfeifer et al.⁹¹. Abb. 3-8 zeigt eine vereinfachte schematische Darstellung der wichtigsten Mechanismen, die durch cGMP initiiert werden.

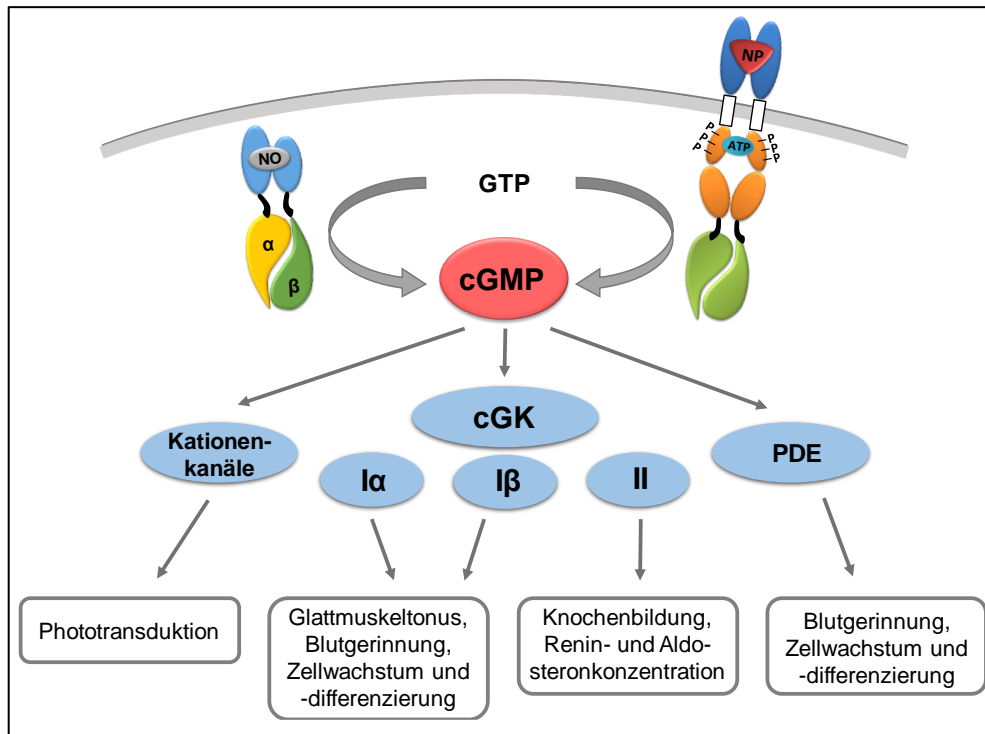


Abb. 3-8: cGMP abhängige Signalmechanismen (angelehnt an Feil 2006¹⁴⁹).

Durch cGMP werden u.a. drei Typen von cGMP-bindenden Proteinen aktiviert, die über die nachfolgenden Signalkaskaden ihre spezifischen Funktionen in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen entfalten. Es handelt sich hierbei um die cGMP-abhängigen Proteinkinasen cGKI α , cGKI β und cGKII⁹¹, cGMP-abhängige Kationenkanäle¹⁵¹ und cGMP-abhängige Phosphodiesterasen (PDE)¹⁵², die sowohl cGMP als auch cAMP hydrolysieren und somit degradieren. Über diese Signalwege greift cGMP u.a. regulierend in den Sehprozess, die Blutgerinnung, das Zellwachstum und Differenzierungsprozesse ein. Darüber hinaus löst cGMP über die Senkung des intrazellulären Calcium-Spiegels die Relaxation glatter Muskelzellen aus, ein Prozess, der u.a. die Dilatation der Blutgefäße bewirkt. Die verminderte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration wird hierbei durch die cGKI hervorgerufen, die über Phosphorylierungen diverser Zielmoleküle deren Aktivität entweder erhöht oder senkt¹⁵³. Hierbei spielt IRAG (engl. „Inositol-1,4,5-Trisphosphate Receptor-associated cGMP Kinase Substrate“) eine wichtige Rolle, das über die cGKI β aktiviert wird und die IP₃-Rezeptor-vermittelte Calcium-Freisetzung reguliert¹⁵⁴. Die vasorelaxierende Wirkung der kardialen natriuretischen Peptide wird also über eine Aktivierung der cGK I hervorgerufen, wobei eine Interaktion mit dem NO / cGMP-Signalweg nicht ausgeschlossen werden kann¹⁵⁵.

Über welche Downstream-Mechanismen die natriuretischen Peptide ihre Wirkungen in den anderen Zielstrukturen vermitteln, ist nicht abschließend geklärt. Es gibt verschiedene

Studien, die auch hier die cGMP-abhängigen Proteinkinasen in den Fokus rücken, die in den Organen und Geweben exprimiert werden, die auch Targets von ANP und BNP darstellen. So zeigten Klaiber et al. im Jahr 2009, dass die antihypertrophen Eigenschaften von ANP auf das Herz über die cGMP-abhängige Proteinkinase I vermittelt werden¹⁵⁶. Die inhibierende Wirkung auf die Renin- und die Aldosteron- Sekretion geht auf die Aktivierung der cGK II zurück^{157,158}.

3.3.4 Physiologische Bedeutung der kardialen natriuretischen Peptide

Durch die weit verbreitete Expression der GC-A entfalten die kardialen natriuretischen Peptide weitere Wirkungen in den unterschiedlichsten Zellen und Geweben des menschlichen Organismus. In den Lungen führt die NP-vermittelte cGMP-Ausschüttung zu einer Dilatation der Bronchien¹⁵⁹. Durch ihre Wirkung im weißen und braunen Fettgewebe, im Skelettmuskel, in der Leber und im Pankreas greifen die natriuretischen Peptide auch in den Energiestoffwechsel ein¹⁶⁰. Zum Beispiel fördert die Aktivierung der GC-A in den Adipozyten des weißen Fettgewebes die Lipolyse¹⁶¹ und steigert im Pankreas die Insulinsekretion¹⁶². Im Herzen zeigen sowohl ANP und BNP als auto- und parakrine Hormone antiproliferative und kardioprotektive Wirkungen. In einer *in vitro* Studie im Jahr 1998 zeigten Calderone et. al, dass ANP das Wachstum von Kardiomyozyten durch die Unterdrückung des Calcium-Influx hemmt¹⁶³. Diese antihypertrophen Wirkungen von ANP konnten von Hayashi et. al im Jahr 2004 bestätigt werden¹⁶⁴. Beide Peptide wirken zudem antifibrotisch¹⁶⁵, wobei BNP hier die stärkere Wirkung zu haben scheint. Dies zeigt sich zum einen anhand des Gen-Knockouts im Mausmodell¹²¹ und zum anderen in Studien an primären kardialen Fibroblasten¹⁶⁶.

Um ihre systemischen Funktionen, die Regulation des Blutdrucks, des Blutvolumens sowie der Fluid- und Elektrolythomöostase zu entfalten, greifen die kardialen natriuretischen Peptide an verschiedenen Zielstrukturen im Organismus an. So zeigen sie Wirkungen in der Niere und Nebenniere, im Blutgefäßsystem und im zentralen und vegetativen Nervensystem. Eine Übersicht hierzu bietet Tabelle 3-4. In den Blutgefäßen sorgen sie neben der Relaxation der glatten Muskelzellen für eine Erhöhung der Permeabilität der Endothelzellen^{167,168}, was zur Senkung des intravasalen Volumens führt. Weiterhin zeigen sie zentralnervöse Wirkungen, wie z.B. die Hemmung des Durstgefühls und der Vasopressin-Synthese¹⁶⁹, was auch zur Regulation des Flüssigkeitshaushalts beiträgt¹⁷⁰.

Als Teil des vasodilatatorischen / natriuretischen Systems stellen die kardialen natriuretischen Peptide die Gegenspieler des vasokonstriktorischen / Natrium-retinierenden Systems dar, zu dem das sympathische Nervensystem (SNS) und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) gehört (Abb. 3-9). Im Stammhirn¹⁷¹, im Herzen¹⁷², und in den Nieren¹⁷³ modulieren ANP und BNP den Sympathikotonus und tragen somit auch indirekt zur Gefäßdilataion bei¹⁷⁴.

Organ	Gewebe	Effekt	Quelle	
Niere	Glomerulus	Steigerung der GFR und der FF	Hirsch 2006 ¹¹⁶ , Cogan 1986 ¹⁷⁵ , Marin-Gretz 1986 ¹³⁵	
	Renales SNS	Hemmung des Sympathikotonus	Imaizumi 1987 ¹⁷³	
	JGA	Hemmung der Reninfreisetzung	Kurtz 1986 ¹³³	
	Tubulussystem		Hemmung der Natrium-Rückresorption	Theilig 2015 ⁹⁸
			Diurese	Theilig 2015 ⁹⁸
	Vasa recta	Erhöhung des medullären Blutflusses	Kiberd 1987 ¹⁷⁶	
Nebenniere	Zona glomerulosa	Hemmung der Aldosteron-Freisetzung	Atarashi 1985 ¹⁷⁷	
Blutgefäßsystem	glatte Muskelzellen	Relaxation und dadurch Gefäßdilataion	Holtwick 2002 ¹⁴⁶	
	Endothel	Modulation der Permeabilität	Curry 2005 ¹⁶⁷ , Kuhn 2012 ¹⁶⁸ , Aronson 2002 ¹⁷⁸	
		Hemmung der Endothelin-Freisetzung		
	Aortenbogen	Modulation des Barorezeptorreflexes	Volpe 1987 ¹⁷⁹	
Hirn / ZNS	Hypothalamus	Hemmung der Vasopressinausschüttung	Samson 1987 ¹⁶⁹	
	Hypothalamus	Hemmung des Durstgefühls	Brenner 1990 ¹⁷⁰	
	Stammhirn	Suppression des Sympathikotonus	Schultz 1988 ¹⁷¹	
Herz	Kardiales SNS	Modulation des Sympathikotonus	Melo 1999 ¹⁷²	

Tabelle 3-4: Effekte der NP auf Blutdruck und Blutvolumen. GFR: Glomeruläre Filtrationsrate. FF: Filtrationsfraktion. SNS: Sympathisches Nervensystem. JGA: Juxtaglomerulärer Apparat. ZNS: Zentrales Nervensystem. (angelehnt an Kuhn 2003⁹⁰).

Im Aortenbogen greifen sie in die Kontrolle des Barorezeptorreflexes ein^{174,180}. Darüber hinaus wirken sie den vasokonstriktorischen Effekten des RAAS entgegen, indem sie einerseits die Aldosteron-Sekretion in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde hemmen¹⁷⁷ und andererseits die Sekretion des Renins in den Granulazellen des juxtaglomerulären Apparats inhibieren¹³³. Damit wird die Synthese von Angiotensin II unterdrückt. Nakagawa et al. stellten zudem erst kürzlich eine inhibierende Wirkung des atrialen natriuretischen Peptids auf die Aktivität des Mineralocorticoid-Rezeptors fest¹⁸¹. Zusätzlich hemmen die natriuretischen Peptide die Sekretion des in den Endothelzellen vorkommenden, vasokonstriktorisch wirkenden Endothelin-1^{178,182}.

filamente denkbar⁷⁹. Die Erschlaffung der podozytären Fußfortsätze könnte durch die resultierende Verringerung des kapillaren Widerstands zu einer Vergrößerung der Filtrationsfläche und damit zu einer Erhöhung des Filtrationskoeffizienten K_F führen. Diese Hypothese wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit anhand einer podozytenspezifischen GC-A Knockout Maus (im Folgenden „Podo GC-A KO“) untersucht.

Die Natriuresis wird einerseits über die glomeruläre Filtrationsrate und andererseits über eine Hemmung der Rückresorption der Natrium-Ionen in den Nierentubuli gesteuert^{186,187}. Auch hier sind die Wirkungsmechanismen noch unklar. Mögliche Angriffspunkte im proximalen Tubulus sind der Na^+ / H^+ -Antiporter, der in der apikalen Membran des Bürstensaums lokalisiert ist¹⁸⁸, die basolateral verankerte Na^+ / K^+ -ATPase, die die Triebkraft der Natrium-Aufnahme in die Tubuluszellen bildet¹⁸⁹, sowie organische und anorganische Ionenkanäle^{190,191}. Auch im distalen Tubulus^{192,193} und in den Sammelrohren konnte eine Steigerung der Natriuresis durch ANP und BNP festgestellt werden¹⁹⁴⁻¹⁹⁷.

3.3.5 Elimination der kardialen natriuretischen Peptide

Die Elimination der natriuretischen Peptide kann auf drei verschiedenen Wegen erfolgen:

- I. durch Bindung an den natriuretischen Peptid-Rezeptor-C
- II. durch enzymatischen Abbau durch die Neutrale Endopeptidase 24.11
- III. durch Filtration in den Primärharn und renale Ausscheidung.

Die Bindung der natriuretischen Peptide an den natriuretischen Peptid-Rezeptor C (NPR-C) führt zu ihrer zellulären Internalisierung und Degradierung. Hierbei bindet der sogenannte „Clearance-Rezeptor“ ANP, BNP und CNP mit ähnlicher Affinität¹⁹⁸. Die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors ähnelt der von GC-A und GC-B, die intrazelluläre Domäne hingegen besteht aus nur 37 Aminosäuren und besitzt keine Guanylatzyklase-Aktivität. Der ubiquitär vorkommende Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der zirkulierenden und lokalen ANP- und BNP-Level. So konnten Matsukawa et al. an NPR-C Knockout-Mäusen zeigen, dass die Inaktivierung des Rezeptors zu längeren Halbwertszeiten der natriuretischen Peptide im Plasma führt, was mit einer milden Diurese und einem tendenziellen Blutdruckabfall einherging¹⁹⁹. Neuere Studien zeigen, dass zwei Subtypen des NRP-C existieren, ein 77 kDa großes Molekül, das als Clearance-Rezeptor fungiert und ein 67 kDa großes Protein, das nach Aktivierung antihypertensive Effekte durch die Inhibierung der Adenylatzyklase zeigt²⁰⁰.

Über die neutrale Endopeptidase 24.11, auch Neprilysin, werden die natriuretischen Peptide enzymatisch abgebaut. Die Zink-abhängige, membranständige Metalloprotease kommt vor allem im Bürstensaum des proximalen Konvoluts, aber auch in der Lunge, im Darm, in den Hoden und im Endothel vor^{201,202}. Sie spaltet die für die Ligandenbindung essentielle Ringstruktur der natriuretischen Peptide und führt somit zu ihrer Degradierung²⁰³. Hierbei besitzt ANP eine höhere Affinität zu Neprilysin als BNP²⁰⁴, was die unterschiedliche Halbwertszeit der Peptide im Plasma erklären könnte. Neprilysin degradiert allerdings nicht nur die natriuretischen Peptide, sondern auch Komponenten des vasokonstriktorischen Systems wie ANG II²⁰⁵ und ET-1²⁰⁶. Die Regulierung der blutdrucksenkenden Effekte der natriuretischen Peptide durch Neprilysin ist also abhängig vom Gleichgewicht zwischen den vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Elementen. Aus diesem Grund wurden zu therapeutischen Zwecken Wirkstoffe entwickelt, die einerseits den Abbau der kardialen natriuretischen Peptide durch Neprilysin hemmen und andererseits eine Suppression des RAAS, z.B. durch Hemmung der ACE oder Blockade der AT1-Rezeptoren, bewirken.

3.3.6 Pathophysiologische Bedeutung der kardialen natriuretischen Peptide

Die blutdrucksenkende und kardioprotektive Wirkung der kardialen natriuretischen Peptide wurde in vielen präklinischen Studien gezeigt und auch in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen rücken sie immer weiter in den Fokus.

So stehen z.B. mit Anaritid²⁰⁷ und Nesiritid²⁰⁸ seit einigen Jahren rekombinante Varianten von ANP und BNP zur Verfügung, die in einigen Ländern auch therapeutisch zugelassen wurden. Zunächst gefundene nierenschädigende Nebenwirkungen²⁰⁹ des seit 2001 in den USA zugelassenem BNP-Analogons Nesiritid konnten im Jahr 2011 im Rahmen der ASCEND-HF-Studie widerlegt werden²¹⁰. Wie das in Japan schon seit 20 Jahren zugelassene ANP-Analogon Carperitid²¹¹ besitzen sie allerdings eine sehr kurze Halbwertszeit und zeigen teilweise starke Nebenwirkungen. Dementsprechend wurden neue, länger wirksame und besser verträgliche Proteine, wie das synthetische ANP-Analogon M-ANP entwickelt²¹².

Andere Ansätze zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen zielen auf die Erhaltung hoher Plasmalevel der endogenen Peptide ab. So wurde der oral verfügbare Neprilysin-Inhibitor Candoxatril zur Therapie der Hypertension entwickelt²¹³. Leider konnte nur eine geringe blutdrucksenkende Wirkung erzielt werden, was sich durch die hohen ANG-II-Level und dementsprechende Aktivierung des RAAS erklären lässt²¹⁴.

Vielversprechender zeigte sich der Vasopeptidase-Inhibitor Omapatrilat, der sowohl Neprilysin als auch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) hemmt und somit neben der Erhaltung der NP-Plasma-Level auch eine Suppression des RAAS bewirkt²¹⁵. Aufgrund des Risikos der Angioödem-Bildung im Zuge der Therapie wurde die Zulassung in den USA im Jahr 2000 zurückgezogen^{216,217}.

Erst im vergangenen Jahr wurde das von der Firma Novartis entwickelte „Entresto“ (LCZ696) zugelassen. Es gehört zur Gruppe der sogenannten „ARNIs“, der AT1-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitoren. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus dem AT1-Blocker Valsartan und dem Neprilysin-Inhibitor Sacubitril, die in der klinischen PARADIGM-HF Studie von McMurray et al. im Jahr 2013 sowohl antihypertensive als auch antifibrotische Wirkungen zeigte²¹⁸ und seit Dezember letzten Jahres auch in Europa zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz zugelassen wurde²¹⁹.

Auch zur nephroprotektiven Wirkung von ANP und BNP wurden bereits Tierversuche und klinischen Studien durchgeführt.

So konnten z.B. die Überexpression von BNP²²⁰ oder die Infusion von ANP²²¹ in transgenen Mäusen renale Schädigungen verringern und eine Albuminurie reduzieren. Für das bereits erwähnte ANP-Analogon M-ANP konnte in präklinischen Studien eine blutdrucksenkende Wirkung nachgewiesen werden, die mit einem erhöhten renalen Blutfluss und einer gesteigerten GFR einherging²¹².

Im Gegensatz dazu führte die Unterbrechung der NP / GC-A / cGMP- Signalkaskade, etwa durch genetische Deletion des Rezeptors, sogar unter basalen Bedingungen zu mesangialer Expansion, Albuminurie und Nierenfibrose, die mit erhöhten proinflammatorischen Zytokin-Spiegeln einherging^{222,223}. Behandelt man konventionelle GC-A Knockout-Mäuse zusätzlich mit Aldosteron und einer Hochsalzdiät, führt dies zu einer massiven Albuminurie und sehr starken Nierenschädigung¹⁴⁴.

Das nach herzchirurgischen Maßnahmen oft auftretende akute Nierenversagen (AKI, engl. „acute kidney injury“) konnte sowohl durch ANP als auch durch BNP in mehreren klinischen Studien gesenkt werden²²⁴⁻²²⁷ und auch für das bereits erwähnte „Entresto“ wurden nephroprotektive Wirkungen festgestellt^{228,229}.

Wie die natriuretischen Peptide ihre nephroprotektiven Wirkungen entfalten, ist derzeit noch unklar. Durch die weitläufige Expression der GC-A und die pleiotropen Wirkungen der natriuretischen Peptide wäre es plausibel, dass die positiven, nephroprotektiven Effekte durch die blutdruck- und blutvolumensenkende Wirkung, eben durch die

Antagonisierung des RAAS und des SNS, hervorgerufen werden. Da die GC-A aber auch in den Podozyten des Glomerulus exprimiert wird, die maßgeblich an der Retention von Albumin an der Blut-Harn-Schranke beteiligt sind, und da die natriuretischen Peptide in diversen Studien eine Albuminurie verbessern konnten, könnte dieser nephroprotektive Effekt auch durch eine direkte Protektion des Podozyten erreicht werden. Diese Hypothese wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit anhand einer podozytenspezifischen GC-A Knockout-Maus (Podo GC-A KO) untersucht.

4 Methoden

4.1 Generierung und Genotypisierung der Mauslinien

4.1.1 Podo GC-A KO

Die Generierung der podozytenspezifischen GC-A Knockout-Maus erfolgte anhand des Cre-LoxP-Systems^{230,231} (Abb. 4-1). Hierfür wurden die von Prof. Michaela Kuhn (Institut für Physiologie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellten GC-A^{flox/flox} Mäuse mit Mäusen verpaart, die die Cre (engl. „Cyclic Recombination“)- Rekombinase unter dem podozytenspezifischen Promotor *NPHS2* (codiert für Podocin) exprimieren. Das Exon 2 der GC-A^{flox/flox} Mäuse wurde durch das Einbringen von LoxP (engl. „Locus of X- over of P1“)-Erkennungssequenzen markiert, es wurde also „gefloxt“. Die Cre-Rekombinase erkennt diese Markierung und schneidet das dazwischen befindliche DNA-Fragment unter Bildung eines zyklischen Produktes aus dem Chromosom der Tiere und baut dieses ab, so dass die Expression der GC-A inaktiviert wird. Da die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des für Podocin codierenden Gens nur in den Podozyten exprimiert wird, bleibt die Genexpression der GC-A in allen Zellen außer den Podozyten erhalten.

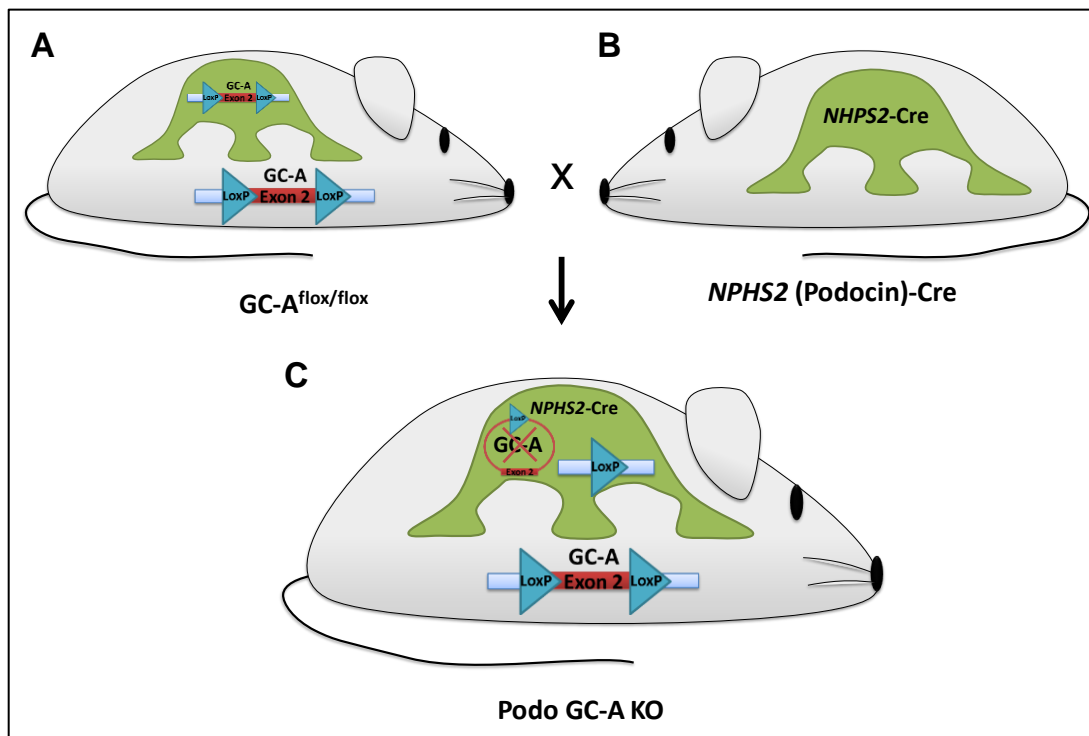


Abb. 4-1: Generierung der Podo GC-A KO Maus anhand des Cre / LoxP-Systems. **A.** „gefloxt“e GC-A Maus, die die Guanylatzyklase A in allen Zellen exprimiert. Das Exon 2 des für die GC-A codierenden Gens ist durch LoxP-Stellen markiert und kann von der Cre-Rekombinase erkannt werden. **B.** Podo-Cre-Maus, die die Cre-Rekombinase in den Podozyten unter der Kontrolle des *NPHS2*-Promotors exprimiert. **C.** Durch die Verpaarung von A und B entsteht die *NPHS2-Cre* x *GC-A^{flox/flox}* (Podo GC-A KO) Maus, die eine Deletion des GC-A Gens in den Podozyten aufweist.

Die homozygoten Versuchstiere ($NPHS2\text{-Cre} \times GC\text{-A}^{\text{flox/flox}}$, im Folgenden Podo GC-A KO) wurden aus den heterozygoten Nachkommen ($NPHS2\text{-Cre} \times GC\text{-A}^{\text{+flox}}$) unter mehrmaliger Rückkreuzung mit C57Bl/6J Wildtyp-Mäusen generiert.

4.1.2 Podo GC-A KO mTmG

Um Podozyten für die weitere Analyse isolieren zu können, wurden die Podo GC-A^{+flox} Mäuse mit einer Reportermaus ($Gt(ROSA)26Sor^{\text{tm4}(ACTB\text{-tdTomato},\text{-EGFP})Luo/J}$, im Folgenden mTmG)²³² gekreuzt. Deren Genom enthält ebenso ein LoxP-markiertes Transgen, welches für ein rot fluoreszierendes Protein (RFP, mT) codiert und ein nachfolgendes Stopcodon beinhaltet. Zudem enthält die Genkassette dieser Mäuse dem RFP nachgeschaltet ein weiteres Transgen, das für ein grün fluoreszierendes Gen (GFP, mG) codiert. Ohne weitere Verpaarung fluoreszieren alle Zellen dieser Maus rot, weshalb sie auch als „Tomato“-Maus bezeichnet wird. Kreuzt man sie jedoch mit einer Maus, die die Cre-Rekombinase zellspezifisch exprimiert, wird das für RFP codierende Gen und das nachfolgende Stopcodon durch das Enzym entfernt, so dass nun die Transkription des GFPs erfolgt und die Zellen, die die Cre-Rekombinase exprimieren, grün fluoreszieren. Die in dieser Arbeit generierten Podo GC-A KO Mäuse exprimierten nach der Verpaarung mit den mTmG-Mäusen das GFP nur in den Podozyten, während alle anderen Zellen rot fluoreszierten. Dieses Konstrukt machte eine Isolierung der Podozyten mittels FACS (siehe Abschnitt 4.8.3) möglich.

4.1.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung der drei bis fünf Wochen alten Versuchstiere erfolgte mit der Unterstützung von Frieda Webinger (AG Prof. Schweda, Institut für Physiologie, Universität Regensburg) anhand der Polymerase-Kettenreaktion nach Isolierung der DNA aus der Schwanzspitze der Versuchstiere.

4.1.3.1 Gewinnung genomischer DNA

Zwei Millimeter der Schwanzspitze des Versuchstiers wurden mit einem Skalpell entfernt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 600 µl TNES-Puffer und 10 µl Proteinase K (10 mg / ml) wurde das Reaktionsgefäß mehrmals per Hand geschwenkt und das Gewebe anschließend bei 56°C und 550 rpm auf einem Heizschüttler mindestens drei Stunden (oder über Nacht) verdaut. Zur Fällung der Proteine wurden 166,7 µl einer gesättigten NaCl-Lösung zugegeben, die Suspension 15-20 min. bei 800 rpm und Raumtemperatur (RT) geschüttelt und dann 15 min. bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Im Anschluss wurden 500 µl des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit

500 µl EtOH 100% versetzt und erneut mehrmals per Hand geschwenkt, bevor die Mischung 5 min. bei 13000 rpm und RT zentrifugiert wurde. Nach der vorsichtigen Absaugung des Überstands wurde das entstandene Pellet mit 500 µl 80%igen EtOH gewaschen und 10 min. bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Danach wurde der Überstand nahezu restlos abgesaugt und die geöffneten Reaktionsgefäße bei 37°C ohne Schütteln unter dem Abzug zum Trocknen stehen gelassen. Im Anschluss wurde das gereinigte DNA-Pellet in 40 µl frischem, entionisiertem Wasser (Millipore®) gelöst und eine Stunde unter dem Abzug bei 55°C und 300 rpm leicht geschwenkt.

4.1.3.2 Analyse der DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. „Polymerase chain reaction“, PCR) ist es möglich, die Existenz bestimmter Gene im Genom einer Gewebeprobe qualitativ nachzuweisen. Durch die Auswahl geeigneter Primer (siehe Anhang) ist so eine Genotypisierung der Versuchstiere hinsichtlich gewünschter Gene möglich.

Tabelle 4-1 zeigt die Zusammensetzung der Bestandteile, die für die PCR verwendet wurden, in Tabelle 4-2 ist das Amplifizierungsprotokoll der PCR aufgelistet. Die Ergebnisse der PCR sind in Abschnitt 5.1.1 dargestellt.

Bestandteil	Menge für einen 20µl-Ansatz [µl]
5 x GoTaq-Puffer	4
Primer for	2
Primer rev	2
dNTPs	0,8
H ₂ O	10
GoTaq DNA-Polymerase	0,2
DNA-Probe	1

Tabelle 4-1: Mastermix-Zusammensetzung für die Genotypisierungs-PCR. **GoTaq-Puffer:** hält das Reaktionsmilieu der DNA-Polymerase auf einem pH-Wert von 8. **Primer:** Oligonukleotide mit bestimmter Erkennungssequenz für das zu detektierende Gen. **dNTPs:** Desoxyribonukleotid-triphosphate, Basenbausteine der DNA. **GoTaq DNA-Polymerase:** Enzym aus *Thermus aquaticus*, das die Amplifikation ermöglicht.

Temperatur [°C]	Dauer [min.]	Zyklen	Phase
94	5	1	Aktivierung
94	1	35	Denaturierung
60	1	35	Annealing
72	1	35	Elongation
72	10	1	Elongation
8	∞	1	Lagerung

Tabelle 4-2: Amplifizierungs-Protokoll der Genotypisierungs-PCR. **Aktivierung:** Aufheizphase zur Aktivierung der DNA-Polymerase. **Denaturierung:** Auftrennung der DNA-Doppelhelix. **Annealing:** Primer-Hybridisierung, also Anlagerung der Primer an den DNA-Strang. **Elongation:** Arbeitsphase der DNA-Polymerase.

4.1.3.3 Gelelektrophorese

Das erhaltene PCR-Produkt wurde im Anschluss an die PCR gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels des Fluoreszenz-Farbstoffs „peqGREEN“ detektiert. Hierfür wurde ein 2%iges Agarosegel in TBE-Puffer hergestellt, dem der Farbstoff kurz vor dem Ausgießen zugesetzt wurde. Nach Auftragung der PCR-Produkte wurde das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Kammer gelegt und die Proben bei einer Spannung von 130 V über den Zeitraum von 45 min. aufgetrennt. Anhand des ebenfalls auf das Gel aufgetragenen Basenpaar-Standards konnten die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe auf dem UV-Tisch (Firma Faust, Anregung bei 312 nm) detektiert werden (siehe Abb. 5-1).

4.2 Haltung der Versuchstiere

Alle für diese Arbeit erforderlichen Experimente an Labortieren wurden gemäß den „Guidelines for the care and use of animals in research“ des US-amerikanischen NIH durchgeführt und behördlich genehmigt. Als Versuchstiere dienten ausschließlich adulte Tiere mit einem Mindestalter von 10 Wochen. Die Tierhaltung erfolgte gemäß den Empfehlungen der FELASA bei gleichbleibender Raumtemperatur ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) und Luftfeuchte ($55\% \pm 5\%$) in einem zwölfstündigen Hell- / Dunkel- Rhythmus. Die Tiere hatten in jedem Experiment freien Zugang zu Futter und Leitungswasser über den gesamten Versuchszeitraum.

4.3 Behandlungs-Modelle

4.3.1 Unilaterale Nephrektomie

Die Entfernung der linken Niere erfolgte unter aseptischen Bedingungen und einer Isofluran-Inhalationsnarkose auf einem beheizbaren Operationstisch mit sterilem Operationsbesteck. Nach Desinfektion des gesamten Operationsbereichs und Auflegen eines sterilen OP-Tuchs erfolgte eine etwa 1 cm lange dorsoventrale Inzision der Haut entlang der linken Flanke. Um größere Blutungen zu vermeiden, erfolgte nur ein kleiner Schnitt in die Tunica serosa, während die weitere Öffnung des Retroperitoneums durch Spreizen der Schere erreicht wurde. Im Anschluss wurde die Niere vorsichtig herausgehoben und von Fett- und Bindegewebsfaszien befreit. Die Nebenniere wurde vorsichtig abgetrennt und in die Körperhöhle zurückgeführt. Nach Ligation des Ureters und der zu- und abführenden Nierengefäße mit einem 7.0-Seidenfaden wurde die Niere entnommen, von der Nierenkapsel befreit, halbiert, gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Muskelschicht wurde mit Terylene 4.0 vernäht, wobei darauf geachtet wurde, dass die Innenseiten der Serosa überlappen. Das Verschließen der Hautschicht erfolgte mit Hautklammern. Nach Verschließen der Wunde wurde diese mit einer Iodlösung desinfiziert. Die entfernten Nieren wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. „Zum Schein“ (Sham) operierte Mäuse wurden, mit Ausnahme der Ligation der Nierengefäße, des Abtrennens der Nebenniere von der Niere und der Exzision der Niere, demselben Prozedere unterzogen.

4.3.2 BNP-Infusion

Die Infusion des B-Typ natriuretischen Peptids erfolgte über die linke Vena jugularis in narkotisierten Versuchstieren (Abb. 4-2). Zur Anästhesie der Tiere wurde eine Isofluran-Gasnarkose (1,5% Isofluran; 0,8-1 L / min. O_2) verwendet. Nach Einleitung der Narkose wurden die Versuchstiere auf einem beheizten Operationstisch fixiert. Die Körpertemperatur wurde während der OP mit einer Rektalsonde überwacht und konstant bei $37,5\text{-}38^{\circ}\text{C}$ gehalten. Nach einem ca. 1 cm großen Hautschnitt und stumpfer Durchtrennung der Glandulae mandibulares wurde die Vena jugularis freipräpariert und kranial mit einem 7.0-Seidenfaden ligiert. Nach Inzision der Vene wurden zwei an jeweils einer 1 ml-Spritze befindliche Polyethylen-Katheter eingeführt und mit einem weiteren Seidenfaden fixiert. Über einen der Katheter erfolgte eine kontinuierliche Infusion des zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate benötigten FITC-Sinistrins (1,5 mg / ml in NaCl 0,9%). Der zweite Katheter diente zur Infusion des rekombinanten, murinen B-Typ natriuretischen Peptids (1 ng / min. / g KGW in NaCl 0,9%). Mit Hilfe von Spritzenpumpen

wurden die Lösungen kontinuierlich mit einer Pumprate von je $0,1 \mu\text{l} / \text{min} / \text{g KGW}$ laut dem in Tabelle 4-3 angeführten Versuchsprotokoll infundiert (siehe auch Abschnitt 4.4.2).

	Äquilibrationsphase	Kontrollphase	Behandlungsphase
Dauer	ca. 20 min.	30 min.	30 min.
GFR-Messung	FITC-Sinistrin ($0,15 \mu\text{g} / \text{min} / \text{g KGW}$)		
Behandlung	NaCl 0,9% ($0,1 \mu\text{l} / \text{min} / \text{g KGW}$)		BNP ($1 \text{ ng} / \text{min} / \text{g KGW}$) bzw. NaCl 0,9% (wie vorher)

Tabelle 4-3: Versuchsprotokoll der BNP-Infusion in anästhesierten Mäusen.

Während des gesamten Versuchszeitraums wurde der mittlere arterielle Blutdruck in der Arteria carotis gemessen (Abschnitt 4.5.2). Zur Ermittlung des pro Versuchsphase entstandenen Urinvolumens wurde die Blase freigelegt, durch Punktion und Aspiration mittels einer Insulinspritze geleert und der neu produzierte Urin am Ende jeder Phase in gleicher Weise abgenommen. Aus dem gesammelten Urin wurde außerdem die Natriumkonzentration mittels Flammenphotometrie (Abschnitt 4.7.3) bestimmt.

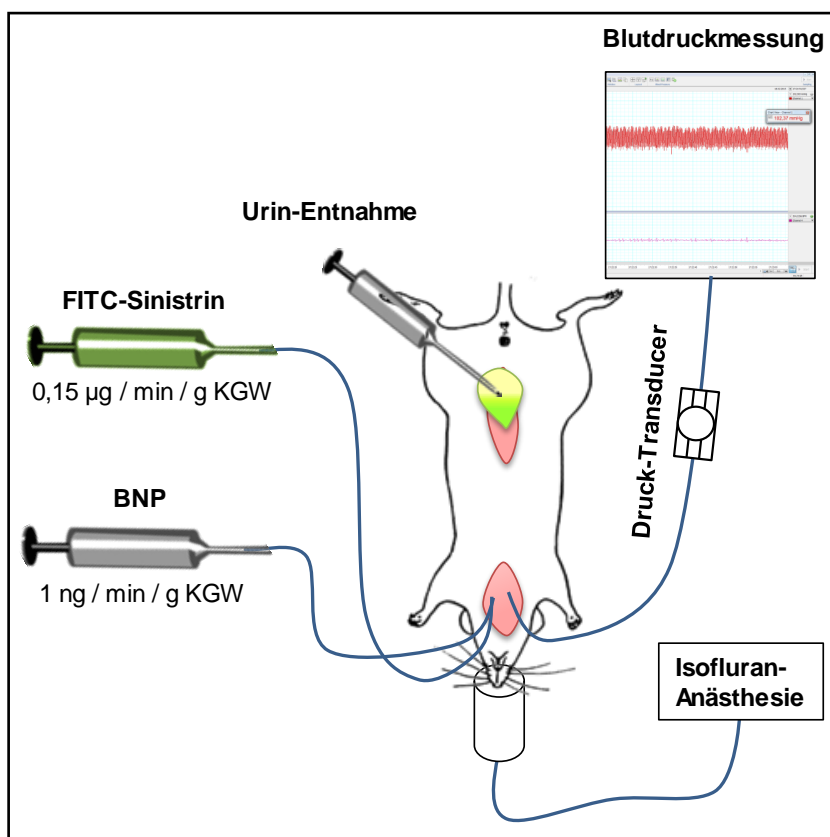


Abb. 4-2: Versuchsaufbau zur BNP-Infusion am narkotisierten Versuchstier.

4.3.3 Das „DOCA-Salt“ Modell

4.3.3.1 Sechswöchige DOCA-Behandlung

Die Behandlung der Versuchstiere erfolgte nach dem in Abb. 4-3 angeführten Versuchsprotokoll. Nach Bestimmung der basalen kardiovaskulären (art. Blutdruck, Herzfrequenz, Plasma-Renin-Konzentration) und renalen Parameter (GFR, Urin-, Natrium- und Albumin-Exkretion) wurden die Mäuse einer linksseitigen Uninephrektomie unterzogen. Zwei Wochen später erfolgte die subkutane, dorsale Applikation eines DOCA-Pellets (50 mg, 21-Tage-Freisetzung, IRA). Hierfür wurde eine ca. 0,5 cm große Inzision in die Nackenfalte vorgenommen und die Haut mit einer stumpfen Pinzette von der Muskelschicht gelöst, so dass eine ausreichend große Tasche entstand. Anschließend wurde das Pellet vorsichtig eingesetzt und bis zur Flanke des Hinterlaufs vorgeschoben. Die Operationswunde wurde mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gespült, mit Hilfe von Hautklammern geschlossen und mit einer Iodlösung desinfiziert. Ab dem Zeitpunkt der DOCA-Applikation erfolgte die Umstellung des Futters auf eine Hochsalzdiät (4% NaCl). Nach drei Wochen wurde die Applikation des DOCA-Pellets wiederholt. In der letzten Woche des Versuchs wurden die renalen und kardiovaskulären Parameter erneut bestimmt. Am Ende des Experiments erfolgte die Perfusionsfixierung der rechten Nieren (siehe Abschnitt 4.10.1) unter tiefer Isofluran-Narkose der Versuchstiere (4% Isofluran; 0,8 L / min. O₂). Die Nieren wurden zur Anfertigung von Gefrier- und Paraffinschnitten sowie Gewebeschnitten für die Transelektronenmikroskopie verwendet.

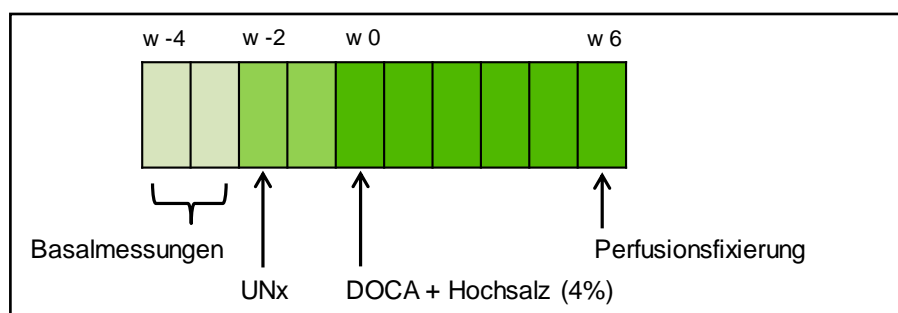


Abb. 4-3: Versuchsplan der sechswöchigen DOCA-Behandlung. **Basalmessungen:** Kardiovaskuläre und renale Parameter der Versuchstiere wurden unter physiologischen Bedingungen untersucht. **UNx:** linksseitige unilaterale Nephrektomie. **DOCA + Hochsalz:** subkutane Implantation eines DOCA-Pellets und Futterumstellung auf 4%ige Hochsalzdiät. **Perfusionsfixierung:** Fixierung der Nieren mit 4%iger PFA-Lösung. **wZahl:** Angabe der Woche(n), in der / denen die Behandlung durchgeführt wurde.

4.3.3.2 Zweiwöchige DOCA / SKF-Behandlung

Eine weitere Gruppe Versuchstiere wurde einer zweiwöchigen DOCA-Behandlung unterzogen, die mit einer begleitenden Applikation des TRPC-Kanalblockers SKF 96365 (im Folgenden „SKF“) einherging (Abb. 4-4). Hierbei erfolgte die DOCA-Behandlung nach UNx analog des sechswöchigen Versuchs. Ab dem Tag der DOCA-Pellet-Implantation wurde einigen Mäusen zusätzlich eine tägliche intraperitoneale SKF-Injektion (10 µg / g KGW in 0,9% NaCl) verabreicht, während eine Vergleichsgruppe das gleiche Volumen einer reinen 0,9%igen Kochsalzlösung erhielt. Alle sechs Tage wurde Spontanurin von den Mäusen gesammelt und nach zwölf Tagen die glomeruläre Filtrationsrate bestimmt. Nach der zweiwöchigen Behandlung wurden die Versuchstiere narkotisiert (4% Isofluran; 0,8 L / min. O₂) und die Perfusionsfixierung mit 4%igem PFA vorbereitet. Vor der Fixierung wurde der mittlere arterielle Blutdruck in der Aorta abdominalis gemessen und die Versuchstiere durch die Entnahme von ca. 1 ml Vollblut durch Herzpunktion getötet. Nachfolgend wurden die rechten Nieren mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und der obere Pol zur späteren Mikrodissektion und Isolierung der Glomeruli entfernt. Die isolierten Glomeruli dienten der Western Blot-Analyse von TRPC6 und Podocin.

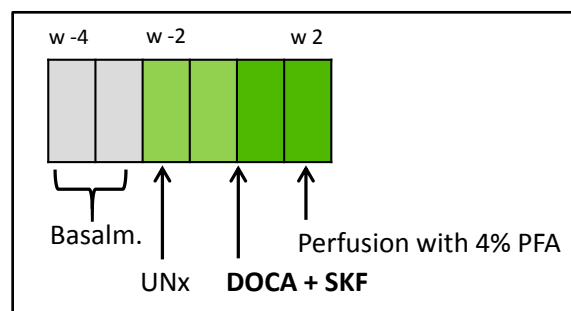


Abb. 4-4: Versuchsplan der zweiwöchigen DOCA-Behandlung mit gleichzeitiger Applikation des TRPC-Kanalblockers SKF 96365. **Basalm.:** Basalmessungen: Kardiovaskuläre und renale Parameter der Versuchstiere wurden unter Kontrollbedingungen untersucht. **UNx:** linksseitige unilaterale Nephrektomie. **DOCA + SKF:** subkutane Implantation eines DOCA-Pellets, Futterumstellung auf 4%ige Hochsalzdiät, tägliche Injektion von SKF 96365. **Perfusionsfixierung:** Fixierung der Nieren mit 4%iger PFA-Lösung. **wZahl:** Angabe der Woche(n), in der / denen die Behandlung durchgeführt wurde.

4.4 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate

Die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate erfolgte zum einen über die Messung der FITC-Sinistrin-Clearance in narkotisierten Mäusen und zum anderen über die von Qi et al. beschriebene „Single-Shot-Clearance“-Methode an der wachen Maus²³³.

4.4.1 FITC-Sinistrin- „Single shot“ Clearance im wachen Tier

Zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate von wachen Mäusen wurde den Versuchstieren eine Bolusinjektion („Single shot“) des Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Oligosaccharids Sinistrin verabreicht. Hierzu wurden die Mäuse kurz mit einem 2%igen Isofluran-Sauerstoffgemisch narkotisiert und eine 1,5%ige Lösung des FITC-Sinistrins (in NaCl 0,9%) wurde retrobulbär in den medialen Augenwinkel injiziert. Das zu injizierende Volumen wurde anhand des Körpergewichts berechnet ($3,74 \mu\text{l} / \text{g KGW}$). Mittels einer 30G-Kanüle wurde anschließend in mehreren Zeitabständen (3, 7, 10, 15, 35, 55, 75 min.) Blut aus der Schwanzvene (Vena caudalis lateralis) entnommen und in heparinisierte $5 \mu\text{l}$ Kapillaren überführt. Die Mäuse wurden hierzu in beleuchtete Kammern gesetzt, die neben der Fixierung der Tiere auch eine Dilatation der Vene durch die Erwärmung des Schwanzes ermöglichten. Die Blutproben wurden bei 12000 rpm 7 min. lang zentrifugiert, um das Plasma von den festen Blutbestandteilen zu trennen. Nach Bestimmung des Hämatokrits wurde das Plasma mit Hilfe eines Glasschneiders abgetrennt und im Verhältnis 1:10 mit 0,5 M HEPES-Puffer verdünnt, um einen konstanten pH-Wert von 7,4 zu halten. Die Fluoreszenz der Plasmaproben wurde mit dem Nanodrop-ND-3300-Fluoreszenzspektrometer bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer FITC-Emission von 515 nm gemessen. Die Berechnung der GFR erfolgte über ein 2-Kompartiment-Modell, bei dem der Abfall der FITC-Sinistrin-Konzentration in zwei Phasen über die Versuchszeit von 75 min. aufgetragen wurde. Die entstandene Exponentialfunktion zeigte einen ersten, schnellen Abfall, der die Umverteilung des Fluoreszenz-Markers vom intravasalen in den extrazellulären Raum kennzeichnet und eine nachfolgende langsamere Abnahme der Fluoreszenz, die maßgeblich durch die renale Eliminierung des FITC-Sinistrins bestimmt wird. Über die aus einer Standardgeraden ermittelte injizierte Menge des Markers und die Schnittpunkte der Senkungsgeraden beider Phasen mit der Y-Achse sowie die Senkungskonstanten ließ sich die GFR berechnen.

4.4.2 FITC-Sinistrin-Clearance im narkotisierten Tier

Zur Untersuchung der Auswirkungen der BNP-Infusion wurde die glomeruläre Filtrationsrate anhand der Clearance von FITC-Sinistrin in narkotisierten Mäusen bestimmt. Hierfür wurde eine 1,5%ige Lösung des Oligosaccharids ($0,15 \mu\text{g} / \text{min.} / \text{g KGW}$) über die Jugularvene wie unter 4.3.2 beschrieben infundiert. Um ein schnelleres Anfluten des Tracers im Plasma zu erreichen, wurde die Pumprate zu Beginn der Infusion für eine Minute auf das Zehnfache erhöht ($1 \mu\text{l} / \text{min.} / \text{g KGW}$). Nach einer 20-minütigen

Äquilibrierungsphase wurde die Blase des Versuchstiers mit einer Insulinspritze vollständig entleert, fünf Mikroliter Blut (P0) aus der Schwanzvene entnommen und die Kontrollphase (Ktrl) unter gleichzeitiger Infusion einer physiologischen Kochsalzlösung (0,1 µl / min. / g KGW) gestartet. Nach Ablauf von 30 min. wurde der entstandene Urin (U30) durch Punktion der Blase entnommen, in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Nach Entnahme einer weiteren Blutprobe (P30) aus der Schwanzvene wurde die ebenfalls 30-minütige Behandlungsphase (Beh) durch Infusion einer BNP-Lösung (1 ng / min. / g KGW in NaCl 0,9%) eingeleitet. Am Ende dieser Periode wurden erneut Urin (U60) und Blut (P60) entnommen und das Versuchstier durch zervikale Dislokation getötet. Nach der Ermittlung des Urinvolumens wurde der Urin im Verhältnis 1:1000 mit 0,5 M HEPES-Puffer verdünnt und die Fluoreszenz (RFU, engl. „relative fluorescence units“) wie unter 4.4.1 beschrieben bestimmt. Das Blut wurde 7 min. bei 12000 rpm zentrifugiert und die verdünnte Plasmaprobe ebenfalls vermessen. Die Ermittlung der glomerulären Filtrationsrate aus der FITC-Sinistrin-Clearance erfolgte anhand folgender Berechnungen:

$$GFR_{Ktrl} = \frac{RFU_{Plasma}(MWP_{0, P_{30}}) \times V_{Urin}(U_{30}) / \Delta t}{RFU_{Urin}(U_{30})}$$

$$GFR_{Beh} = \frac{RFU_{Plasma}(MWP_{30, P_{60}}) \times V_{Urin}(U_{60}) / \Delta t}{RFU_{Urin}(U_{60})}$$

4.5 Blutdruckmessung

4.5.1 „Tail cuff“- Methode

Die Messung des systolischen Blutdrucks erfolgte nichtinvasiv mit der „Tail cuff“-Methode. Hierfür wurden die Mäuse in einer Kammer fixiert, die zuvor ca. 15 min. auf eine Temperatur von 37°C angewärmt wurde. Die Blutdruckmanschette wurde direkt an der Schwanzwurzel fixiert und der Schwanz auf einem Infrarot-Leuchtdioden-Pulssensor abgelegt, mit dem der Lichtdurchtritt durch den Schwanz gemessen wurde. Durch Druckschwankungen ändert sich der Durchmesser der Blutgefäße und damit auch die Lichtdurchlässigkeit. Dies wurde nach einer 10-minütigen Aufwärmphase durch einen Optosensor registriert und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Durch die vorherige Kalibrierung des Gerätes mit einem Barometer konnte daraus der Blutdruck in mmHg ermittelt werden. Die Herzfrequenz wurde aus dem gemittelten Pulssignal berechnet. Zur Eingewöhnung wurden die Versuchstiere zuvor über den Zeitraum einer Woche täglich in die Blutdruckkammern gesetzt und die Manschette ohne Aufzeichnung der Messung

aufgepumpt und abgelassen. Danach wurde der systolische Blutdruck an zehn aufeinander folgenden Tagen durch die tägliche Mittelwertbestimmung aus acht Messpunkten ermittelt.

4.5.2 Katheterisierung der Arteria carotis

Während der BNP-Infusion wurde der mittlere arterielle Blutdruck (MAD) der narkotisierten Tiere in der rechten Arteria carotis ermittelt. Hierfür wurde die Arterie analog der Jugularvene (Abschnitt 4.3.2) freipräpariert und kranial mit einem 7.0-Seidenfaden abgebunden. Zur Unterbrechung des Blutflusses wurde eine zweite, temporäre Ligatur distal der ersten gelegt. Nach Inzision mit einer Augenschere wurde ein mit einer 0,5%igen Heparin-Lösung (25000 I.E. / 5 ml, in 0,9% NaCl) befüllter Polyethylen-Katheter luftblasenfrei in die Arterie eingeführt und mit Hilfe der Seidenfäden fixiert. Nach Lösung der temporären Ligatur wurde der mittlere arterielle Blutdruck durch einen mit dem Katheter verbundenen Druckmessfühler gemessen und in elektrische Signale umgewandelt. Mit Hilfe eines Brückenverstärkers und eines PowerLabs (Datenerfassungs-Hardware der Firma ADInstruments) konnten diese aufgezeichnet werden. Auch hier erfolgte eine Umrechnung von mV in mmHg durch die vorherige Kalibrierung des Geräts mit einem Quecksilber-Barometer.

4.6 Blutanalysen

Für die Analyse der Blut- bzw. Plasmaproben wurde wachen Versuchstieren Vollblut aus der Vena facialis oder der Vena caudalis lateralis entnommen. Größere Mengen an Vollblut wurden durch die Punktion der myokardialen Ventrikel narkotisierter Mäuse erhalten.

4.6.1 Blut- und Plasmavolumenbestimmung

Das Blut- sowie Plasmavolumen der Versuchstiere wurde über das Verteilungsvolumen von „Evans Blue“ bestimmt. Der Farbstoff bindet im Blut an Albumin und absorbiert Licht mit Wellenlängen von 620 nm. Nach einer kurzen Isofluran-Inhalationsnarkose (ca. 20-30 sec.) wurden den Versuchstieren 30 µl einer 0,5%igen Lösung des Farbstoffs (5 mg / ml in NaCl 0,9%) retrobulbär mit Hilfe einer Insulinspritze injiziert. Vor der Injektion wurde den Versuchstieren eine Blutprobe aus der lateralen Schwanzvene entnommen. Diese wurde im Verhältnis 1:1 mit der Farbstofflösung vermischt, um daraus eine Verdünnungs-

bzw. Standardreihe zu generieren. 10 bzw. 30 Minuten nach der Injektion wurde den Versuchstieren erneut eine Blutprobe entnommen, bei 12000 rpm 7 Minuten zentrifugiert und das erhaltene Plasma 1:5 mit 0,5 M HEPES Puffer (pH = 7,4) verdünnt. Die relativen Absorptionswerte der Plasmaproben wurden mit dem Nanodrop ND-1100 Photospektrometer gemessen. Über das injizierte Volumen und die Extrapolation der Standardgeraden konnte die Konzentration der Evans Blue Lösung im Plasma bestimmt werden. Das Plasmavolumen wurde hieraus anhand der linearen Regression ermittelt. Über den Hämatokrit, der nach Zentrifugation der Kapillaren ermittelt wurde, konnte das Blutvolumen berechnet werden.

4.6.2 Bestimmung der Plasma-Renin-Konzentration

Für die Bestimmung der Plasma-Renin-Konzentration wurde den Versuchstieren Vollblut aus der Vena facialis entnommen, in heparinisierten Kapillaren aufgefangen und in einer Kapillarzentrifuge sechs Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Blutplasma wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Ermittlung des Renin-Gehaltes erfolgte über die Aktivitätsmessung anhand der Umsetzung von Angiotensinogen zu Angiotensin I. Als Angiotensinogen-Quelle diente das Plasma bilateral uninephrektomierter Ratten (im Folgenden „Reninsubstrat“), mit dem die Plasmaproben inkubiert wurden. Die Menge an entstandenem Angiotensin I war proportional zum Renin-Gehalt der untersuchten Probe. Zur Quantifizierung wurde ein Radioimmunoassay (RIA) der Firma DiaSorin Diagnostics verwendet. Hierfür wurden 5 µl der Probe im Verhältnis 1:10 mit Maleatpuffer verdünnt und mit einem Mix aus vier Teilen unverdünntem Reninsubstrat und fünf Teilen des im Kit enthaltenen Generierungspuffer versetzt. Nach Zugabe von 2 µl des Proteaseinhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) wurde die Mischung halbiert und eine Hälfte bei 37°C 90 min. inkubiert (Warmwert-Bestimmung), während die andere Hälfte über den gleichen Zeitraum bei 4°C gelagert wurde (Kaltwert-Bestimmung). Anschließend wurden jeweils 50 µl der Mischung in die im Kit enthaltenen RIA-Röhrchen überführt und mit 500 µl des ebenfalls im Kit enthaltenen Tracers versetzt. Die Innenseite der Röhrchen ist mit anti-Angiotensin I-Antikörpern beschichtet, um deren Bindungsstellen das entstandene Angiotensin I mit dem radioaktiven Tracer konkurriert. Die Angiotensin-I-Konzentration ist also invers proportional zur gemessenen Radioaktivität. Zusammen mit den fünf Standardproben des Kits erfolgte im Anschluss eine 3- bis 24-stündige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Absaugen der Lösung wurde die Radioaktivität der Röhrchen gemessen und anhand einer Standardkurve die Angiotensin I-Konzentration in den Proben bestimmt.

4.6.3 Bestimmung der Plasma-Konzentrationen von ANP und BNP

Zur Bestimmung der Konzentration der natriuretischen Peptide ANP und BNP wurde den narkotisierten Versuchstieren Vollblut durch Punktion der Myokard-Ventrikel entnommen und mit 2 mg / ml EDTA und Aprotinin (30 TIU, 100 µl / ml Blut, Phoenix Pharmaceuticals) versetzt. Nach kurzem und leichtem Schwenken des Reaktionsgefäßes wurde die Blutprobe bei 1600 g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Blutplasma abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Peptidextraktion aus dem Plasma erfolgte säulenchromatographisch über C18-Sep-Columns (Phoenix Pharmaceuticals). Hierfür wurde das Plasma zunächst im Verhältnis 1:1 mit Puffer A (Phoenix Pharmaceuticals) angesäuert, bei 10000 g und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert und auf die zuvor mit Puffer B (Phoenix Pharmaceuticals) äquilibrierten Säulen gegeben. Nach einem Waschvorgang mit Puffer A wurden die an der Säulenmembran haftenden Peptide mit 3 ml Puffer B in ein Polystyrol-Röhrchen eluiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und in einer Lyophylle bei <0,1 mbar und -20°C über Nacht getrocknet. Die Bestimmung der ANP- und BNP-Konzentration erfolgte mithilfe eines Enzym-Immuno-Assay-Kits (EIA, Phoenix Pharmaceuticals) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Dazu wurde das Lyophilisat in 150 µl des im Kit enthaltenen Assay-Puffers gelöst und für die Bestimmung beider Peptide aufgeteilt.

Bei dem EIA handelt es sich um einen Two-Step-Assay, bei dem der sekundäre Antikörper an die feste Phase gebunden ist und nach Zugabe der Proben mit dem primären Antikörper beladen wird. Dieser wird von den in der Probe enthaltenen Peptiden gebunden, an die noch freien Bindungsstellen bindet das ebenfalls zugegebene biotinylierte Tracer-Peptid. Dieses interagiert mit der Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (SA-HRP), welche die Substratbildung katalysiert. Die Intensität der UV-Absorption des entstandenen Chromophors ist direkt proportional zur Menge des biotinylierten Peptids und invers proportional zum Zielpeptid. Die ANP bzw. BNP-Konzentration in der Probe wurde anhand einer Standardkurve aus bekannten Konzentrationen bestimmt.

4.6.4 Bestimmung der Plasma-Albumin-Konzentration

Die Bestimmung der Plasma-Albumin-Konzentration erfolgte mit dem „Mouse Albumin ELISA“-Kit der Firma ICL. Es handelt sich hierbei um einen sogenannten Sandwich-ELISA (engl. „Enzyme-linked immunosorbent assay“), bei dem der primäre Antikörper an der festen Phase der 96-Well-Platte fixiert ist, an den das in den Proben enthaltene Albumin bindet. Nach einem Waschschrift, in dem ungebundene Proteine entfernt werden, wird der sekundäre Antikörper zugegeben, der ebenfalls an Albumin bindet und einen Sandwich-

Komplex formt. Die an diesen Antikörper gebundene HRP katalysiert auch hier die Umsetzung des chromogenen Substrats. Die Intensität der UV-Absorption des entstandenen Chromophors ist direkt proportional zur Albuminkonzentration der Probe.

Die Durchführung der Plasma-Albumin-Bestimmung erfolgte nach den Angaben des Herstellerprotokolls. Hierfür wurde 1 µl Plasma im Verhältnis 1:500000 mit der im Kit enthaltenen Verdünnungslösung gemischt.

4.6.5 Bestimmung der Plasma-Kreatinin-Konzentration

Die Plasma-Kreatinin-Konzentration wurde mit dem QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit (BioAssaySystems) ermittelt. Der Assay beruht auf der „Jaffe-Reaktion“, bei der Kreatinin mit der im Kit enthaltenen Pikrinsäure einen Meisenheimer-Komplex bildet, der eine orange-rote-Färbung aufweist. Diese kann durch Messung der Absorption bei 490-530 nm zur quantitativen Bestimmung des Kreatinins herangezogen werden, da die Intensität der Farbe direkt proportional zur Kreatinin-Konzentration in der Probe ist. Die Bestimmung wurde mit 30 µl unverdünntem Plasma nach den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt und die Absorption bei 492 nm gemessen.

4.7 Urinalysen

4.7.1 Spontanurinsammlung

Zum Auffangen des Spontanurins wurden die Versuchstiere zweimal täglich in saubere Boxen ohne Einstreu gesetzt und die spontane Urinabsetzung abgewartet.

4.7.2 Stoffwechselkäfige

Zur Bestimmung des Urinvolumens wurden die Versuchstiere einzeln in metabolischen Käfigen untergebracht, die das separate Auffangen von Urin und Kot ermöglichten. Wasser und Futter standen den Mäusen ad libitum zur Verfügung. Nach einer Eingewöhnungsphase von drei Tagen wurde der Urin in einem 24-Stunden-Rhythmus gesammelt und bis zur weiteren Nutzung bei -20°C aufbewahrt.

4.7.3 Bestimmung der Natrium-Ausscheidung

Die Konzentration der Natrium-Ionen im Spontan- und Sammel-Urin der Versuchstiere wurde mit einem Flammenphotometer bestimmt. Die Flammenphotometrie ist eine

emissionsspektroskopische Methode zur quantitativen Analyse von Ionen der Alkali- und Erdalkali-Gruppe. Beim Erhitzen gehen die Ionen zunächst in den gasförmigen und dann in den atomaren Zustand über, fallen aber nach kurzer Zeit in den Grundzustand zurück und senden dabei Licht einer spezifischen Wellenlänge aus. Die Intensität des emittierten Lichts ist hierbei direkt proportional zur Stoffmenge des Ions. Natrium-Ionen emittieren nach dem Erhitzen Licht der Wellenlänge von 589 nm, was durch eine intensiv gelb-orange gefärbte Flamme sichtbar wird. Für die Messung wurden die Urinproben mit entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:5000 verdünnt. Das Photometer wurde zuvor mit einer 0,05-molaren Natriumchlorid-Lösung geeicht. Aus den aus zwei Messungen erhaltenen Stoffmengenkonzentrationen wurde der Mittelwert gebildet und mit dem in zwölf Stunden ausgeschiedenen Urinvolumen multipliziert.

4.7.4 Bestimmung der Albumin-Ausscheidung

Die Bestimmung des im Urin enthaltenen Albumins erfolgte einerseits gelelektrophoretisch mit anschließender Coomassie-Färbung aus Sammelurin. Zum anderen wurde die Albumin-Exkretion analog der Plasma-Albumin-Analyse (siehe 4.6.4) anhand des EIA-Kits der Firma ICL ermittelt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Albumin-Bestimmung im Urin wurden 2 µl Urin im Verhältnis 1:500 (Basalwerte und sham) bzw. im Verhältnis 1:50000 (DOCA) eingesetzt.

4.7.4.1 Coomassie-Färbung

Zur gelelektrophoretischen Analyse des Albumins wurden 2 µl Urin zusammen mit einer BSA-Standard-Reihe auf ein 15%iges SDS-PAGE (engl. „Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis“)-Gel aufgetragen und nach Anlegen einer Spannung von 100 V für 2 Stunden aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30 min. in einer Fixierlösung leicht geschüttelt und anschließend in die Coomassie-Färbelösung überführt. Hierbei lagert sich der Triphenylmethanfarbstoff an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und führt so zu einer Färbung des Proteins. Nach vierstündigem langsamen Schwenkens wurde das Gel erneut kurz in 50 ml Fixierlösung getränkt und nachfolgend in die Entfärbungslösung gegeben. In dieser wurde es bis zur vollständigen Entfärbung des Gel-Hintergrunds langsam geschüttelt und nachfolgend mit Hilfe des Fusion FX7 Imagers (Vilber Lourmat, Eberhardzell) fotografiert.

4.7.5 Bestimmung der Kreatinin-Ausscheidung

Die Bestimmung der Kreatinin-Exkretion erfolgte wie die Analyse im Plasma (siehe 4.6.5) mit dem QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit (BioAssaySystems) nach der Anweisung des Herstellers für Urinproben.

4.8 Isolierung der Glomeruli und der Podozyten

4.8.1 „Magnetic Beads“ – Methode

Die Isolierung der Glomeruli anhand dieser Methode erfolgte in Zusammenarbeit mit Regine Janker. Das Verfahren basiert auf der von Takemoto et al.²³⁴ beschriebenen Methode und wurde nach Boerries et al.²³⁵ und Burghardt et al.²³⁶ modifiziert.

Zunächst wurden die Nieren der Versuchstiere mit einer Suspension, bestehend aus magnetischen Mikrokügelchen (2 x 10⁶ Dynabeads® / ml, Ø 4,5 µm, Invitrogen) in 10 ml 40°C warmem PBS, wie unter 4.10.1 beschrieben perfundiert. Die Magnetkügelchen werden in den Glomeruli nicht filtrierte und akkumulieren in den Kapillaren. Nach der fünfminütigen Perfusion wurden die Nieren entnommen und mit einem Skalpell in ca. 1 mm³ große Stücke geschnitten. Anschließend erfolgte der 30-minütige Verdau des Gewebes in Kollagenase A-Lösung (1 mg / ml in HBSS) bei einer Temperatur von 37°C unter leichtem Schütteln. Die entstandene Suspension wurde bei 4°C mit einem flachen Stößel durch ein Zellsieb (Porengröße 100 µm²) in ein 50 ml Reaktionsgefäß gedrückt, welches nachfolgend mit 6 ml PBS gespült wurde. Nach Überführen der Mischung in ein 12 ml-Reaktionsgefäß konnten die Glomeruli durch Anbringen eines Magneten an der Wand des Röhrchens fixiert werden. Die restliche Flüssigkeit wurde entfernt und die Glomeruli in mehreren Waschkübeln und nochmaligem Anlegen des Magneten von den übrig gebliebenen Tubulusfragmenten befreit. Bis zur weiteren Verwendung wurden die isolierten Glomeruli bei -80°C aufbewahrt.

4.8.2 Mikrodissektion

Für die Western Blot-Analyse von TRPC6 und Podocin wurden die Glomeruli manuell mit Hilfe eines Stereomikroskops isoliert. Hierzu wurde ein Drittel einer Niere mit einem Skalpell abgetrennt und in ca. 1 mm³ große Stücke zerschnitten. Das Nierengewebe wurde in einem 12 ml Reaktionsgefäß in 2 ml einer 1%igen BSA-Lösung suspendiert und durch ein Zellsieb (Porengröße 150 µm) von zu großen Gewebeteilen befreit. Die erhaltene Suspension wurde in einer Petrischale nochmals mit der 1%igen BSA-Lösung im Verhältnis 1:2 gemischt. Die Glomeruli wurden bei einer Temperatur von 4°C unter

einem Stereomikroskop bei 16facher Vergrößerung mit einer Mikroskopiernadel von den Tubulusfragmenten separiert und mit einer Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Jeweils 100 Glomeruli wurden in einem Reaktionsgefäß gesammelt, bei 4°C und 5000 g 5 min. zentrifugiert und zweimal mit je einem Milliliter PBS gewaschen (Abnahme des Überstandes, Zugabe von 1 ml PBS, 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 10000 rpm). Die aufgereinigten Glomeruli wurden bis zur weiteren Verwendung zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C aufbewahrt.

4.8.3 Isolierung der Podozyten durch FACS

Die Isolierung der Podozyten erfolgte anhand der Durchflusszytometrie (engl. „Fluorescence activated cell sorting“, FACS) und wurde mit der Unterstützung von Jacqueline Igl und Petra Hoffmann (AG Prof. Dr. med. Matthias Edinger & PD Dr. rer. nat. Petra Hoffmann; Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III) am Klinikum der Universität Regensburg durchgeführt. Zuvor wurden die isolierten Glomeruli erneut mit der Kollagenase A-Lösung (1 mg / ml in HBSS) für den Zeitraum von 40 min. bei 37°C und 1400 rpm inkubiert. Während der Inkubation wurde die Suspension wie in Tabelle 4-4 angegeben behandelt.

Inkubationszeit [min.]	5	10	15	20	25	30	35	40
Scherung durch 27G-Kanüle			x			x		
Auf- und Abpipettieren in Glaspipette	x	x		x	x		x	
Einmaliges Vortexen zu Auflockerung der Zellen		x		x		x		x
Fünfmaliges Auf- und Abpipettieren						x		x

Tabelle 4-4: Scherprotokoll zum Erhalten einer Einzelzellsuspension aus frisch isolierten Glomeruli.

Nach der fluoreszenzmikroskopischen Kontrolle des Verdau-Ergebnisses wurden noch vorhandene Magnetic Beads durch erneutes Anlegen des Magneten entfernt. Die Zellsuspensionen von zwei Nieren wurden gepoolt und durch ein Sieb (Porengröße 40 µm) mit 10 ml HBSS filtriert. Das Filtrat wurde bei 1500 rpm und 4°C 5 min. zentrifugiert, der Überstand entfernt und das erhaltene Pellet mit 500 µl HBSS, welches mit 0,1% BSA und DAPI (1 µg / ml) versetzt wurde, resuspendiert. Diese Mischung wurde im FACS-Gerät analysiert.

Die Trennung der Zellen erfolgte mit dem FACS Aria IIu der Firma BD Biosciences. Hierbei wurden die fluoreszierenden Zellen einzeln in einer Kapillare an gebündelten Laserstrahlen definierter Wellenlänge vorbeigeleitet und anhand des erzeugten Fluoreszenzlichtes durch einen Photodetektor identifiziert. Hierbei ist die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Anzahl der Zellen. Durch das Hinzufügen von DAPI konnte eine Unterscheidung in intakte und tote Zellen vorgenommen werden.

Die isolierten grün fluoreszierenden Podozyten sowie die rot fluoreszierenden restlichen glomerulären Zellen wurden anschließend direkt in einem 200 µl Trizol enthaltendem Reaktionsgefäß aufgefangen und für die RNA-Analyse weiterverarbeitet.

4.9 RNA-Isolierung und -Analyse

Die Isolierung der mRNA aus Zellen und die nachfolgende quantitative Echt-Zeit-PCR wurden mit der Unterstützung von Katharina Ehm durchgeführt.

4.9.1 Isolierung der Messenger-RNA aus Zellen

Die Extrahierung der Messenger-RNA (mRNA) aus den isolierten Glomeruli und Podozyten erfolgte mit dem TRIsure-Reagenz der Firma Bioline. Hierbei handelt es sich um ein homogenes Gemisch, das nach der Zugabe von Chloroform in drei Phasen aufgetrennt wird: eine grüne Phenolphase, eine weiße Proteinphase und eine farblose wässrige Phase, in der die RNA enthalten ist. Zur Trennung der Phasen wurden die Proben mit 200 µl TRIsure-Reagenz und 40 µl Chloroform vermischt und 20 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 100%igem Isopropanol wurde die RNA nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) gefällt. Nach Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C wurde der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen und bei 7500 rpm und 4°C erneut für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand nahezu restlos abgesaugt und das RNA-Pellet bei RT vollständig getrocknet. Zur weiteren Verarbeitung wurde das Pellet in 250 µl RNase-freiem DEPC-Wasser resolubilisiert und 5 min. bei 65°C und 300-400 rpm geschüttelt. Die nachfolgende Quantifizierung der RNA erfolgte über die optische Dichte mit dem Nanodrop-ND-1000-Spektrophotometer.

4.9.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription bezeichnet die Umkehrung der Transkription, also das Übersetzen von RNA in eine komplementäre DNA (cDNA, engl. „complementary DNA“), die für die nachfolgende quantitative PCR benötigt wird. Hierfür wurde eine definierte Menge isolierte RNA mit Oligo-dT(Desoxythymidin)-Primern versetzt, die komplementär zum Poly-A-Schwanz eukaryotischer mRNA sind, und fünf Minuten bei 65°C in einem Blockcycler erwärmt. Anschließend wurde der in Tabelle 4-5 angegebene Mastermix zugegeben, der unter anderem die zur Umsetzung benötigte Reverse Transkriptase enthält.

Bestandteil	Volumen [µl]
DEPC-H ₂ O	3
RT-Puffer	4
dNTPs	4
Reverse Transkriptase	1

Tabelle 4-5: Mastermix-Zusammensetzung für die reverse Transkription. **DEPC-H₂O:** RNase-freies Diethylcarbonat-Wasser. **RT-Puffer:** 5 x Reverse-Transkriptase-Puffer, pH 8,3. **dNTPs:** Desoxyribo-Nukleotid-Triphosphate, Basenbausteine der DNA. **Reverse Transkriptase:** RNA-abhängige DNA-Polymerase, die die Umsetzung von mRNA in cDNA katalysiert.

Die cDNA-Synthese erfolgte binnen einer Stunde bei 37°C. Anschließend wurde die Mischung zwei Minuten auf 94°C erwärmt, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Alle Proben wurden mit 20 µl DEPC-Wasser versetzt und bis zur weiteren Nutzung bei -20°C gelagert.

4.9.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Zur Quantifizierung der Menge bestimmter Gene in der DNA-Probe und damit der mRNA-Expression wurde die quantitative Echtzeit-PCR (im Folgenden „qPCR“) angewendet. Mit Hilfe dieses Verfahrens ist es möglich, DNA zu vervielfältigen und die genaue Menge der amplifizierten DNA in Echtzeit (engl. „real time“) zu bestimmen.

Die qPCR wurde mit dem SYBRGreen-Kit und dem Lightcycler „LC480“ der Firma Roche durchgeführt. SYBRGreen ist ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der sich nach jedem Amplifizierungsschritt an die neu gebildete doppelsträngige DNA anlagert. Anhand der Fluoreszenz-Intensität lässt sich so die in der PCR entstandene DNA quantifizieren. Ein Mikroliter der synthetisierten DNA wurde mit neun Mikrolitern des in Tabelle 4-6 aufgeführten Mastermix versetzt und nach dem Amplifizierungsprotokoll in Tabelle 4-7 vervielfältigt.

Bestandteil	Volumen [µl]
DEPC-H ₂ O	3
Primer (rev)	0,5
Primer (for)	0,5
SYBRGreen	5

Tabelle 4-6: Mastermix-Zusammensetzung für die qPCR. **DEPC-H₂O:** RNase-freies Diethylidcarbonat-Wasser. **Primer:** Oligonukleotide mit bestimmter Erkennungssequenz für zu detektierendes Gen. **SYBRGreen:** DNA-interkalierender Fluoreszenz-Farbstoff zum quantitativen Nachweis des Gens über die Fluoreszenz-Intensität.

Temperatur [°C]	Dauer [mm:ss]	Zyklen	Phase
95	05:00	1	Aktivierung
95	00:10	40	Denaturierung
60	00:20	40	Annealing
72	00:20	40	Elongation
95	01:00	1	Schmelzen
60	01:00	1	Schmelzen
40	00:10	1	Abkühlen

Tabelle 4-7: Amplifizierungs- und Schmelz-Protokoll der qPCR. **Aktivierung:** Aufheizphase zur Aktivierung der DNA-Polymerase. **Denaturierung:** Auftrennung der DNA-Doppelhelix. **Annealing:** Primer-Hybridisierung, also Anlagerung der Primer an den DNA-Strang. **Elongation:** Arbeitsphase der DNA-Polymerase. **Schmelzen:** Schmelzen der DNA zur Qualitätsprüfung.

Die Fluoreszenz wurde nach jedem Zyklus detektiert. Zur Überprüfung der Reinheit der Reaktionsprodukte wurde die DNA am Ende der Amplifikation geschmolzen und eine Schmelzkurve erstellt. Die Quantifizierung der mRNA Expression erfolgte anhand einer Standardkurve mit der zugehörigen LightCycler Software, die Ergebnisse wurden auf das Housekeeper-Gen 18s rRNA normalisiert.

4.10 Histologische Untersuchung der Nieren

Zur Untersuchung eventueller Nierenschädigungen wurden die Nieren der Versuchstiere mit der Unterstützung von Robert Götz perfusionsfixiert, eingebettet, geschnitten und gefärbt. Die Anfertigung und Färbung der Nierenschnitte erfolgte mit der Unterstützung von Regine Janker und Anna Federlein.

4.10.1 Perfusionsfixierung mit Paraformaldehyd

Vor der histochemischen Untersuchung wurden die Nieren mit einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung perfundiert. Paraformaldehyd ist ein kurzkettiges Formaldehyd-Polymer, das die Autolyse und Fäulnis von Gewebeproben verhindert und eine reversible Vernetzung von Proteinen herbeiführt. Dies dient der Konservierung und Strukturhaltung der Gewebe. Zudem wird durch die Erhärtung das nachfolgende Schneiden der Nieren erleichtert.

Die Perfusion erfolgte nach intraperitonealer Anästhesie der Versuchstiere mit Xylazin (12 mg / kg KGW) und Ketamin (80 mg / kg KGW) durch Kanülierung der Aorta abdominalis proximal der rechten Nierenarterie. Die Bauchhöhle wurde hierfür durch eine Inzision an der Linea alba geöffnet und die Mesenterialarterie und die Aorta oberhalb der linken Arteria renalis ligiert. Vor der Inzision der Aorta abdominalis wurde diese mit einer Gefäßklemme abgeklemmt, um den Blutfluss kurzzeitig zu unterbrechen. Nach Einbringen und Fixation der Perfusionskanüle (Ø 0,8 mm) wurde die Klemme gelöst und der Abfluss des Blutes durch Öffnung der Vena cava ermöglicht. Anschließend wurden die Nieren mit auf 37°C erhitztem PBS gespült, bevor die Perfusion mit der PFA-Lösung bei einem konstanten Druck von 100 mmHg gestartet wurde. Nach fünfminütiger Perfusion wurden die Nieren entnommen und je nach Weiterverarbeitung im jeweiligen Medium aufbewahrt.

4.10.2 Anfertigung und Einbettung der Nierenschnitte

Von den Nieren der Mäuse, die das mTmG-Transgen enthielten, wurden zur Untersuchung des podozytären GC-A Knockouts Gefrierschnitte angefertigt, alle anderen Nieren wurden in Paraffin eingebettet.

4.10.2.1 Anfertigung der Gefrierschnitte

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die Nieren in eine Mischung aus 4%igem PFA und 18%iger Saccharose so lang eingelegt, bis die Organe vollständig durchtränkt waren und im Reaktionsgefäß absanken. Danach wurden sie kurz in auf -40°C abgekühltes Methylbutanol getaucht, bis auf der Oberfläche der Gewebe eine weiße Schicht entstand. Nach kurzem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Organe an einem Gefriermikrotom mit Hilfe von TissueTek auf einem Organstempel befestigt, in Form gebracht und nachfolgend 5 µm dicke Querschnitte angefertigt. Diese wurden auf einem Objektträger fünf Minuten getrocknet und dann bei -20°C aufbewahrt.

4.10.2.2 Anfertigung und Einbettung von Paraffin-Schnitten

Für die Paraffin-Einbettung wurden die Nieren nach der Fixierung in 70%igem Methanol (MeOH) eingelegt und nachfolgend alle 30 Minuten in einen Alkohol höherer Konzentration bis hin zu 100%igem Isopropanol überführt, um das Gewebe zu dehydrieren. Danach erfolgte das Einlegen der Nieren in ein 65°C warmes Gemisch aus Isopropanol und dünnflüssigem Paraffin (Verhältnis 1:1) für wiederum 30 Minuten. Anschließend wurden die Gewebe 2 x 24 Stunden in 60°C warmes, reines Paraffin eingelegt. Nach dem Eingießen der Nierengewebe mit dem noch heißen Paraffin in Silikonformen konnte dieses innerhalb weniger Stunden erkalten und aushärten. Aus dem entstandenen Paraffin-Block wurden an einem Kryotom 5 µm dicke Querschnitte der Nieren angefertigt und auf Objektträgern über Nacht getrocknet. Vor den anschließenden Färbungen erfolgte eine Entparaffinierung der Schnitte in Xylol und Isopropanol.

4.10.3 Histochemische Analysen

4.10.3.1 HE- Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung²³⁷ ist eine weit verbreitete Methode, die zur Übersichtsfärbung von Geweben dient. Hierbei färbt die basische Form des Hämatoxylins, das Hämalaun, alle Strukturen blau, die sauer bzw. basophil sind (z.B. die DNA in den Zellkernen). Das saure synthetische Eosin färbt hingegen alle basischen bzw. acidophilen Strukturen, z.B. Proteine und Kollagen, rot an.

Für die Färbung wurden die Nierenschnitte nach dem Entparaffinieren anhand einer absteigenden Ethanolreihe (Ethanol 99%, 80%, 70%, jeweils 5 min. pro Schritt) rehydriert und anschließend fünf Minuten lang in PBS eingelegt. Daraufhin erfolgte eine dreiminütige Inkubation der Schnitte mit dem „Mayer`s Hämalaun“-Reagenz mit nachfolgendem Eintauchen in 1%ige Essigsäure und Spülen unter Leitungswasser. Im Anschluss wurden die Schnitte für zwei Minuten in eine alkoholische Eosin-Lösung eingelegt und danach für fünf bis zehn Minuten in einer wässrigen Lösung des Reagenz' inkubiert. Nach dem Entwässern in einer aufsteigenden Ethanolreihe und Xylol wurden die Schnitte mit DEPEX-Mounting-Medium (Serva Elektrophoresis) eingedeckelt.

4.10.3.2 PAS-Färbung

Das Anfärben der Nierenschnitte mit dem „Periodic-acid-Schiff`s“ (PAS)-Reagenz²³⁸ dient dem Nachweis kohlenhydrathaltiger Komponenten, die z.B. in Bindegewebsfasern wie Kollagen vorkommen. Hierbei werden die freien Hydroxylgruppen der Saccharide durch die enthaltene Periodsäure zu Aldehyden oxidiert, die dann mit der im Schiff`s-Reagenz enthaltenen Fuchsin-schwefeligen Säure magentarote Komplexe bilden.

Nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren wurden die Schnitte fünf Minuten lang mit 0,5%iger Periodsäure gefärbt und nachfolgend ein bis zwei Minuten mit destilliertem Wasser gespült, bevor sie weitere zehn Minuten im Schiff's-Reagenz inkubiert wurden. Zur Kontrastierung erfolgte im Anschluss eine Bläuung der Zellkerne mit Hämalaun (siehe Abschnitt 4.10.3.1). Nach erneutem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte zum Entwässern mit einer aufsteigenden Ethanolreihe und Xylol behandelt und danach mit Corbit-Balsam eingedeckelt.

4.10.3.3 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung²³⁹ ist eine Multifärbe-Methode, die in der vorliegenden Arbeit zur Darstellung von Bindegewebe und zur Untersuchung von fibrotischem Gewebe diente. Neben einer Grundfärbung mit Eisenhämatoxylin nach Weigert (WEH) sind weitere simultane oder nachfolgende Färbungen mit verschiedenen Farbstoffen möglich. Dabei werden die Zellkerne braun-schwarz, Keratin und Muskelfasern rot und Bindegewebe und Knochen blaugrün angefärbt.

Die in dieser Arbeit angewandte Färbemethode zur Darstellung des Bindegewebes umfasste neben der WEH-Färbung eine Säurefuchsin-Ponceau-Färbung in 1%iger Essigsäure sowie eine Behandlung mit Lichtgrün und Orange G, in die die Nierenschnitte jeweils für wenige Minuten eingelegt wurden. 0,5%ige Phosphorwolframsäure und salzsaure Alkohol dienten zur Differenzierung.

4.10.3.4 TUNEL-Färbung

Die Färbung der Nierenschnitte mit der TUNEL (engl. „TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling“)-Methode²⁴⁰ dient dem Nachweis apoptotischer Zellen in einem Gewebe. An der Reaktion ist die „Terminal desoxynucleotidyl Transferase“ (TdT) beteiligt, ein Enzym, das in der Lage ist, Nucleotide an das 3'-Ende der DNA zu fügen, ohne dabei eine Neusynthese des DNA-Strangs hervorzurufen. Während der Apoptose werden die DNA-Stränge des Zellkerns durch eine erhöhte Aktivität von Endonukleasen fragmentiert. Die an den Bruchenden freiwerdenden Hydroxylgruppen werden von der TdT mit fluoreszenzmarkierten Desoxyuridintriphosphat (dUTP)-Nucleotiden versehen, so dass die apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar werden.

Für die Färbung wurden die entparaffinierten und rehydrierten Nierenschnitte zunächst mit einer Proteinase-K-Lösung (20 µg / ml in 10 mM Tris / HCl-Lösung; pH 7,4; 15 min.) und 0,3%igem Wasserstoffperoxid (10 min.) bei Raumtemperatur vorbehandelt. Nach fünfminütigem Waschen in PBS erfolgte die Permeabilisierung mit frisch hergestelltem 0,1%igem Triton-X 100 in 0,1%igem Natriumcitrat für 2 min. bei 4°C. Daraufhin wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen und anschließend mit dem zuvor hergestellten

TUNEL-Reaktionsgemisch aus dem „TUNEL-Assay-Kit“ (Roche) für eine Stunde in einer abgedunkelten feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe und Xylol entwässert und anschließend mit DEPEX-Mounting-Medium eingedeckelt.

4.10.3.5 Immunfluoreszenzfärbung

Mit der Immunfluoreszenzfärbung konnte die Expression spezifischer Proteine im Nierengewebe analysiert werden. Das Prinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei ein Primär-Antikörper das Protein-spezifische Antigen bindet und nachfolgend durch einen fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper markiert wird. Dieser kann nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Zur Antigen-Demaskierung wurden die entparaffinierten und rehydrierten Nierenschnitte zunächst 45 min. in einer 95°C heißen TRIS / EDTA-Lösung gekocht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte anschließend eine zehnminütige Inkubation der Schnitte in 10%igem Pferdeserum und 1%igem BSA in PBS, um unspezifische Bindungen während der nachfolgenden Antigen-Antikörperreaktion zu verhindern. Nach der Blockierung wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper in der erforderlichen Verdünnung (siehe Anhang; Verdünnung mit 1% BSA in PBS) beschickt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde der sekundäre Antikörper (siehe Anhang; Verdünnung mit 1% BSA in PBS) nach dreimaligem Waschen mit PBS auf die Objektträger gebracht und die Schnitte 1,5 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Anschluss erfolgte eine nochmalige Blockierung mit 2%igem Phenylhydrazin (10 min. bei 37°C) und 0,002%iger Wasserstoffperoxid-Lösung in PBS (20 min. bei 37°C). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Nierenschnitte mit DAKO-Mounting Medium eingedeckelt. Die für die Färbungen verwendeten primären und sekundären Antikörper sind im Anhang aufgelistet. Die Analyse der Fluoreszenz-Intensität erfolgte mit ImageJ (Version 1.4.3, National Institute of Health, USA). Nach Ermittlung der Größe der untersuchten Fläche (z.B. der Glomeruli) mit dem Programm der Zeiss-Software „ZEN blue 2012“ konnte die Fluoreszenzdichte als Produkt der Fläche und der Intensität berechnet werden.

4.10.4 Licht- / Fluoreszenzmikroskopie

Die Aufnahme der Nierenschnitte erfolgte mit einem inversen Durchlicht- / Fluoreszenzmikroskop (Observer Z1, Zeiss) mit motorisierter Objektaufgabe, einer Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) sowie der Software AxioVision Rel.4.9 von Zeiss. Die Farbstoffe der verwendeten sekundären Antikörper (siehe Anhang) wurden unter

Zuhilfenahme geeigneter Fluoreszenzfilter angeregt und das entstandene Emissionslicht im jeweiligen Spektralbereich aufgenommen (Cy2: Anregung bei 450-490 nm, Emission bei 500-550 nm; TRITC: Anregung bei 533-558 nm, Emission bei 570-640 nm; Cy5: Anregung bei 625-655 nm, Emission bei 665-715 nm).

4.10.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die TEM-Aufnahmen wurden von Helga Othmen (AG Prof. Ralf Witzgall, Institut für Anatomie, Universität Regensburg) durchgeführt.

Nach Perfusion der Nieren (siehe Abschnitt 4.10.1) wurde das Gewebe für die Transmissionselektronenmikroskopie mit einer 3%igen Lösung aus Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,4) über einen Zeitraum von 72 h nachfixiert. Nach Osmierung (zur Anfärbung von Nervengewebe, Fetten und des Golgiapparats) wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und in Epon eingebettet. An einem Ultramikrotom (UC6, Leica) wurden 50 nm dicke Schnitte des Nierengewebes hergestellt, die nachfolgend mit einer Uranylacetat- und einer Bleicitratlösung kontrastiert wurden. Die Aufnahmen der Nierenschnitte erfolgten mit dem Transmissionselektronenmikroskop „Zeiss 905“. Die Vergrößerungen sind in den jeweiligen Abbildungen angegeben.

4.10.6 Western Blot-Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Schlitzmembranproteine TRPC6 und Podocin anhand einer Western Blot-Analyse untersucht, wobei der Podocin-Western Blot mit Hilfe von Dr. Andrea Fuchsl durchgeführt wurde.

Isolierte Proteine werden anhand ihrer Größe mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mittels Antikörpern identifiziert und quantifiziert. Für die Analyse wurden 50 (Podocin) bzw. 200 (TRPC6) Glomeruli eingesetzt, aus denen die Proteine isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und anschließend anhand geeigneter Antikörper detektiert wurden. Die Zusammensetzung der Pufferlösungen und die verwendeten Antikörper sind in Anhang I (8.1) aufgelistet.

4.10.6.1 Proteinextraktion

Zur Isolierung der Proteine wurden die durch Mikrodissektion gesammelten Glomeruli in 15 µl RIPA-Puffer aufgenommen und fünfmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurden 15 µl Lämmli-Probenpuffer zugegeben und die Mischung zur Spaltung der Disulfidbrücken und Denaturierung der Proteine fünf Minuten auf 95°C erhitzt.

4.10.6.2 Gelelektrophorese

Die Proben wurden zusammen mit dem HighMark-PreStained-Protein-Standard (LifeTechnologies) zur Bestimmung des Molekulargewichts auf ein 10%iges SDS (engl. „Sodium dodecyl sulphate“, Natriumlaurylsulfat)-Polyacrylamid-Fertiggel (Mini-PROTEAN® TGX Precast Protein Gels, Biorad) aufgetragen, dass in einer mit Laufpuffer befüllten Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN®, BioRad) befestigt wurde. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 20 min bei 60V, gefolgt von ca. 1,5 Stunden bei 100V.

4.10.6.3 Transfer

Die auf dem Gel befindlichen Proteine wurden unter Verwendung des Wetblot-Verfahrens auf Nitrocellulose-Membran transferiert. Hierfür wurden die zum Blotten benötigten Materialien (Schwämme, Whatman-Papiere, Membran und Gel) zunächst zehn Minuten in Transferpuffer geschwenkt. Zum Aufbau des Blotting-Sandwichs wurden ein Schwamm, zwei Whatmann-Papiere, SDS-Gel, Nitrocellulosemembran, zwei Whatmann-Papiere und ein Schwamm luftblasenfrei in der Halterung zusammengebaut und in der Wetblot-Apparatur (Trans Blot®, Elektrophorese Transferkammer, BioRad) befestigt. Diese wurde vollständig mit Transferpuffer gefüllt. Unter Anlegen einer Spannung von 65 Volt wurden die Proteine binnen 150 min. vom Gel auf die Nitrocellulosemembran übertragen.

4.10.6.4 Detektion

Nach dem Blotten erfolgte die Detektion der beiden Proteine anhand spezifischer Antikörper (siehe 8.1.6). Hierfür wurde die mit destilliertem Wasser gespülte Membran zunächst mit einer dreiprozentigen Magermilchsuspension (in PBS-T, siehe Anhang) 20 Minuten lang bei RT blockiert. Die nachfolgende Bindung des in der Blockierlösung verdünnten primären Antikörpers erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal in destilliertem Wasser gewaschen, der an HRP-konjugierte sekundäre Antikörper (in Blockierlösung verdünnt) aufgegeben und in einer feuchten Kammer für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschvorgängen in destilliertem Wasser wurde die Membran fünf Minuten in PBST geschwenkt und anschließend in PBS 15 Minuten bei RT und 30 Minuten im Kühlschrank

aufbewahrt. Danach erfolgten vier weitere Waschvorgänge in destilliertem Wasser. Zur Detektion der Proteine wurde die Membran einige Minuten mit 2 ml einer ECL (engl. „enhanced chemiluminescence“)-Detektionslösung („Pierce ECL Western Blotting Substrat“, ThermoFisher Scientific) inkubiert. Die durch HRP katalysierte chemilumineszente Reaktion kann mithilfe des Fusion FX7 Imagers (Vilber Lourmat, Eberhardzell) sichtbar gemacht werden. Anhand des mitgeführten Standards konnte Podocin auf einer Höhe von 42 kDa und TRPC6 bei 106 kDa detektiert werden.

Die quantitative Analyse der Proteine erfolgte über die Messung der optischen Dichte der entstandenen Banden mittels ImageJ.

4.11 Bestimmung des podozytären Ca^{2+} -Influx

Dieser Versuch wurde mit der Unterstützung von Dr. Daniela Valletta durchgeführt.

Für die Messung wurden frisch isolierte Glomeruli von DOCA-behandelten Podo GC-A KO und WT Mäusen verwendet, die die Transgene der mTmG-Reportermaus in ihrem Genom tragen, da in diesen die Podozyten durch ihre grüne Fluoreszenz identifiziert werden konnten. Glomeruli unbehandelter Tiere beider Genotypen dienten als Kontrolle. Die Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration fand anhand der Fluoreszenzbestimmung des Calcium-Indikators Fura-2 statt²⁴¹. Fura-2 ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der mit Calcium Chelatkomplexe bildet. Die Calcium-Konzentration ist also proportional zur Fluoreszenzintensität des Farbstoffs. Für die Messung wurde der membrangängige Acetoxymethylester des Farbstoffs (Fura-2-AM) verwendet, der durch passive Diffusion in die Zellen gelangt und dort von Esterasen zum reaktiven Fura-2 abgebaut wird, wodurch der Austritt aus der Zelle verhindert wird.

Den Versuchstieren wurde über einen Zeitraum von neun bis zwölf Tagen zweimal täglich eine intraperitoneale DOCA-Injektion verabreicht. Nach Beendigung der Behandlung wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Nieren entnommen. Im Anschluss an das Zerschneiden der Nieren erfolgten mehrere Siebvorgänge nach dem Protokoll von Ilatovskaja et al.²⁴². Anschließend wurden die Glomeruli manuell per Mikrodissektion isoliert und auf ein Deckgläschen gegeben, auf dem sie anhafteten. Danach erfolgte eine 45-minütige Inkubation der Glomeruli mit 200 μl einer 10 μM -Lösung von Fura-2-AM in Ringerlösung. Die Deckgläschen wurden in einer Perfusionskammer eines inversen Mikroskops (Axio Observer, Zeiss) angebracht und der zu untersuchende Glomerulus wurde mit einer Haltepipette fixiert. Nach einer Waschphase von ca. 15 min.

wurde die Region, in der die Calcium-Bestimmung stattfinden sollte, in den grün fluoreszierenden Podozyten als ROI (engl. „Region of interest“) markiert. Zur Stimulation des Calcium-Influx wurde Adenosintriphosphat (ATP) in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$ verwendet. Weiterhin wurden einige Glomeruli mit dem TRPC-Blocker SKF 96365 (10 μM in 0,9% NaCl) und dem rekombinanten, murinen atrialen natriuretischen Peptid (ANP, 200 μM in 0,9% NaCl) behandelt, wobei die Perfusion hier ca. 5 min. vor dem Start der ATP-Applikation stattfand. Die Fluoreszenz-Messung erfolgte sowohl bei einer Wellenlänge von 340 nm (Anregung von Calcium-gesättigten Fura-2) als auch bei 380 nm (Anregung von freiem Fura-2). Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden anhand des Quotienten der Fluoreszenzintensitäten bei beiden Wellenlängen (340 nm / 380 nm) berechnet. Die Analyse erfolgte mit dem Visifluor Ratio Imaging System und der zugehörigen Software Visiview 2.1.4.

4.12 Statistische Analyse

Alle erhobenen Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung und die Erstellung der Graphen erfolgten mit Microsoft Excel 2010 und GraphPad Prism 5. Der Vergleich zweier Parameter erfolgte durch den Student's t-test nach Prüfung auf Normalverteilung. Die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen bzw. zwischen verschiedenen Zeitpunkten wurden anhand der einfaktoriellen oder zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließender Bonferroni-post-hoc-Korrektur, wenn nötig, berechnet. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

5 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Fragen bezüglich des Einflusses der natriuretischen Peptide auf die Nierenfunktion bearbeitet:

1. Werden die glomeruläre Filtrationsrate und die renale Salz- und Wasserausscheidung, die wichtige Parameter der Nierenfunktion darstellen, maßgeblich durch die Aktivierung der GC-A im Podozyten reguliert?

2. Hat die Aktivierung der GC-A durch die kardialen natriuretischen Peptide eine protektive Wirkung auf die Podozyten und kann damit einer Schädigung des Glomerulus vorgebeugt werden?

Hierfür wurden Mäuse mit einer podozytenspezifischen Deletion der Guanylatzyklase A generiert, charakterisiert und bezüglich physiologischen und pathophysiologischen Veränderungen untersucht.

Anmerkungen:

I. Teile dieser Doktorarbeit wurden im „Journal of the American Association of Nephrology“ veröffentlicht. Die Erlaubnis des Journals zur Verwendung der Daten wurde eingeholt und vom Journal bewilligt. Beteiligte Personen, die Versuche angeleitet oder maßgeblich durchgeführt haben, sind im Methodenteil namentlich erwähnt.

II. Die in den Auswertungen aufgeführten Zahlenwerte sind als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SF) angeben.

5.1 Generierung und Charakterisierung der podozyten-spezifischen GC-A Knockout-Maus

5.1.1 Generierung der *NPHS2*-Cre x *GC-A*^{flox/flox} (Podo GC-A KO) Maus

Für die Generierung der podozytenspezifischen GC-A Knockout-Maus wurde das Cre / LoxP-System angewendet. Die von Prof. Michaela Kuhn zur Verfügung gestellten Mäuse, in denen das Exon 1 des GC-A-Gens mit LoxP-Stellen markiert, also „gefloxt“ vorliegt (*GC-A*^{flox/flox})¹⁴⁶, wurden hierfür mit Mäusen verpaart, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *NPHS2*-Promotors (codiert für Podocin) exprimieren²⁴³. Der *NPHS2*-Promotor ist nur in Podozyten aktiv, wodurch eine selektive Expression der Cre-Rekombinase in diesen Zellen erreicht wird²⁴³. Damit wurde die Expression des natriuretischen Peptid-Rezeptors in den Podozyten dieser Mäuse unterdrückt. Die homozygoten Nachkommen (*NPHS2*-Cre x *GC-A*^{flox/flox}) der heterozygoten Zuchtpaare (*NPHS2*-Cre x *GC-A*^{flox/WT}) werden im Folgenden als „Podo GC-A KO“ bezeichnet. Der Knockout wurde zunächst anhand der genomischen DNA mit Hilfe der Polymerase-Chain-Reaktion (PCR) verifiziert. Als Kontrolltiere für die Experimente dienten diejenigen Wurfgeschwister, die zwar auch die Cre-Rekombinase exprimierten, jedoch keine „geflochten“ Allele der GC-A aufwiesen (*NPHS2*-Cre x *GC-A*^{+/+}). Obwohl es sich bei diesen Tieren im strengen Sinne nicht um Wildtyp-Mäuse handelt, werden sie im Folgenden als „Podo GC-A WT“ bezeichnet. Abb. 5-1 zeigt die Genotypisierung, die die Deletion der podozytären GC-A-Expression in der DNA der Podo GC-A KO Mäuse bestätigt.

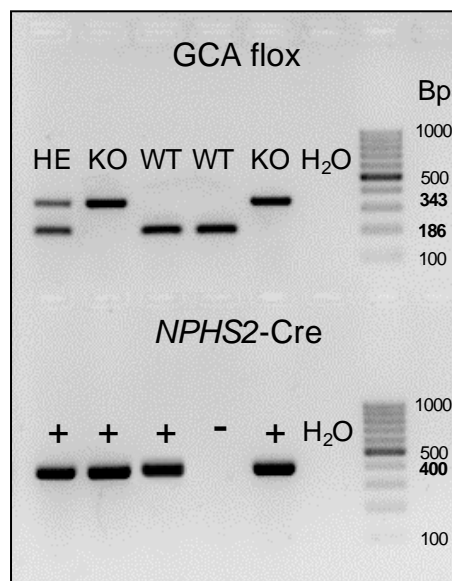


Abb. 5-1: DNA-Genotypisierung der Podo GC-A Mäuse auf einem 2%igem Argarosegel.

Um die Deletion der podozytären GC-A auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurden die Podo GC-A KO Mäuse und ihre Wildtyp-Geschwister abermals mit einer transgenen, doppelt fluoreszierenden, Cre-Reporter Maus gekreuzt, in deren Genom das Gen für ein rot fluoreszierendes Protein (mT) und, diesem nachgeschaltet, das Gen für ein grün fluoreszierendes Protein (mG) eingebracht wurde (*Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J}, mGmT²³²*). Kreuzt man diese Maus mit einer Maus, die die Cre-Rekombinase unter einem bestimmten Promoter exprimiert, wird das mit LoxP-Stellen markierte mT-Gen mit nachfolgendem Stopcodon ausgeschnitten. Dadurch kommt die Transkription des mT-Gens zum Erliegen und stattdessen wird nun das mG-Gen abgelesen, was letztlich zur Bildung des grün fluoreszierenden mG-Proteins führt. Abb. 5-2 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Nierenquerschnitten der auf diesem Weg generierten „GC-A^{flox/flox} mTmG“ Mäuse. In diesen fluoreszieren alle Zellen rot, die die Cre-Rekombinase nicht exprimieren (Abb. 5-2 A) bzw. den *NPHS2*-Promotor nicht aufweisen, also kein Podocin exprimieren (Abb. 5-2 B). In den Glomeruli der Mäuse (kleine Bilder), die die Cre-Rekombinase exprimieren (Podo GC-A^{flox/flox} mTmG und Podo GC-A^{+/+} mTmG), wird in den Podozyten, die das Podocin-Gen aufweisen, das grün fluoreszierende mG-Protein gebildet.

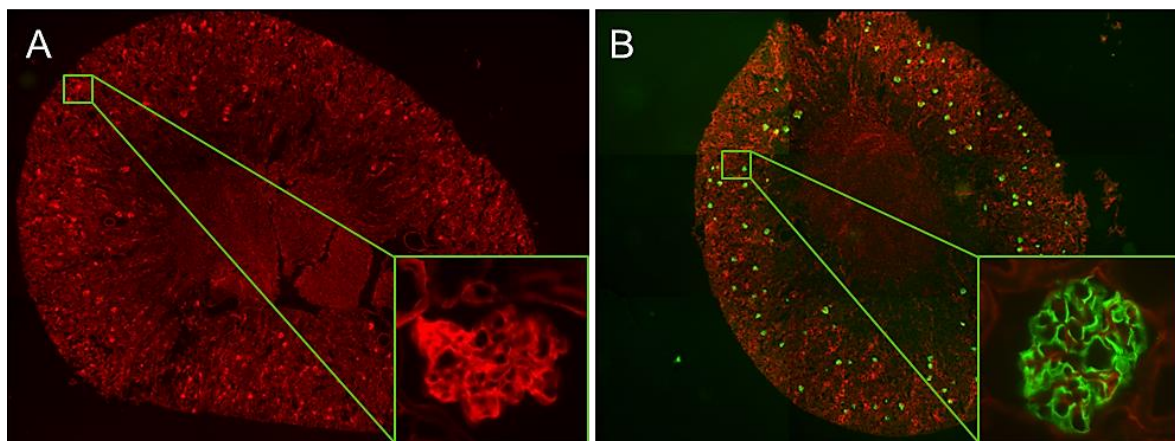


Abb. 5-2: Fluoreszenz-Aufnahmen der Nierenschnitte von mTmG Mäusen. **A.** Nierenquerschnitt einer *NPHS2*-Cre-negativen Maus. Alle Zellen exprimieren das rot fluoreszierende Protein (mT). **B.** Nierenquerschnitt einer *NPHS2*-Cre-positiven Maus. In den Podozyten wird im Gegensatz zu allen anderen Zellen das grün fluoreszierende Protein (mG) exprimiert.

Um nachzuweisen, dass es sich bei den grün fluoreszierenden Zellen wirklich nur um Podozyten handelt, wurden die Glomeruli mit einem Synaptopodin-Antikörper angefärbt (Abb. 5-3). Tatsächlich überlappen mG-Fluoreszenz und Synaptopodin-Färbung komplett. Demnach wird das mG-Protein in den Nieren der Cre-positiven Reporter-Mäuse nachweislich nur in den Podozyten exprimiert.

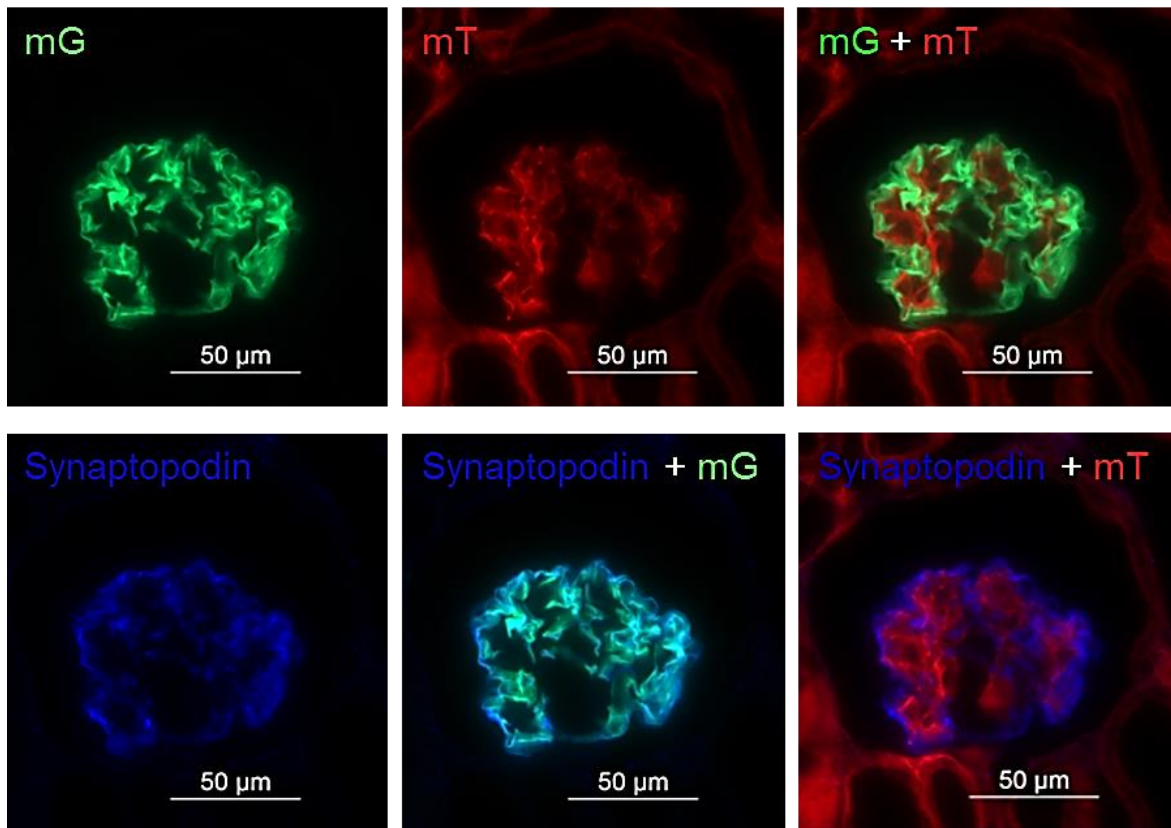


Abb. 5-3: Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen des Glomerulus einer Podo GC-A mTmG Maus und Co-Färbung mit Synaptopodin. **Oben links:** Expression des grün fluoreszierenden Proteins (mG) in den Podozyten. **Oben mittig:** Expression des ubiquitär vorkommenden rot fluoreszierenden Proteins (mT). **Oben rechts:** Expression von mG und mT im Glomerulus. **Untere Aufnahmen:** Immunhistochemische Co-Färbung des Podozyten-Marker-Proteins Synaptopodin (blau). **Unten links:** Synaptopodin-Färbung in den Podozyten eines Glomerulus. **Unten mittig:** Expression von mG und Co-Färbung mit Synaptopodin. Die Türkis-Färbung zeigt die deutliche Überlappung der grünen und blauen Färbung an. **Unten rechts:** Expression von mT und Co-Färbung des Synaptopodins. In dieser Aufnahme zeigt sich keine Überlappung. Die Aufnahmen bestätigen die exklusive Expression des grün fluoreszierenden Proteins in den Podozyten.

Mit Hilfe der mTmG-Reporter Maus war es möglich, die Podozyten zu isolieren und zu analysieren. Hierfür wurden zunächst die Glomeruli mit Hilfe der „Magnetic Beads“-Methode (4.8.1) isoliert und diese durch weitere Aufschlussvorgänge in eine Einzel-Zell-Suspension überführt. Aus dieser konnten die grün fluoreszierenden Podozyten mittels „Fluorescence activated cell sorting“ (FACS, 4.8.3) von den restlichen rot fluoreszierenden glomerulären Zellen getrennt werden. Anschließend wurden die separierten Suspensionen mit Hilfe verschiedener gewebespezifischer Marker-Proteine hinsichtlich ihrer Reinheit auf transkriptioneller Ebene untersucht. Als Podozyten-Marker wurden Podocin und Nephtrin verwendet, Megalin diente zur Identifikation von proximalen Tubulus-Zellen und CD31 für die Detektion von Endothel-Zellen. Die Ergebnisse der mRNA-Analyse sind in Abb. 5-4 dargestellt. In der Podozytenfraktion der Zellsammlung waren Podocin und Nephtrin stark exprimiert, die mRNA von Megalin und CD31 konnten hingegen nicht detektiert werden.

In den übrigen, rot fluoreszierenden glomerulären Zellen sowie im restlichen Nierengewebe wurden die Podozytenmarker kaum exprimiert. Die Podozyten wurden also mit einem hohen Reinheitsgrad aus dem Nierengewebe isoliert. Pro Niere wurden im Mittel ca. 250000 Podozyten isoliert.

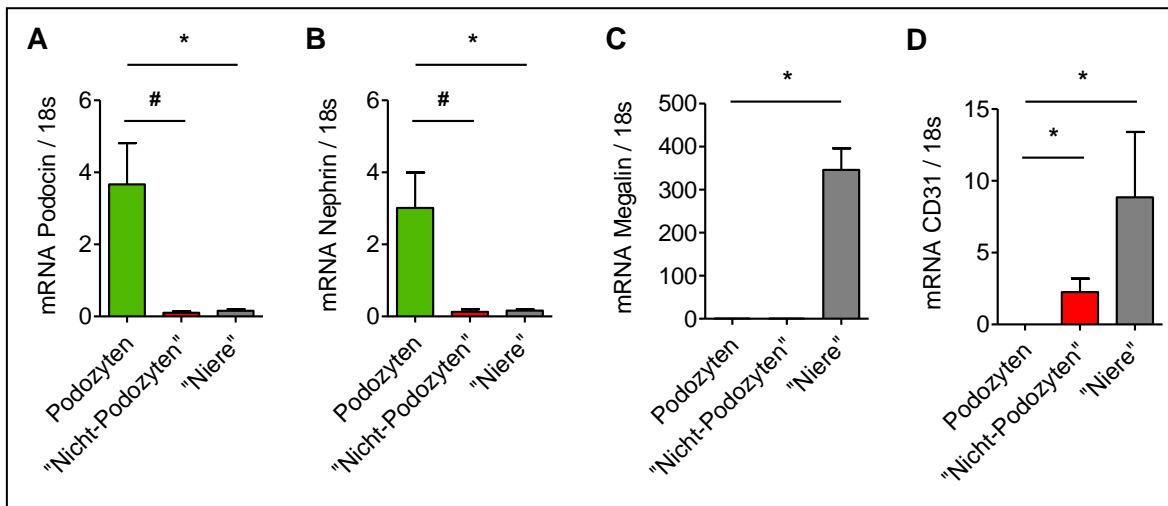


Abb. 5-4: Überprüfung der Reinheit der Zellsuspension nach FACS anhand der mRNA Expression spezifischer Marker-Gene. „Nicht-Podozyten“. Rotfluoreszierende glomeruläre Zellen nach der Separation durch das FACS. „Niere“: restliches Nierengewebe bzw. das Filtrat der Glomeruli-Isolierung. **A** und **B**. mRNA Expression der Schlitzmembranproteine Podocin und Nephrin. **C**. mRNA Expression des proximalen Tubulus-Markers Megalin. **D**. mRNA Expression des Endothelzell-Markers CD31.

5.1.2 Untersuchung der GC-A Expression

Als Nächstes wurde die mRNA Expression der GC-A in den Nieren der Podo GC-A KO Mäuse und ihrer Wildtyp-Wurfgeschwister untersucht. Interessanterweise wiesen die isolierten Podozyten der Podo GC-A WT Tiere die höchste GC-A mRNA Expression im Vergleich zu allen anderen glomerulären Zellen und auch zum restlichen Nierengewebe auf. Darüber hinaus konnte in den Podozyten der Podo GC-A Knockout-Mäuse nahezu keine mRNA Expression der GC-A detektiert werden. Die rot fluoreszierenden, nicht-podozytären Zellen wie auch die Zellen des „Überstands“ dieser Versuchstiere unterschieden sich bezüglich des Expression des GC-A Gens hingegen nicht von denen der Wildtyp-Kontrollen (Abb 5-5).

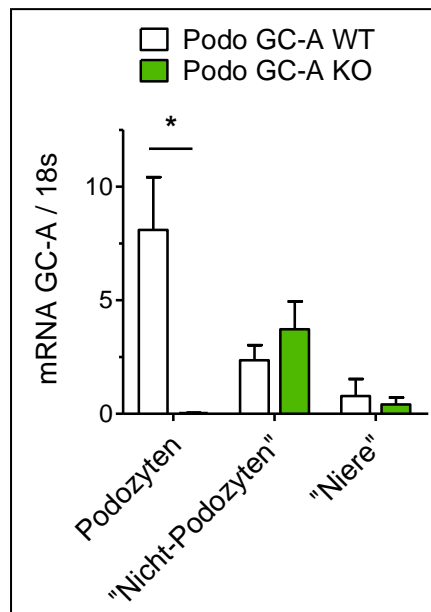


Abb. 5-5: mRNA Expression der Guanylatzyklase A nach Isolierung der Podozyten von Podo GC-A WT und KO Mäusen mittels FACS. Podozyten: grünfluoreszierende Zellen der FACS-Analyse. „Nicht-Podozyten“: rot fluoreszierende Zellen der FACS-Analyse. „Niere“: restliches Nierengewebe, Filtrat der Glomeruli-Isolierung. * $p < 0,05$ vs. WT

5.1.3 Charakterisierung der Podo GC-A KO Maus

Für die Phänotypisierung der podozytenspezifischen GC-A Knockout-Mäuse wurden sowohl weibliche als auch männliche Versuchstiere im Alter von 16 bis 24 Wochen verwendet. Die Geburtenrate wies ein ausgewogenes Verhältnis an Knockout- und Wildtyp-Geschwistertieren auf. Eine erhöhte Letalität der Neugeborenen war nicht erkennbar.

5.1.3.1 Untersuchung der Regulation anderer Proteine im Podozyten

Zunächst wurden weitere Proteine der NP / GC-A-Signalkaskade und ihrer Regulatoren in den isolierten Podozyten von Podo GC-A KO Nieren und Kontrollnieren hinsichtlich ihrer Regulation auf mRNA-Ebene untersucht. Für die cGMP-abhängigen Proteinkinasen cGK1alpha und cGK1beta, die durch den Second Messenger cGMP aktiviert werden, konnten zwischen den Podozyten der Knockout- und Wildtyp-Mäuse keine Unterschiede in der mRNA Expression festgestellt werden (Abb. 5-6).

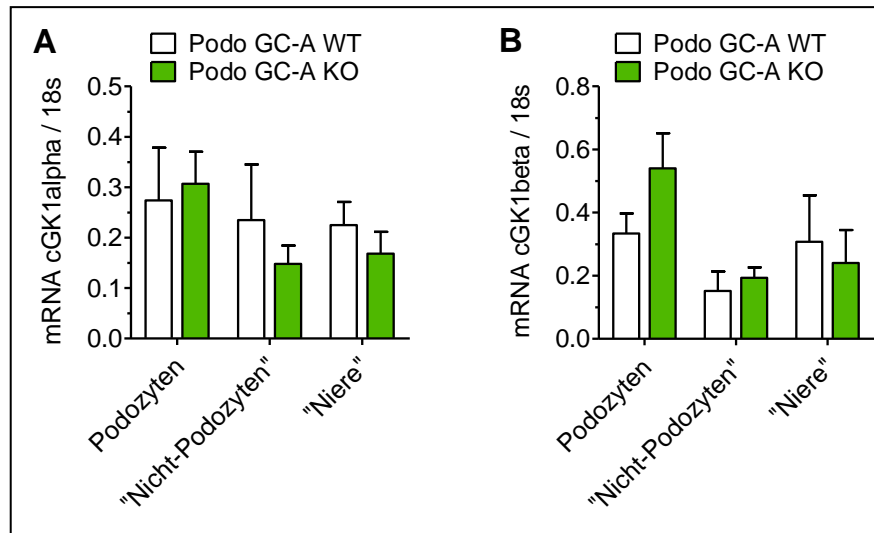


Abb. 5-6: mRNA Expression von Downstream-Proteinen der NP / GC-A-Signalkaskade, bezogen auf das Housekeeper-Protein 18s. **A.** cGKI α . **B.** cGKI β .

Auch die mRNA-Expression des NPR-C, dem Clearance-Rezeptor und dadurch wichtigem Regulator der natriuretischen Peptide, unterschied sich nicht zwischen Knockout- und Wildtyp-Podozyten. Der Angiotensin II- (AT_1) Rezeptor und der Mineralokortikoid- (MR-) Rezeptor, deren Liganden als Teil des RAAS die physiologischen „Gegenspieler“ der natriuretischen Peptide darstellen, zeigten keine veränderte Expression in den Knockout-Podozyten gegenüber den Kontrollen (Abb. 5-7).

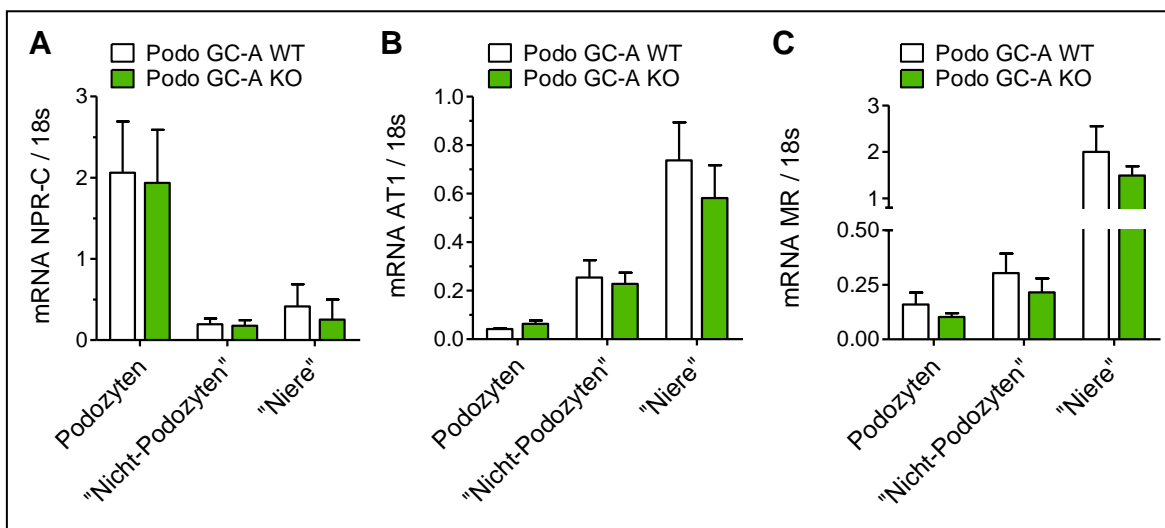


Abb. 5-7: mRNA Expression regulatorischer Rezeptoren in isolierten Podozyten von Podo GC-A KO und WT Mäusen, bezogen auf 18s. **A.** Der Clearance-Rezeptor NPR-C. **B.** Der Angiotensin II- (AT_1 -) Rezeptor. **C.** Der Mineralocorticoid- (MR-) Rezeptor.

5.1.3.2 Untersuchung physiologischer Parameter

Die podozytenspezifischen GC-A Knockout-Mäuse wurden hinsichtlich ihres Körpergewichts, der Nierenfunktion, des Blutdrucks, der Herzfrequenz und diverser Blut- und Urinparameter charakterisiert und mit den Wildtyp-Wurfgeschwistern verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 5-1 aufgelistet. Unter Kontrollbedingungen zeigten die Mäuse mit der genetischen Deletion des NPR-A-Rezeptors keine Unterschiede zu den Kontrolltieren. Auch bezüglich der Organgewichte konnten zwischen Podo GC-A KO und WT Mäusen keine Unterschiede festgestellt werden.

Physiologischer Parameter	Geschlecht	Podo GC-A WT	Podo GC-A KO
Körpergewicht [g]	male	27,8 ± 0,9 (n=8)	28,6 ± 0,7 (n=8)
	female	23,4 ± 0,6 (n=8)	23,3 ± 0,7 (n=8)
Systolischer Blutdruck [mmHg]	male	134 ± 2,1 (n=13)	140 ± 2,7 (n=13)
	female	127 ± 2,1 (n=12)	128 ± 2,0 (n=11)
Beide Nieren [mg]	male	365 ± 15 (n=8)	369 ± 8 (n=8)
	female	279 ± 13 (n=8)	284 ± 10 (n=8)
Herz [mg]	male	122 ± 8 (n=8)	129 ± 5 (n=8)
	female	100 ± 4 (n=8)	105 ± 3 (n=8)
Herzfrequenz [min ⁻¹]	male	660 ± 6,8 (n=13)	651 ± 7,0 (n=13)
	female	662 ± 9,1 (n=12)	665 ± 10,3 (n=11)
Plasma-Renin-Aktivität (PRA) [ng ANG I / ml / h]	male	45,1 ± 11,4 (n=8)	43,3 ± 6,5 (n=8)
	female	54,3 ± 4,8 (n=8)	52,9 ± 11,2 (n=8)
Hämatokrit [%]	male	49,8 ± 0,4 (n=16)	49,2 ± 0,7 (n=15)
	female	50,2 ± 0,6 (n=18)	49,5 ± 0,8 (n=15)
Plasmavolumen [% von KGW]	male	4,28 ± 0,29 (n=5)	3,9 ± 0,18 (n=5)
	female	4,09 ± 0,25 (n=5)	3,64 ± 0,17 (n=5)
GFR [μl / min / g KGW]	male	15,0 ± 0,5 (n=8)	15,5 ± 0,7 (n=8)
	female	15,1 ± 0,8 (n=8)	15,4 ± 0,7 (n=8)
Urinvolumen [ml / 12h]	male	0,74 ± 0,18 (n=7)	0,72 ± 0,11 (n=6)
	female	0,76 ± 0,11 (n=7)	0,74 ± 0,11 (n=9)
Na ⁺ -Exkretion [μmol / 12h / g bw]	male	5,4 ± 0,7 (n=6)	5,5 ± 0,9 (n=5)
	female	5,7 ± 0,6 (n=8)	5,9 ± 1,1 (n=7)
Albumin-Exkretion [μg / 12h]	male	7,2 ± 1,0 (n=6)	9,3 ± 1,9 (n=5)
	female	10,2 ± 2,1 (n=8)	12,2 ± 2,2 (n=8)
Kreatinin-Exkretion [mg / 12h]	male	20,1 ± 2,8 (n=6)	20,0 ± 2,0 (n=5)
	female	19,5 ± 2,0 (n=8)	18,1 ± 1,3 (n=8)

Tabelle 5-1: Physiologische Parameter von unbehandelten Podo GC-A WT und KO Mäusen.

5.2 Einfluss von ANP und BNP auf die Regulation der GFR durch Aktivierung der podozytären GC-A

5.2.1 Untersuchungen zur funktionellen renalen Kompensation nach Uninephrektomie

Wie bereits erwähnt sind die Nieren in der Lage, ihre Funktion gegen endo- und exogene Einflüsse über weite Bereiche konstant zu halten. Auch der Verlust funktionsfähigen Nierengewebes wird durch eine erhöhte Filtration und ein gesteigertes Wachstum der verbliebenen Nephrone ausgeglichen. Dieses Phänomen wird als kompensatorische renale Hypertrophie bezeichnet. Klinische Relevanz erlangt es zum Beispiel im Rahmen einer Nierenlebenspende, bei der die verbleibende Niere des Spenders ihre Funktion schon innerhalb kurzer Zeit auf bis zu 75% des ursprünglichen Wertes steigert²⁴⁴. Auffällig ist hierbei, dass der Hauptanteil der Anpassung schon in den ersten Tagen nach der Spende stattfindet.

Dr. Andrea Schreiber konnte in ihrer Doktorarbeit in unserer Arbeitsgruppe die kardialen natriuretischen Peptide als Signalmoleküle für die rapide funktionelle Anpassung der glomerulären Filtrationsrate nach einer unilateralen Nephrektomie (UNx) identifizieren. Sie zeigte an Mäusen mit globaler genetischer Deletion der GC-A, dass die Aktivierung des Rezeptors eine essentielle Bedeutung für den initialen Mechanismus der kompensatorischen renalen Hypertrophie hat²⁴⁵.

Wie die natriuretischen Peptide die Anpassung der GFR in dieser Situation regulieren, ist allerdings nicht bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte unter anderem ermittelt werden, ob die Aktivierung der GC-A in den Podozyten hierbei eine Rolle spielt.

Zur Klärung dieser Frage wurden die zuvor generierten Podo GC-A Knockout- und Wildtyp-Mäuse genau wie die globalen GC-A Knockout-Mäuse einer linksseitigen Uninephrektomie unterzogen. Drei bis vier Tage nach UNx wurde die glomeruläre Filtrationsrate der Versuchstiere anhand der „Single shot Clearance“-Methode mittels FITC-Sinistrin ermittelt und mit den vor der UNx bestimmten Werten verglichen. Abb. 5-8 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen im Vergleich mit den von Dr. A. Schreiber generierten Daten.

Unter Kontrollbedingungen (preUNx) zeigten die Podo GC-A KO Mäuse bezüglich der glomerulären Filtrationsrate keine Unterschiede zu den Podo GC-A WT Mäusen oder den konventionellen GC-A Knockout-Tieren. Während diese drei bis vier Tage nach der unilateralen Nephrektomie (postUNx) keinen signifikanten Anstieg der Einzelnieren-GFR aufwiesen ($7,3 \pm 0,3$ (post UNx) vs. $6,7 \pm 0,3$ (preUNx) $\mu\text{l} / \text{min} / \text{g KGW}$), kompensierten

die Mäuse mit podozytenspezifischer Deletion der GC-A den Verlust des Nierengewebes in gleichem Ausmaß wie die Wildtypen (Podo GC-A KO: $10,5 \pm 0,3$ (post UNx) vs. $7,9 \pm 0,3$ (preUNx) $\mu\text{l} / \text{min} / \text{g KGW}$; Podo GC-A WT: $10,7 \pm 0,3$ (post UNx) vs. $7,9 \pm 0,3$ (preUNx) $\mu\text{l} / \text{min} / \text{g KGW}$; $p < 0,0001$).

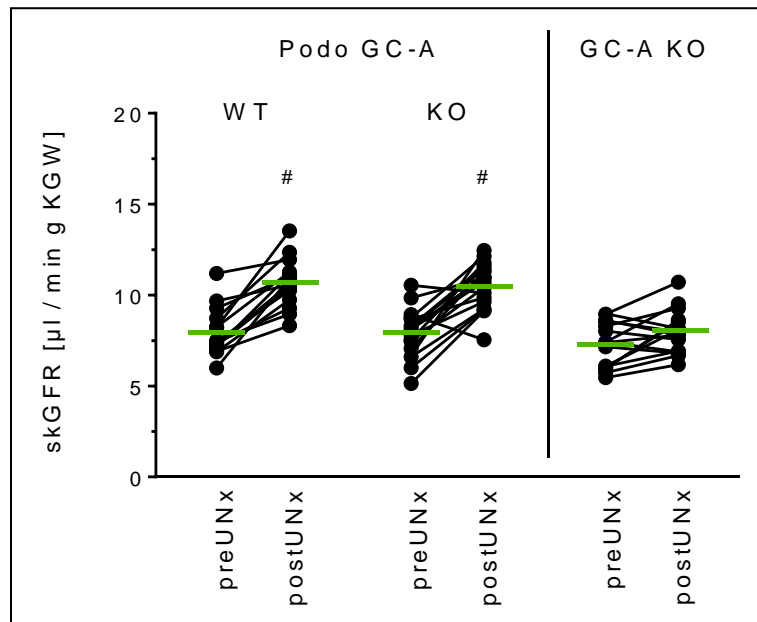


Abb. 5-8: Einzel-Nieren-GFR (skGFR, engl. „single kidney GFR“) von Podo GC-A KO (n=17) und WT (n=15) Mäusen sowie konventionellen GC-A KO Mäusen (n=20, Daten aus der Dissertation von Dr. Andrea Schreiber²⁴⁵) vor (preUNx) und drei bis vier Tage nach Uninephrektomie (postUNx). Die Basalwerte (preUNx) wurden für den direkten Vergleich halbiert. # $p < 0,001$ vs. preUNx

Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, dass die funktionelle Anpassung des verbleibenden Nierengewebes nach einer unilateralen Nephrektomie nicht durch die Aktivierung der GC-A im Podozyten reguliert wird. Die natriuretischen Peptide scheinen also ihre GFR-regulierende Wirkung im Rahmen der kompensatorischen renalen Hypertrophie nicht über eine Veränderung des Tonus der podozytären Fußfortsätze zu vermitteln.

5.2.2 BNP-Infusion in anästhesierten Podo GC-A KO und WT Mäusen

Nachdem die Aktivierung der podozytären GC-A durch die natriuretischen Peptide keinen Einfluss auf den GFR-Anstieg nach Uninephrektomie hatte, wurde in einem weiteren Versuch überprüft, ob die kardialen natriuretischen Peptide generell einen Einfluss auf renale Prozesse wie die glomeruläre Filtrationsrate, Natriurese und Diurese und den Blutdruck haben.

Im folgenden Versuch wurde anästhesierten Podo GC-A KO und WT Mäusen das B-Typ-natriuretische Peptid (1ng / min / Kg KGW) über die Jugularvene infundiert und anhand der FITC-Sinistrin-Clearance die GFR bestimmt. Der in diesem Zeitraum gebildete Urin wurde quantifiziert und zur Bestimmung der Natrium-Exkretion herangezogen. Während des Infusionszeitraums wurde der mittlere arterielle Blutdruck (MAD) der narkotisierten Tiere in der Arteria carotis gemessen. Vor der BNP-Infusion wurden die Basalwerte der Tiere in einer Kontrollperiode, in der lediglich physiologische Kochsalz-Lösung (im Folgenden „NaCl“) infundiert wurde, bestimmt. Des Weiteren wurde das B-Typ-natriuretische Peptid in gleicher Weise in konventionelle GC-A KO Mäuse appliziert und auch hier die GFR, die Natriurese, die Urinausscheidung und der MAD bestimmt. Als Kontrollgruppe wurde einigen Tieren (n=6) über den gesamten Versuchszeitraum (60 Minuten) eine physiologische Kochsalzlösung (im Folgenden „NaCl“) analog der BNP-Infusion verabreicht.

Durch die Infusion des rekombinanten murinen BNPs stieg die Plasma-Konzentration im Blut der Podo GC-A KO Mäuse auf das Vierfache der Konzentration unter Kontrollbedingungen (Infusion einer 0,9%igen Kochsalzlösung, Flussrate 0,2 µl / min über den gleichen Zeitraum) an (Abb. 5-9: 488 ± 109 (BNP) vs. 117 ± 30 (NaCl) pmol / L; $p < 0,05$).

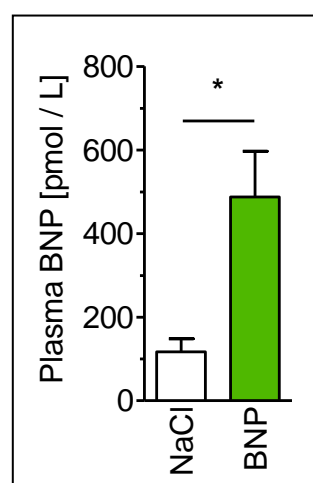


Abb. 5-9: Plasma BNP-Konzentration der Versuchstiere unter Kontrollbedingungen (NaCl) und nach 30-minütiger BNP-Infusion (BNP). * $p < 0,05$

In Abb. 5-10 und Tabelle 5-2 sind die Ergebnisse der BNP-Infusion dargestellt. Wie in Abb. 5-10 A zu sehen ist, stieg die glomeruläre Filtrationsrate als Reaktion auf die erhöhten BNP-Level sowohl in den Wildtyp-Mäusen (n=16) als auch in den Tieren, die die GC-A in den Podozyten nicht exprimierten (n=14), deutlich an.

Im Gegensatz dazu zeigte sich in den Mäusen mit globaler Deletion der GC-A (n=6) kein Anstieg der GFR durch die BNP-Infusion. Auch in den Tieren, die über den gesamten Versuchszeitraum lediglich eine NaCl-Infusion erhielten (n=6), konnte kein GFR-Anstieg verzeichnet werden. Damit wurde eine Veränderung der GFR aufgrund eines durch die Infusion möglicherweise entstandenen Volumenreizes ausgeschlossen.

Zudem wurden weder die Natriurese noch die Diurese durch die Abwesenheit der NP / GC-A / cGMP-Signalkaskade in den Podozyten verändert (Abb. 5-10 C und D sowie Tabelle 5-2). Das Urinvolumen und die Natrium-Ausscheidung stiegen unter der Infusion mit dem natriuretischen Peptid in den Podo GC-A KO und WT gleichermaßen an. Auch hier blieb die Reaktion in den konventionellen GC-A KO Mäusen aus. Wurde lediglich NaCl infundiert, stellte sich auch keine Veränderung dieser Parameter ein.

Der Blutdruck (Abb. 5-10 B) fiel während des Versuchs in den meisten Tieren geringfügig ab. Da dieses Phänomen bei Mäusen jeder der verschiedenen Gruppen auftrat, ist es unwahrscheinlich, dass die Senkung des Blutdrucks durch BNP vermittelt wurde. Es ist wahrscheinlicher, dass die Änderungen aufgrund der Dauer des invasiven Versuchs und der dementsprechend langen Narkose auftraten.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, dass BNP zwar in der Lage ist, sowohl die GFR als auch die Natriurese und Diurese über die Aktivierung der GC-A zu regulieren, jedoch spielen die Podozyten hierbei keine Rolle.

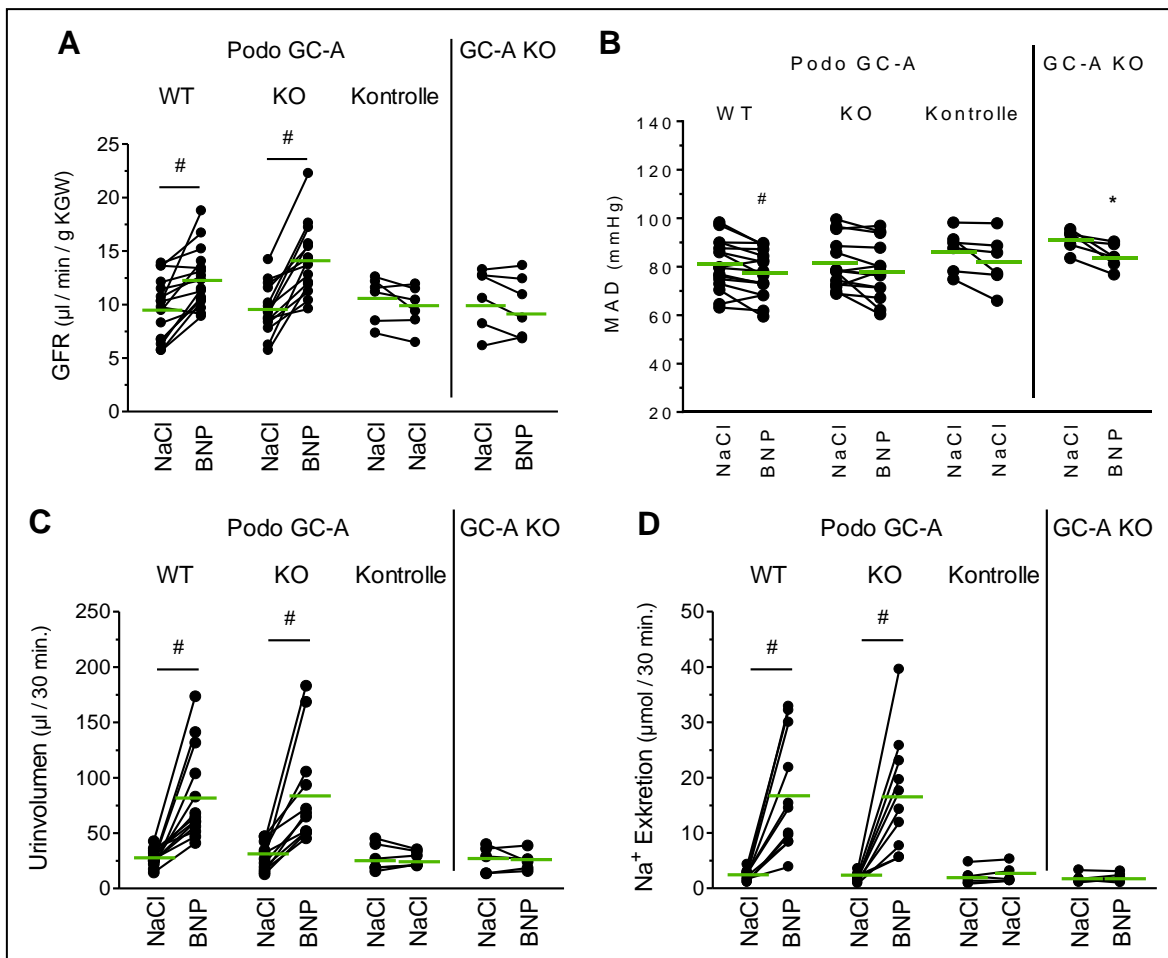


Abb. 5-10: BNP-Infusion in narkotisierten Podo GC-A KO (n=14) und WT (n=16) Mäusen sowie konventionellen GC-A KO Mäusen (n=6). Kontrolle: Infusion einer 0,9%igen Kochsalzlösung über den gesamten Versuchszeitraum (n=6). **A.** GFR vor (NaCl) und nach 30-minütiger BNP- bzw. NaCl Infusion (BNP bzw. NaCl). **B.** Mittlerer arterieller Blutdruck, gemessen in der Arteria carotis in narkotisierten Mäusen während BNP- bzw. NaCl-Infusion. **C.** Urinivolumen vor (NaCl) und infolge 30-minütiger BNP- bzw. NaCl-Infusion. **D.** Natriurese infolge 30-minütiger BNP- bzw. NaCl-Infusion. * p<0,05 vs. NaCl; # p<0,001 vs. NaCl.

Parameter	Podo GC-A KO		Podo GC-A WT		GC-A KO		Kontrolle	
	NaCl	BNP	NaCl	BNP	NaCl	BNP	NaCl	NaCl
GFR [$\mu\text{l}/\text{min}/\text{g KGW}$]	9,6 ± 0,6	14,2 ± 0,9	9,7 ± 0,7	12,4 ± 0,7	10,6 ± 1,2	9,9 ± 1,2	10,5 ± 0,8	9,7 ± 0,8
Urinivolumen [$\mu\text{l}/30 \text{ min.}$]	28,9 ± 3,8	86,8 ± 14,5	27,3 ± 2,1	83,3 ± 11,5	27,7 ± 5,0	27,1 ± 2,7	26,5 ± 5,5	24,8 ± 4,0
Na⁺-Exkretion [$\mu\text{mol}/30 \text{ min.}$]	2,0 ± 0,2	17,1 ± 3,4	2,3 ± 0,3	17,0 ± 3,2	2,0 ± 0,6	2,3 ± 0,6	1,7 ± 0,3	1,9 ± 0,6
MAD [mmHg]	81,2 ± 2,8	78,4 ± 3,1	80,8 ± 2,6	77,2 ± 2,4	91,1 ± 1,7	84,3 ± 2,1	86,7 ± 3,4	82,1 ± 4,5

Tabelle 5-2: Auflistung der Werte analog zu Abb. 5-10.

5.3 Untersuchung der nephroprotektiven Wirkung der kardialen natriuretischen Peptide durch Aktivierung der GC-A im Podozyten

5.3.1 Das „DOCA-Salz“ Modell

In diesem Versuch wurde die mögliche nephroprotektive Rolle der natriuretischen Peptide durch die Aktivierung der podozytären GC-A untersucht. Als renales Schädigungsmodell wurde das sogenannte „DOCA-Salz“-Modell verwendet. Dieses Modell umfasst die Applikation des Aldosteron-Präkursors Deoxycorticosteron bzw. dessen Essigsäuresalz (Deoxycorticosteronacetat, DOCA) in Kombination mit einer vierprozentigen Kochsalzdiät. Die Anwendung des Modells in Verbindung mit einer unilateralen Nephrektomie und einer Hochsalzdiät zur Induktion einer Nephropathie ist im Mausmodell gut etabliert. Eine mehrwöchige Exposition führt zu Bluthochdruck und Glomerulopathien, die unter anderem durch interstitielle Fibrose und mesangiale Expansion geprägt sind und mit einer Schädigung der Podozyten einhergehen²⁴⁶⁻²⁴⁹. Im Rahmen dieses Experiments wurde männlichen Podo GC-A KO und WT Mäusen 2 Wochen nach der Entfernung der linken Niere ein DOCA-Pellet (50 mg DOCA, 21-Tage-Freisetzung, s.c.) eingesetzt und das Futter auf die Hochsalzdiät (4% NaCl) umgestellt. Die Behandlung (im Folgenden als „DOCA“ bezeichnet) erfolgte über einen Zeitraum von sechs Wochen, in dem die Versuchstiere freien Zugang zu Futter und Wasser hatten. Zum Schein behandelte Tiere beider Genotypen (sham; ohne UNx und ohne DOCA-Applikation, Standarddiät) fungierten als Kontrollen.

5.3.1.1 Untersuchung kardiovaskulärer Veränderungen

Zunächst wurde der systolische Blutdruck der Versuchstiere mit der Tail-Cuff-Methode gemessen. Schon innerhalb der ersten drei Wochen nach Einsetzen des DOCA-Pellets entwickelten die Podo GC-A KO Mäuse eine moderate Hypertonie, die im weiteren Verlauf der Behandlung konstant blieb (Abb. 5-11 A: 148 ± 6 (4-5 w DOCA) vs. 138 ± 5 (basal) mmHg; $p < 0,05$) und von einer Reduktion der Herzfrequenz begleitet war (Abb. 5-11 B: 673 ± 10 (4-5 w DOCA) vs. 697 ± 8 (basal) Schläge pro Minute; $p < 0,05$). Die DOCA-behandelten Wildtyp-Mäuse zeigten vergleichbare Veränderungen des systolischen Blutdrucks (Abb. 5-11 A: 146 ± 4 (4-5 w DOCA) vs. 135 ± 2 (basal) mmHg; $p < 0,05$) und der Herzfrequenz (673 ± 13 (4-5 w DOCA) vs. 710 ± 14 (basal) Schläge pro Minute; $p < 0,05$).

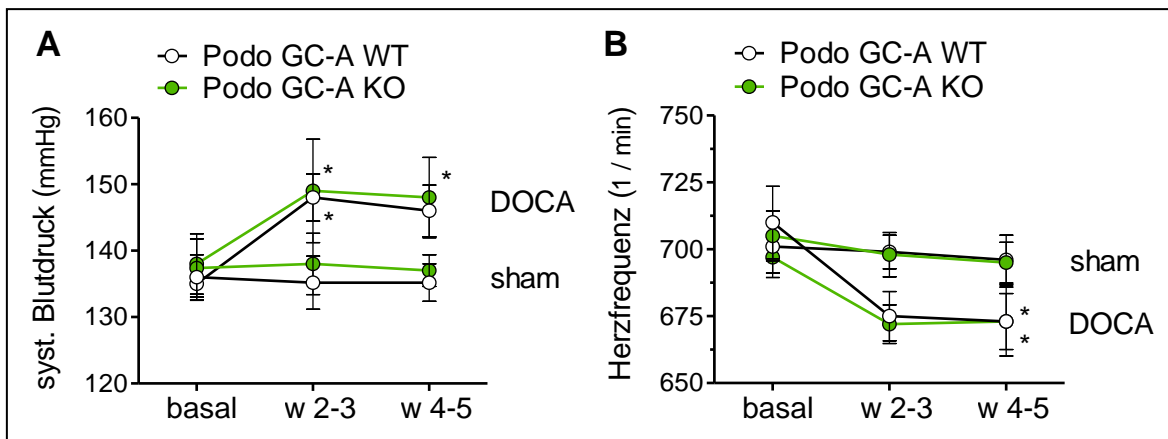


Abb. 5-11: Veränderungen des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz in Podo GC-A KO (n=5) und WT (n=6) Mäusen im Verlauf sechswöchiger DOCA-Behandlung. **A.** Systolischer Blutdruck. **B.** Herzfrequenz. * $p < 0,05$ vs. sham

Durch die konstante Zufuhr von DOCA wurden sowohl die Plasma-Renin-Konzentration (Abb. 5-12 A: KO (grün): $1,3 \pm 0,3$ (DOCA) vs. $43,3 \pm 6,5$ (sham) ng ANG I / ml / h; WT (weiß): $1,4 \pm 0,3$ (DOCA) vs. $45,1 \pm 11,4$ (sham) ng ANG I / ml / h; $p < 0,001$) als auch die Renin-mRNA-Expression in der Niere (Abb. 5-12 B) in beiden Genotypen deutlich gesenkt. Damit kann man annehmen, dass die DOCA-Behandlung eine kardiovaskuläre Reaktion der Versuchstiere auslöste, die sich in Podo GC-A Knockout- wie Wildtyp-Mäusen etwa gleichermaßen ausprägte.

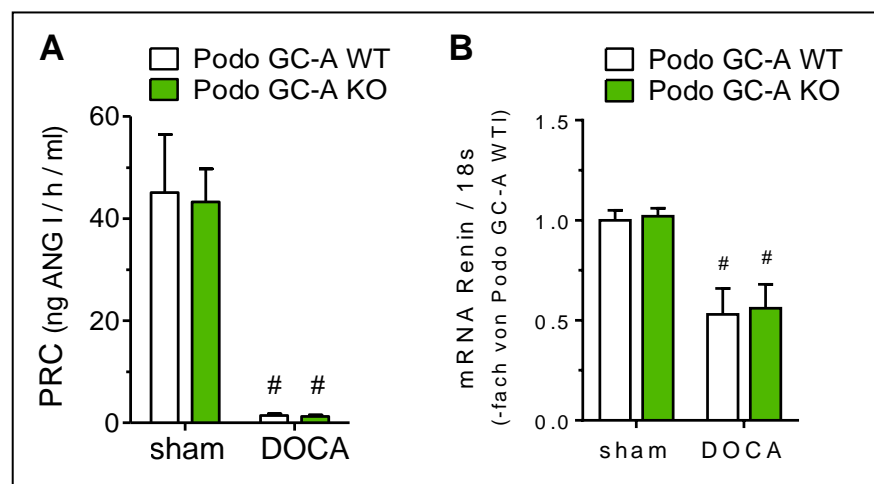


Abb. 5-12: Regulierung des RAAS-Enzyms Renin in DOCA-behandelten Podo GC-A KO (n=7) und WT (n=6) Mäusen. **A.** Plasma-Renin-Konzentration (PRC), angegeben in ng des entstandenen Angiotensin I (ANG I) pro ml in der Stunde. **B.** mRNA-Expression des Renin-Gens in den isolierten Glomeruli, bezogen auf das Housekeeper-Gen 18s, angegeben als Vielfaches der Werte der unbehandelten (sham) Tiere; # $p < 0,001$ vs. sham

5.3.1.2 Untersuchung der Nierengewichte

Bei der Untersuchung der Nierengewichte zeigte sich, dass die DOCA-behandelten Mäuse beider Genotypen eine starke Hypertrophie der verbliebenen rechten Nieren aufwiesen (Abb. 5-13 A). Diese kompensatorische Reaktion ist sowohl auf den Verlust des Nierengewebes durch die Uninephrektomie als auch auf die DOCA-Applikation zurückzuführen^{245,250}. Hierbei geht die kompensatorische renale Hypertrophie vor allem auf ein Wachstum der Glomeruli und der proximalen Tubuli zurück^{245,251}. Eine Analyse der Glomeruli in den Nierenschnitten der perfusionsfixierten Nieren ergab eine signifikante Vergrößerung der glomerulären Fläche sowohl bei den DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen als auch bei ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern (Abb. 5-13 B: KO (grün): 6653 ± 232 (DOCA) vs. 4171 ± 156 (sham) μm^2 ; WT (weiß): 6425 ± 185 (DOCA) vs. 4570 ± 171 (sham) μm^2 ; $p < 0,001$).

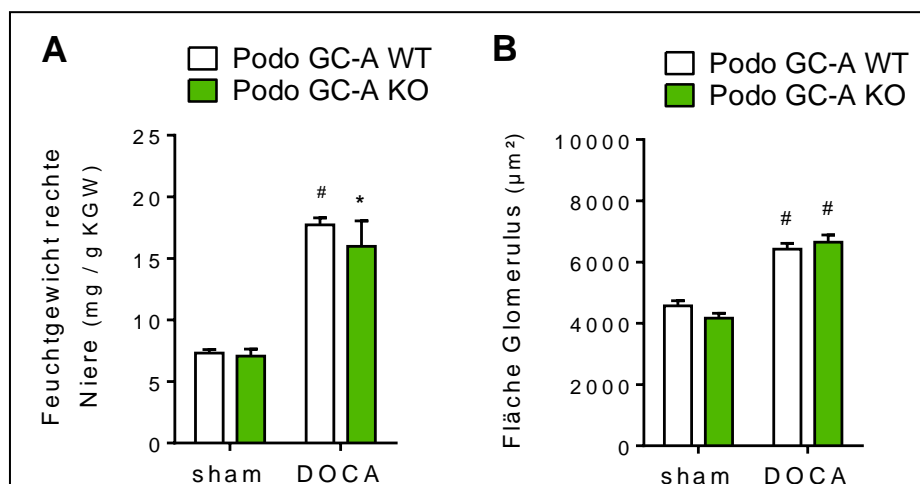


Abb. 5-13: Hypertrophie der Nieren von Podo GC-A KO (n=7) und WT (n=6) Mäusen nach sechswöchiger DOCA-Behandlung. **A.** Nierenfeuchtgewicht. **B.** Fläche der Glomeruli. * $p < 0,05$ vs. sham; # $p < 0,001$ vs. sham.

5.3.1.3 Analyse der glomerulären Filtrationsrate

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wurde bei DOCA-behandelten Podo GC-A Knockout- und Wildtyp-Mäusen mittels der „Single-shot-Clearance“-Methode am wachen Versuchstier ermittelt.

Wie in Abb. 5-14 zu sehen ist, trat infolge der sechswöchigen DOCA-Behandlung eine Hyperfiltration sowohl bei den Podo GC-A KO Mäusen als auch bei den Wildtypen auf, was einen typischen Kompensationsmechanismus darstellt.

Die kompensatorische Anpassung der Nierenfunktion war hierbei in den Podo GC-A Knockout-Mäusen deutlich schlechter als in den Wildtypen ($20,6 \pm 1,1$ (DOCA WT) vs. $14,3 \pm 1,8$ (DOCA KO) $\mu\text{l} / \text{min} / \text{g KGW}$; $p < 0,05$), was auf eine stärkere Schädigung des Nierengewebes der Knockout-Mäuse hinweisen könnte.

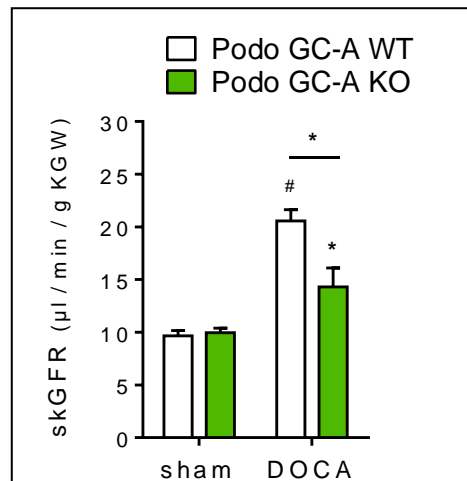


Abb. 5-14: Einzel-Nieren-GFR (skGFR) der Podo GC-A KO (n=7) und WT (n=7) Mäuse infolge sechswöchiger DOCA-Behandlung, bezogen auf das Körpergewicht, verglichen mit der GFR von unbehandelten (sham) Tieren, die für diese Betrachtung halbiert wurde. * $p < 0,05$ vs. sham bzw. wie durch den Balken angezeigt; # $p < 0,001$ vs. sham

5.3.1.4 Untersuchung der Albuminausscheidung

Unter Kontrollbedingungen zeigten Podo GC-A Knockout- und Wildtyp-Mäuse keine Unterschiede bezüglich der Ausscheidung von Albumin (Tabelle 5-1). Die mehrwöchige DOCA-Behandlung führte in den Podo GC-A WT Tieren zu einem moderaten Anstieg der Albuminausscheidung, wie in Abb. 5-15 A und B zu sehen ist (14-fach vs. sham innerhalb dreiwöchiger Behandlung, 35-fach vs. sham nach sechswöchiger Behandlung; $p < 0,05$). Die Podo GC-A KO Mäuse entwickelten im gleichen Zeitraum und unter der gleichen Behandlung eine massive Albuminurie, die sowohl im Spontanurin der Tiere (Abb. 5-15 A) als auch im über zwölf Stunden im metabolischen Käfig gesammelten Urin (Abb. 5-15 B) sichtbar war. Schon nach der dreiwöchigen DOCA-Exposition war die Albuminausscheidung gegenüber den unbehandelten (sham) Tieren des gleichen Genotyps wie auch gegenüber den DOCA-behandelten Wildtyp-Mäusen drastisch erhöht (122-fach vs. sham, 11-fach vs. DOCA WT; $p < 0,05$). Im Laufe der weiteren DOCA-Exposition erreichte die Albuminurie in den Podo GC-A KO Tieren nephrotische Level²⁵² (49,8 mg / 12 h, 5400-fach vs. sham, 200-fach vs. DOCA WT; $p < 0,05$) und ging mit einer Hypoalbuminämie einher, während die DOCA-behandelten Wildtyp-Mäuse eine unveränderte Plasma-Albumin-Konzentration zeigten (Abb. 5-15 C).

Die mRNA-Expression des Albumins in der Leber war in den DOCA-behandelten Podo GC-A Knockout-Mäusen verglichen mit unbehandelten Tieren desselben Genotyps und DOCA-behandelten Podo GC-A Wildtypen doppelt so hoch (Abb. 5-15 D).

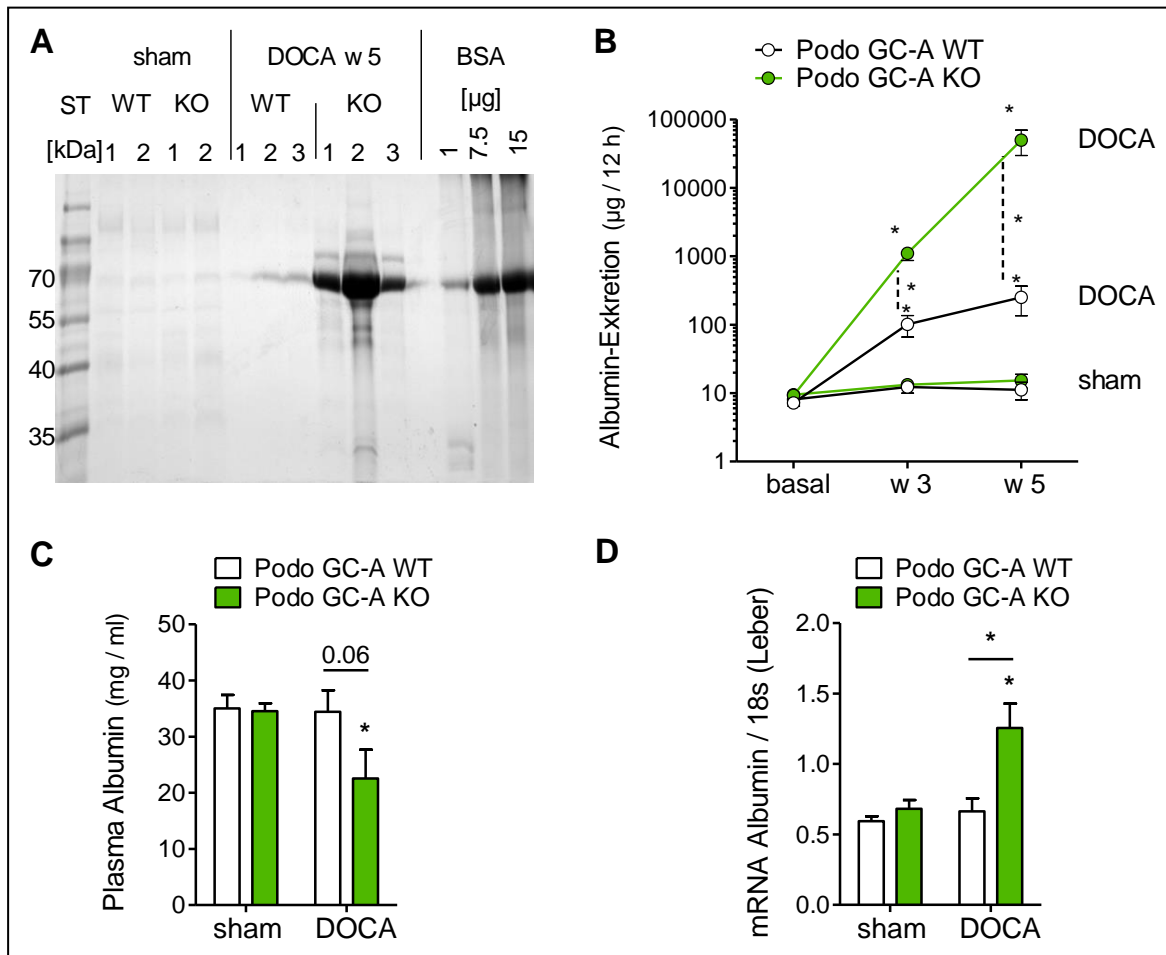


Abb. 5-15: Albumin-Exkretion in Podo GC-A KO (n=6) und WT (n=6) Mäusen infolge DOCA-Behandlung. **A.** Gel-Elektrophorese des Spontanurins der DOCA-behandelten Tiere und Coomassie-Färbung zur Sichtbarmachung von Albumin (Bande bei ca. 70 kDa) infolge sechswöchiger DOCA-Behandlung. **B.** Quantifizierung der Albuminurie im Sammelurin der Versuchstiere durch Albumin-ELISA. **C.** Plasma-Albumin-Konzentration. **D.** Albumin mRNA Expression in der Leber. * $p < 0,05$ vs. basal / sham desselben Genotyps bzw. DOCA KO vs. WT (angezeigt durch den Balken).

5.3.1.5 Histologische Untersuchungen der Nierenschnitte

Nach Beendigung des Versuchs wurden die Versuchstiere narkotisiert und die Nieren mit einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung perfusionsfixiert. In den mit Hämatoxylin / Eosin-Lösung gefärbten Nierenquerschnitten der DOCA-behandelten Versuchstiere mit podozytenspezifischer Deletion der GC-A waren deutlich erweiterte Tubuli sichtbar, in denen sich über weite Bereiche große Mengen an Protein ansammelten (Abb. 5-16 B: pinkfarbene Bereiche). In keinem der analysierten Nierenschnitte der DOCA-behandelten

Wildtyp-Versuchstiere waren derartige Protein-Akkumulationen zu sehen (Abb. 5-16 A). Unter Kontrollbedingungen konnten weder in der Podo GC-A KO noch in den Wildtyp-Nieren derartige Veränderungen detektiert werden.

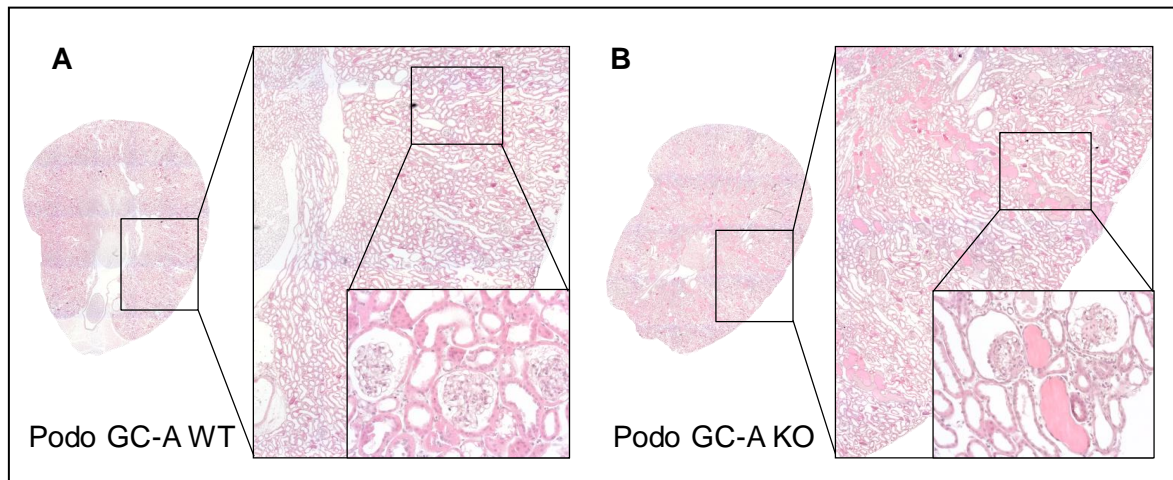


Abb. 5-16: HE-Färbung der Nierenschnitte nach DOCA-Salz-Behandlung. **A.** Podo GC-A WT. **B.** Podo GC-A KO. Vergrößerung: 5- (gesamter Nierenquerschnitt, Kachelaufnahme) bis 200-fach (Aufnahmen unten rechts).

Die genauere Untersuchung der Glomeruli ergab neben der bereits erwähnten Hypertrophie eine Proliferation des Mesangiums sowohl in den Glomeruli der DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäuse als auch ihrer Wildtyp-Wurfgeschwister, wie in den Nierenschnitten nach Anfärben mit dem PAS-Reagenz in Abb. 5-17 zu sehen ist. Die magentafarbenen Bereiche zeigen das kollagenreiche Matrixgewebe des intraglomerulären Mesangiums, das in den Glomeruli der DOCA-behandelten Knockout-Mäuse eindeutig stärker ausgeprägt ist (Abb. 5-17 A, unten rechts). Die genaue Analyse der mesangialen Fläche ist in Abb. 5-17 B zu sehen. Diese gibt die statistische Bestätigung der gravierenderen Expansion des Mesangiums in den Glomeruli der DOCA-behandelten Podo GC-A Knockout-Mäuse sowohl gegenüber den unbehandelten Tieren beider Genotypen als auch gegenüber den DOCA-behandelten Wildtypen ($2623 \pm 115 \mu\text{m}^2$ (DOCA KO) vs. $969 \pm 84 \mu\text{m}^2$ (KO sham) bzw. $1713 \pm 103 \mu\text{m}^2$ (DOCA WT); $p < 0,001$) wieder.

Zudem waren in einigen Glomeruli der DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäuse deutliche Anzeichen von Glomerulosklerose zu erkennen (Abb. 5-17 A, unten rechts). Neben der Vernarbung der glomerulären Kapillaren waren Adhäsionen der Parietalzellen der Bowman-Kapsel zu erkennen. Diese massive Schädigung trat nur in bestimmten Bereichen der Knockout-Nieren auf und in einigen Glomeruli waren nicht alle Kapillaren

von der Sklerosierung betroffen, so dass man von einer fokalen und segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) sprechen kann.

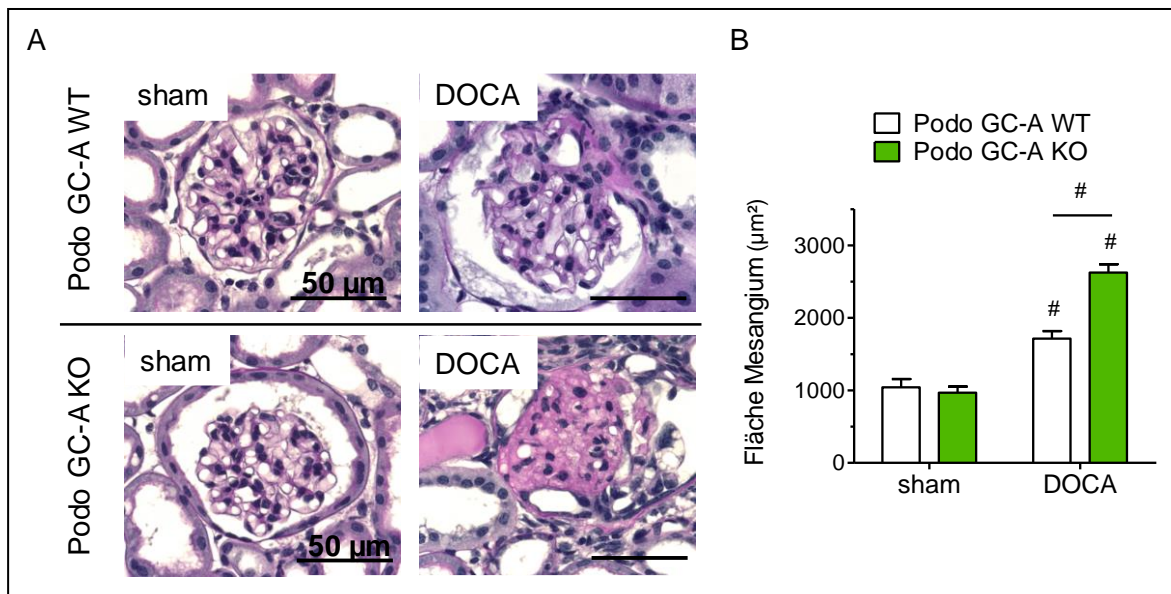


Abb. 5-17: Mesangiale Expansion in Podo GC-A KO und WT Mäusen infolge sechswöchiger DOCA-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten (sham) Tieren beider Genotypen **A.** PAS-Färbung der Nierenschnitte. **B.** Statistische Analyse der mesangialen Fläche. # $p < 0,001$ vs. sham desselben Genotyps oder wie durch den Balken angezeigt

Des Weiteren wurden die Nieren der DOCA-behandelten Podo GC-A KO und WT Mäuse auf Anzeichen einer Fibrosierung des Nierengewebes untersucht. Dafür wurden Paraffinschnitte der Nieren beider Genotypen mit einem Antikörper gegen alpha-Smooth-muscle-Actin (alpha-SMA) angefärbt, der durch den fluoreszierenden sekundären Cy2-Antikörper sichtbar gemacht wurde. Alpha-SMA ist eine Isoform des Aktins, die neben glatten Gefäßmuskelzellen auch in Myofibroblasten vorkommt. Myofibroblasten sind Zwischenformen glatter Muskelzellen und Fibroblasten und durch die Förderung der Kollagen-Bildung für die Fibrogenese in Nephropathien von Bedeutung²⁵³⁻²⁵⁵.

Abb. 5-18 A zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der anti-alpha-SMA gefärbten Nierenschnitte von unbehandelten (sham, links) und DOCA-behandelten (mittig und rechts) Podo GC-A KO (untere Reihe) und WT Mäusen (obere Reihe). Beide Genotypen, denen für den Zeitraum von sechs Wochen ein DOCA-Pellet implantiert wurde, zeigten eine erhöhte Expression des Proteins, wobei diese in den WT-Mäusen nur marginal, wenn auch signifikant gesteigert war (Abb. 5-18 B). Im Gegensatz dazu war die alpha-SMA-Fluoreszenzdichte in den Podo GC-A Knockout-Mäusen sowohl in den Glomeruli (unten mittig) als auch im peritubulären Interstitium (unten rechts) deutlich erhöht. Tatsächlich ergab die Quantifizierung und statistische Analyse eine fünffach höhere

alpha-SMA-Expression in den Nieren der DOCA-behandelten Podo GC-A Knockout-Mäuse verglichen mit den sham-Tieren desselben Genotyps; gegenüber den DOCA-behandelten Wildtyp-Mäusen war die Expression um das Dreifache erhöht; $p < 0,001$).

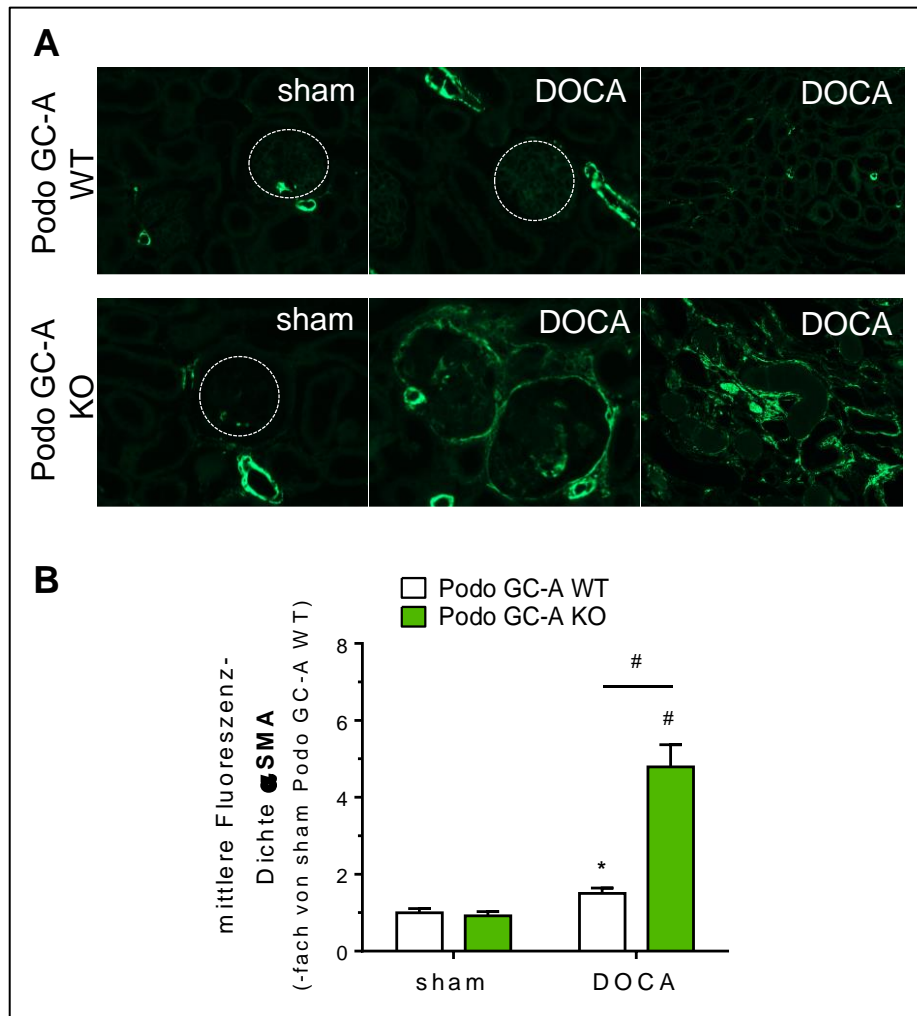


Abb. 5-18: DOCA-Behandlung führt zu erhöhter Expression des Fibrose-Marker-Proteins alpha-SMA in Podo GC-A KO Mäusen. **A.** Mikroskopische Aufnahmen der alpha-SMA-Immunfluoreszenz-Färbung. Obere Reihe: sham- und DOCA-behandelte Podo GC-A WT Nierenschnitte. Untere Reihe: sham- und DOCA-behandelte Podo GC-A KO Nierenschnitte. **B.** Statistische Analyse der alpha-SMA-Fluoreszenzdichte als Produkt der Fluoreszenz-Intensität und der untersuchten Fläche. Für die Auswertung wurde die Fluoreszenz in den Blutgefäßen außer Acht gelassen. * $p < 0,05$ vs. sham desselben Genotyps, # $p < 0,001$ vs. sham desselben Genotyps bzw. wie durch den Balken angezeigt

Die starke Fibrosierung des Nierengewebes der DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäuse konnte durch eine Masson-Goldner-Trichrom-Färbung bestätigt werden. Mithilfe dieser Färbemethode wird u.a. kollagenhaltiges Gewebe blaugrün angefärbt. Die vermehrte Einlagerung kollagenhaltigen Bindegewebes ist ein weiteres typisches Zeichen einer Fibrose²⁵⁶. In Abb. 5-19 ist eine verstärkte Einlagerung kollagener Fasern in den

sklerotischen Glomeruli (Aufnahmen unten mittig) und im periglomerulären Interstitium der Nieren der DOCA-behandelten Podo GC-A Knockout-Mäuse zu erkennen, während in den gleich behandelten Wildtyp-Mäusen kein fibrotisches Gewebe detektiert werden konnte.

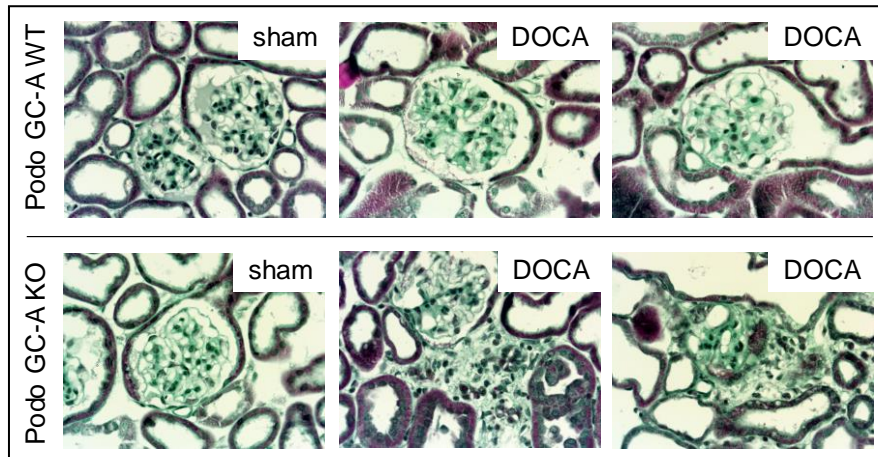


Abb. 5-19: Masson-Goldner-Färbung der Nierenschnitte unbehandelter (sham) und DOCA-behandelter Podo GC-A KO (untere Reihe) und WT Mäuse (obere Reihe). Die untere Aufnahme in der Mitte zeigt die Fibrosierung der Glomeruli, die Aufnahme rechts unten das fibrotische periglomeruläre Gewebe in den Nieren der DOCA-behandelten Knockouts.

5.3.1.6 Analyse der Podozyten

Einer der Hauptaspekte dieses Projektes war es, herauszufinden, ob die Deletion der podozytären GC-A in pathologischen Situationen zu einer direkten Schädigung des Podozyten führt. Dementsprechend wurde im Rahmen dieses Versuchs das Hauptaugenmerk auf die Untersuchung der Podozyten gelegt.

Abbildung 5-20 zeigt elektronenmikroskopische Untersuchungen der Nierenschnitte, die Aufschluss über die Morphologie der Podozyten in den Nieren der DOCA-behandelten Podo GC-A KO und WT Mäuse gaben. Die sechswöchige DOCA-Behandlung verursachte in den Podo GC-A WT Mäusen nur geringfügige Veränderungen der Podozyten. Die Zellkörper hatten eine normale Form (Abb. 5-20 A, oben links, 7000-fache Vergrößerung) und die podozytären Fußfortsätze waren nur leicht verbreitert (Abb. 5-20 A, unten links und 5-20 B: 206 ± 7 (DOCA) vs. 183 ± 4 (sham) nm; $p < 0,05$).

Im Gegensatz dazu waren die Zellkörper der Podozyten der Podo GC-A KO Mäuse stark deformiert (Abb 5-20 A, oben rechts, 7000-fache Vergrößerung). Auch die podozytären Fußfortsätze hatten größtenteils ihre physiologische Form verloren, sie fusionierten und lösten sich teilweise von der Basalmembran ab, eine pathologische Erscheinung, die im Englischen als „Podocyte foot process effacement“ (FPE) bezeichnet wird (Abb. 5-20 A, 84

rechts unten). Das FPE ist ein deutlicher Hinweis auf den Verlust der Integrität der Podozyten, d.h. sie sind nicht mehr in der Lage, ihre Filterfunktion zu erfüllen. Die Schädigung des glomerulären Filters kann als Ursache für die massive Albuminurie angesehen werden. Die gravierende Schädigung der Fußfortsätze der Podozyten in den Nieren der Podo GC-A KO Mäuse wurde durch die Analyse der Fußfortsatzbreite, dargestellt in Abb. 5-20 B, bestätigt. Im Gegensatz zu den unbehandelten und Knockout-Tieren und den DOCA-behandelten Wildtypen hatte sich die Fußfortsatzbreite in den DOCA-behandelten Knockouts verdreifacht (Abb. 5-20 B: 602 ± 47 nm (DOCA KO) vs. 190 ± 5 nm (sham KO) und 206 ± 7 nm (DOCA WT); $p < 0,001$).

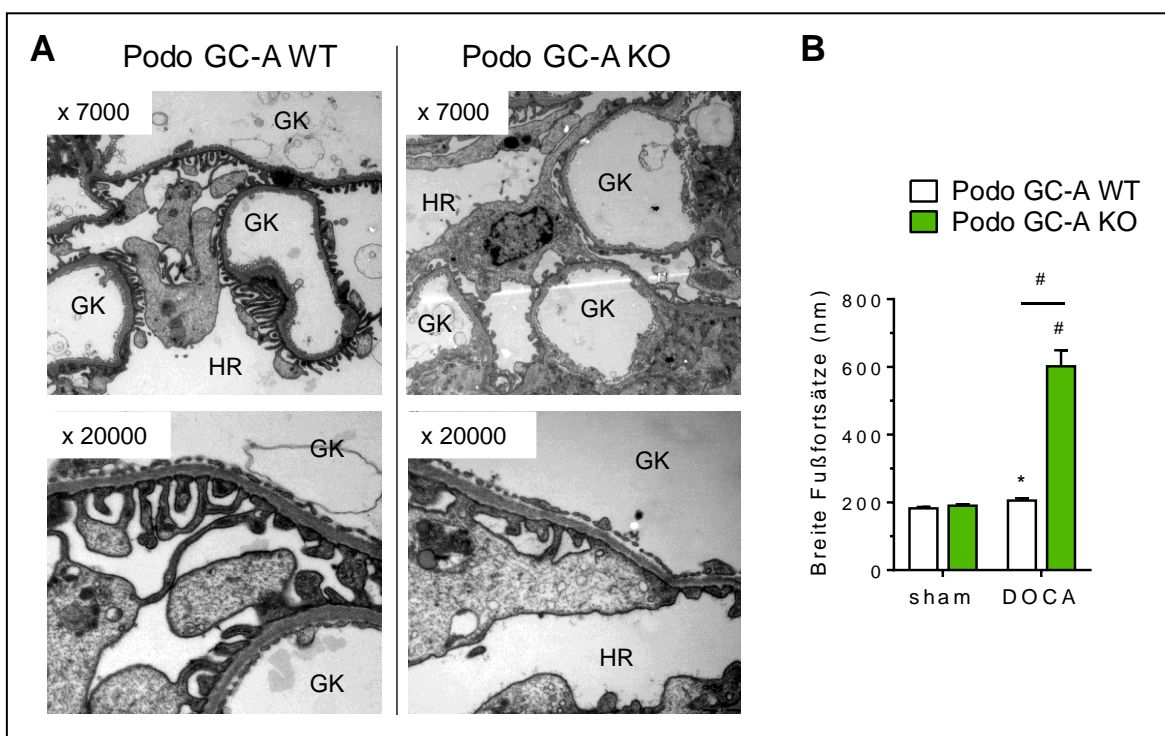


Abb. 5-20: Schädigung der Podozyten in DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen. **A.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Podozyten in 7000-facher Vergrößerung (obere Reihe) und der podozytären Fußfortsätze in 20000-facher Vergrößerung (untere Reihe). GK: Lumen der glomerulären Kapillaren. HR: Harnraum. **B.** Analyse der Fußfortsatzbreite. * $p < 0,05$ vs. sham desselben Genotyps; # $p < 0,001$ vs. sham desselben Genotyps bzw. wie durch den Balken angezeigt.

Des Weiteren konnte in den Glomeruli der Podo GC-A KO Mäuse, die eine sechswöchige DOCA-Applikation erhielten, eine positive TUNEL-Färbung nachgewiesen werden. Das TUNEL-Reagenz dient der Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen. Da es mit einem fluoreszierenden sekundären Antikörper konjugiert war, konnte es im Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht werden. Eine positive TUNEL-Färbung konnte nur in den Glomeruli der DOCA-behandelten Podo GC-A Knockout-Mäuse detektiert werden und

auch hier wiesen nur ca. 1% der untersuchten Glomeruli apoptotische Zellen auf, die sich in der Peripherie des Kapillarknäuels befanden (Abb. 5-21 A). Eine weitere Färbung mit einem Antikörper gegen Caspase-3, einem Enzym der Cystein-Aspartat-Protease-Familie, das eine wichtige Rolle in der Einleitung des programmierten Zelltodes darstellt, war ebenso nur in den DOCA-behandelten Podo GC-A KO Glomeruli sichtbar (Abb. 5-21 B). Eine Co-Färbung mit einem Antikörper gegen den Podozyten-Marker Synaptopodin war nicht zu sehen.

Durch das Anfärben der Nierenschnitte mit dem Zellkern-Marker DAPI und einer Synaptopodin-Co-Färbung konnten die Podozyten in den Glomeruli-Querschnitten der unbehandelten (sham) und DOCA-behandelten Versuchstiere beider Genotypen gezählt werden. In den DOCA-behandelten Knockouts war die Podozytenzahl sowohl gegenüber den unbehandelten Tieren desselben Genotyps (8 ± 1 (DOCA) vs. 13 ± 1 pro Glomerulusquerschnitt (sham); $p < 0,05$) als auch gegenüber den DOCA-behandelten Wildtypen (12 ± 1 ; $p < 0,05$) signifikant reduziert, wie in Abb. 5-21 C zu sehen ist.

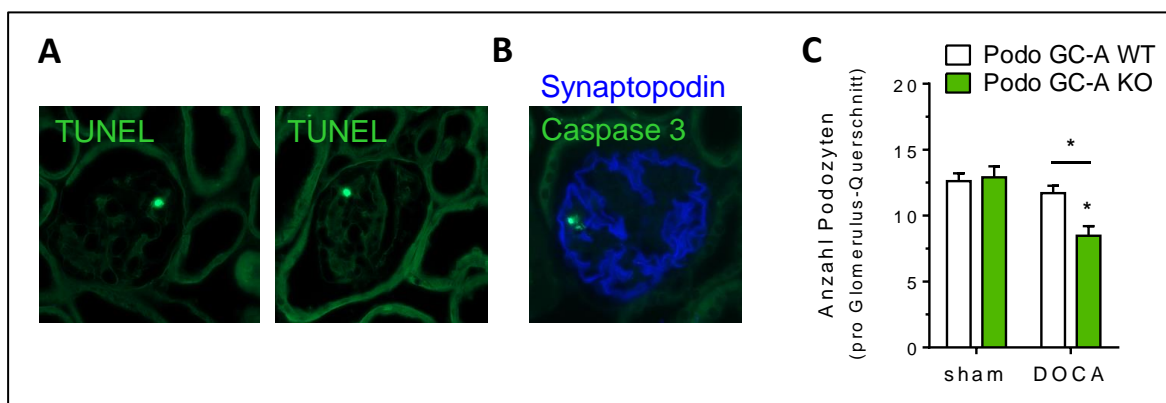


Abb. 5-21: podozytäre Apoptose nach DOCA-Salz-Behandlung. **A.** TUNEL-Färbung. **B.** Caspase-3-Färbung. **C.** Analyse der Podozytenzahl pro Glomerulus. * $p < 0,01$ vs. sham desselben Genotyps bzw. wie durch den Balken angezeigt

In den verbliebenen Podozyten der DOCA-behandelten Podo GC-A KO Tiere war die Expression wichtiger podozytärer Proteine stark reduziert. Die immunhistochemische Untersuchung der Podocin-Expression (Abb. 5-22 A und B) zeigte, dass die Ausprägung des Schlitzmembran-Proteins in den Glomeruli der DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäuse deutlich reduziert und nur auf die Zellkörper beschränkt war. Die Auswertung der Fluoreszenzdichte zeigt eine hochsignifikant geringere Expression des Proteins verglichen mit den unbehandelten Tieren und auch mit den Wildtypen, die die gleiche Behandlung erhielten.

Das Aktin-assoziierte podozytäre Protein Synaptopodin war in den DOCA-behandelten Knockouts ebenfalls signifikant reduziert (Abb. 5-22 C und D). Wie in Abb. 5-22 C zu sehen, war die Fluoreszenzintensität des Podozyten-Markers in den Knockout-Glomeruli (unten rechts) kaum sichtbar, während die Expression in den Nierenschnitten der unbehandelten Tiere beider Genotypen (links oben und unten) sowie der DOCA-behandelten Wildtypen (rechts oben), wenn auch hier etwas geringer ausgeprägt, deutlich zu erkennen war.

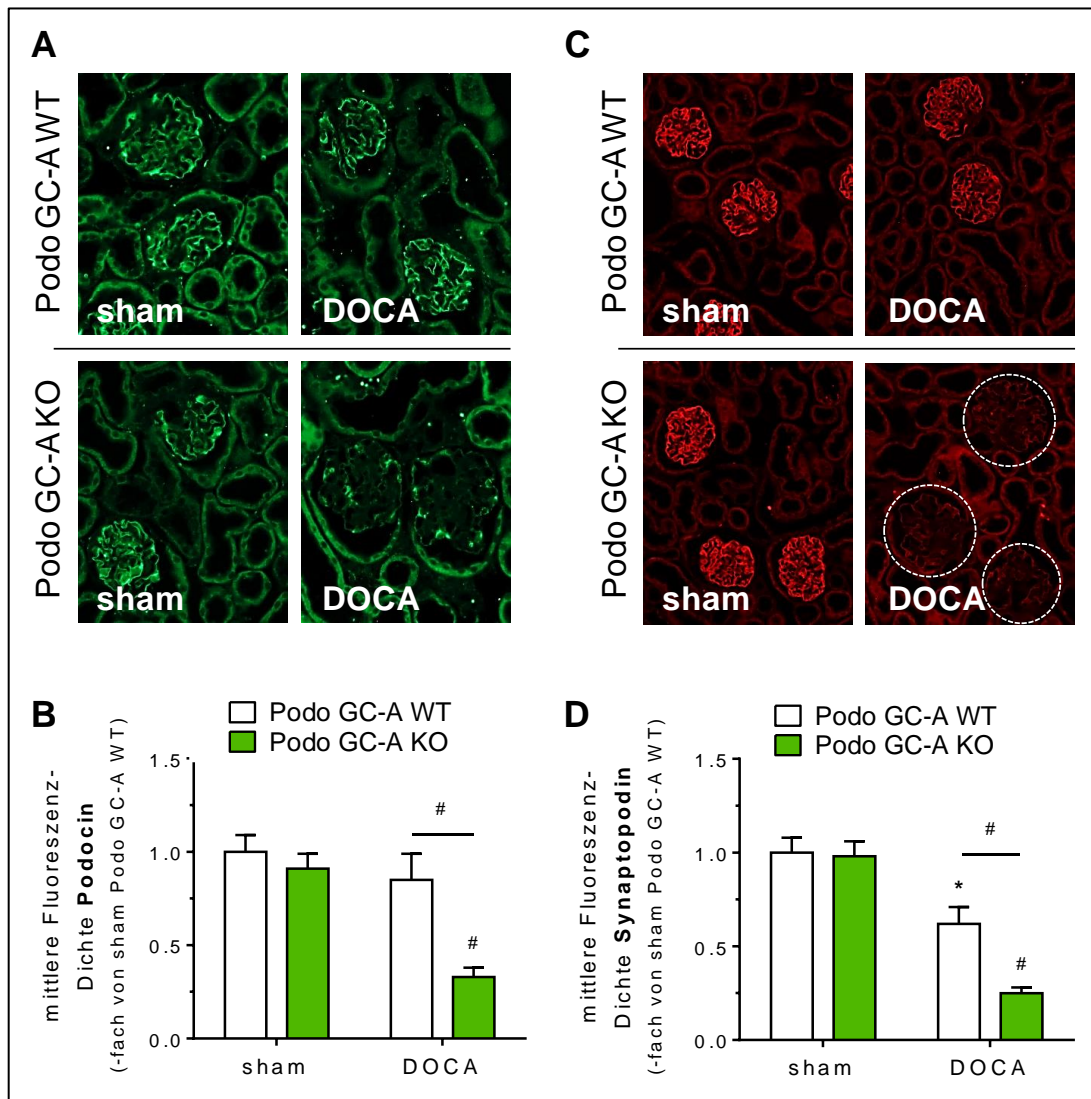


Abb. 5-22: Reduzierte Expression von Podocin und Synaptopodin in den Podozyten der DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäuse. **A.** Immunfluoreszenz-Färbung des Schlitzmembran-Proteins Podocin. **B.** Analyse der mittleren Fluoreszenzdichte (FD, Produkt der Fluoreszenzintensität und der analysierten Fläche) von Podocin, bezogen auf die mittlere FD von unbehandelten (sham) Podo GC-A WT Mäusen. **C.** Immunfluoreszenz-Färbung des Aktin-assoziierten Proteins Synaptopodin. **D.** Analyse der mittleren FD von Synaptopodin, bezogen auf die mittlere FD von unbehandelten (sham) Podo GC-A WT Mäusen. * $p < 0,05$ vs. sham desselben Genotyps; # $p < 0,001$ vs. sham desselben Genotyps bzw. wie durch den Balken angezeigt.

5.3.1.7 Untersuchungen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Nephropathien gehen sehr häufig mit der Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies einher, die zu oxidativem Stress führen und in die Schädigung der Nephrone involviert sind^{16,257}.

Als oxidativen Stress bezeichnet man einen Stoffwechszustand, in dem eine pathophysiologische Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (engl. „Reactive Oxygen species“, ROS), vorhanden ist bzw. gebildet wird. Diese Radikale, zu denen z.B. Wasserstoffperoxid oder das Superoxid-Anion gehören, entstehen während verschiedener Stoffwechselreaktionen, u.a. in den Mitochondrien. Normalerweise halten die Zellen ein Gleichgewicht von Stoffen mit reduzierenden und oxidierenden Eigenschaften. Das als oxidativer Stress bezeichnete Ungleichgewicht dieser Substanzen führt zur Schädigung der zellulären und extrazellulären Bestandteile eines Gewebes bzw. Organs. Die NADPH-Oxidasen NOX-2 und NOX-4 gelten als Marker-Enzyme für oxidativen Stress.

In den DOCA-behandelten Versuchstieren war die Expression von NOX-2 und NOX-4 gegenüber den sham-Tieren des jeweiligen Genotyps deutlich erhöht, wobei es zwischen Podo GC-A Knockout- und Wildtyp-Mäusen keinen Unterschied gab (Abb. 5-23 A und B). Die NAD(P)H-Hydrogenase NQO-1 (engl. „NAD(P)H-Quinone acceptor oxidoreductase 1“) war jedoch in den Glomeruli der DOCA-behandelten Podo GC-A WT Mäusen stärker exprimiert als in den gleichbehandelten Knockout-Mäusen (Abb. 5-23 C). NQO-1 katalysiert die Reduktion der bei diversen Metabolisierungsreaktionen gebildeten giftigen Chinone zu ungiftigen Hydrochinonen und minimiert dadurch die Möglichkeit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies²⁵⁸. Die verringerte Expression des Enzyms weist zusammen mit der erhöhten Expression von NOX-2 und NOX-4 auf ein Ungleichgewicht redoxaktiver Substanzen und damit auf oxidativen Stress in den DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen hin.

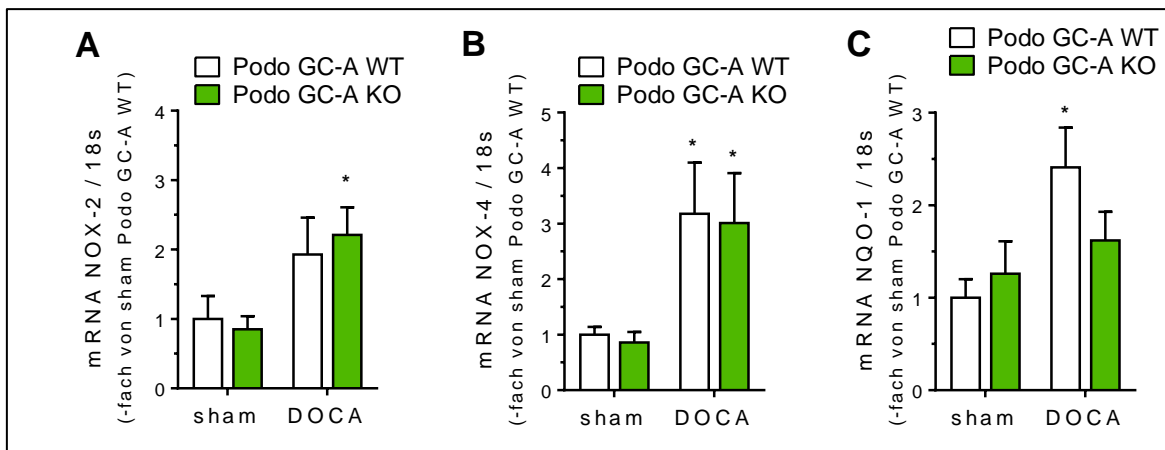


Abb. 5-23: Genexpression Oxidativer-Stress-Marker in den Podozyten DOCA-behandelter Podo GC-A KO und WT Mäuse. **A** und **B**. mRNA Expression der NADPH-Oxidasen NOX-2 und NOX-4. **C**. mRNA-Expression des antioxidativ wirkenden Enzyms NQO-1. * $p < 0,05$ vs. sham

Im Zuge der Untersuchung zur Entwicklung von oxidativem Stress in den geschädigten Glomeruli der behandelten Podo GC-A KO Mäuse wurde auch die Expression von 4-Hydroxynonenal (4-HNE) analysiert. Dieses Aldehyd wird im Rahmen der Lipidperoxidation ungesättigter Fettsäuren gebildet und wird bei Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und verschiedenen Karzinomen mit der Entstehung von oxidativem Stress in Verbindung gebracht^{259,260}. Des Weiteren konnten Bauer et al. 4-HNE mit der Induktion des programmierten Zelltods in Verbindung bringen²⁶¹. Auch in der Entstehung und Progression renaler Erkrankungen, z.B. der diabetischen Nephropathie, konnte eine Beteiligung des ROS-Markers sowohl in murinem²⁶² als auch in humanem²⁶³ Nierengewebe gezeigt werden.

Die Untersuchung der 4-HNE Level in den Glomeruli der DOCA-behandelten Podo GC-A KO und WT Mäuse ist in Abb. 5-24 dargestellt. Beide Genotypen zeigten unter DOCA erhöhte Spiegel des 4-Hydroxynonenals in den Glomeruli (Abb. 5-24 A und B), wobei diese in den Glomeruli der Podo GC-A KO Mäuse deutlich verstärkt war. Durch die Co-Färbung mit Podocin konnte die 4-HNE-Lokalisation direkt in den Podozyten ausgewertet werden. Auch hier zeigten die DOCA-behandelten Podo GC-A Knockout-Mäuse höhere Level des ROS-Markers als die gleichbehandelten Wildtypen (Abb. 5-24 C). Des Weiteren wurde durch die Co-Färbung sichtbar, dass die Bildung des Aldehyds nicht auf die Podozyten beschränkt war, sondern auch im glomerulären Mesangium stattfand.

Auch dieses Ergebnis weist auf das Vorliegen von oxidativem Stress in den Nieren der Podo GC-A KO Mäuse hin, während die Tiere mit einer intakten NP / GC-A / cGMP-Achse zumindest in geringerem Ausmaß davon betroffen sind.

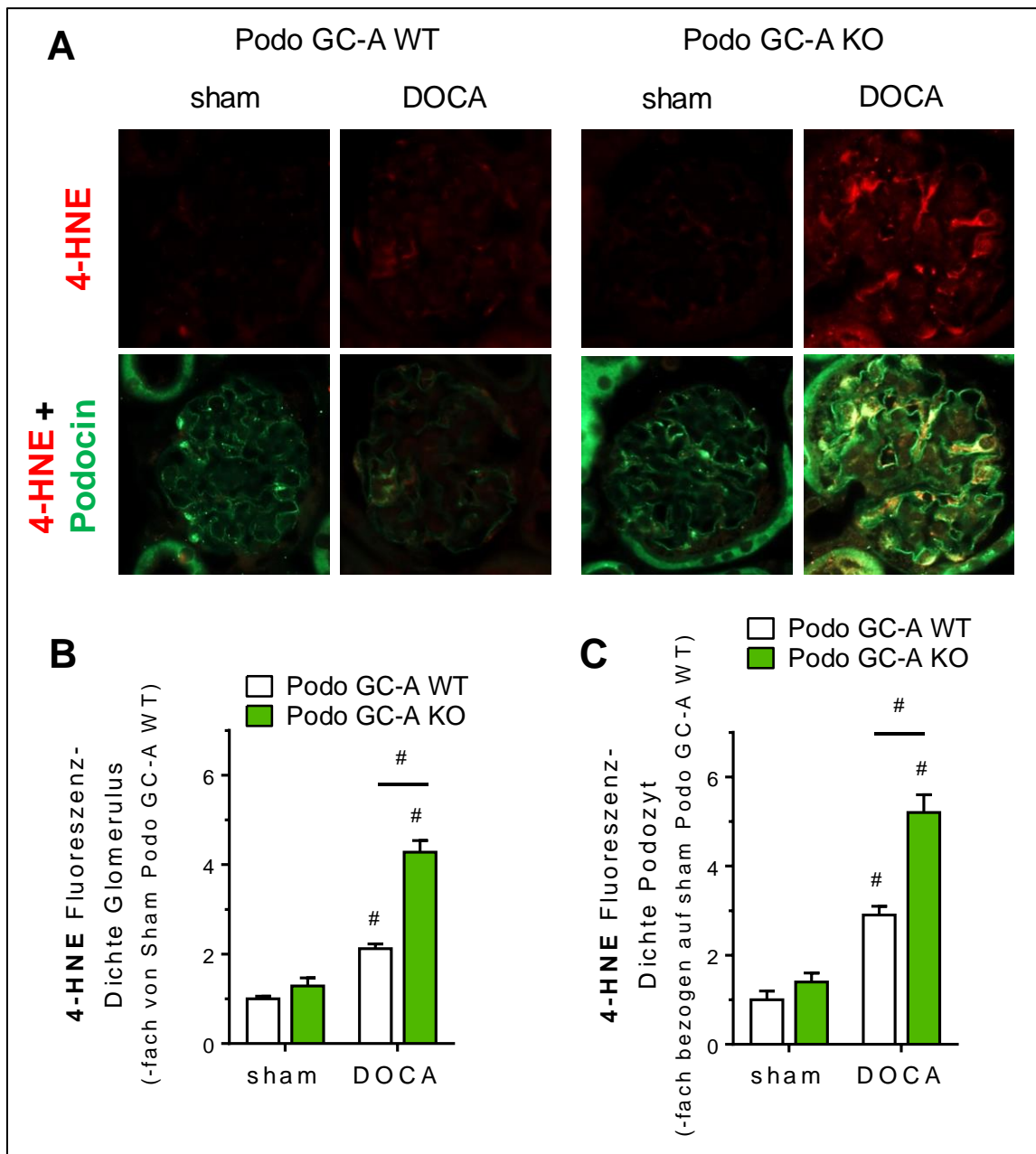


Abb. 5-24: Analyse des Oxidativen Stress-Markers 4-Hydroxynonenal (4-HNE) nach sechswöchiger DOCA-Behandlung. **A.** 4-HNE-Immunfluoreszenzfärbung und Co-Färbung mit Podocin. Anmerkung: Für die Aufnahmen der Podocin-Co-Färbung mussten Parameter wie die Belichtungszeit aufgrund der unterschiedlich starken Expression des Proteins in den verschiedenen Behandlungsgruppen angepasst werden. **B und C.** Analyse der Fluoreszenzdichte von 4-HNE in den Glomeruli (B) und Podozyten (C) von Podo GC-A KO und WT Mäusen. Angaben bezogen auf unbehandelte (sham) Podo GC-A WT Mäuse. # $p < 0,001$ vs. sham desselben Genotyps bzw. wie durch den Balken angezeigt

5.3.1.8 TRPC6-Expression

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten podozytären Proteinen war der membranständige Ionenkanal TRPC6 (engl. „Transient receptor potential canonical channel 6“) in den Glomeruli der Podo GC-A Knockout-Mäuse nach sechswöchiger Exposition mit DOCA verglichen mit den unbehandelten Tieren deutlich stärker exprimiert. TRPC6 ist wie bereits erwähnt in der Membran der Fußfortsätze verankert und interagiert mit der zwischen den Fußfortsätzen befindlichen Schlitzmembran. Auch ist bekannt, dass eine genetische Überexpression des Rezeptors zu einer Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere führt⁵⁴.

Abb. 5-25 A zeigt Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Nieren-Paraffinschnitte von sham- und DOCA-behandelten Podo GC-A KO und WT Mäusen, die mit Antikörpern gegen TRPC6 (obere und untere Reihe) und / oder Synaptopodin zur Identifizierung der Podozyten (mittlere und untere Reihe) angefärbt wurden. Schon unter Kontrollbedingungen (sham) ist der TRPC6-Kanal in den Podozyten der Knockout-Mäuse etwas stärker exprimiert als in den Wildtypen (Abb. 5-25 C), während im gesamten Glomerulus kein Unterschied zwischen den Genotypen zu erkennen ist (Abb. 5-25 B). Durch die mehrwöchige Behandlung mit DOCA wurde die Expression des Rezeptors in den DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen sowohl im gesamten Glomerulus als auch in den Podozyten deutlich verstärkt. Die DOCA-behandelten Wildtypen zeigten hingegen keine Veränderungen der TRPC6 Expression.

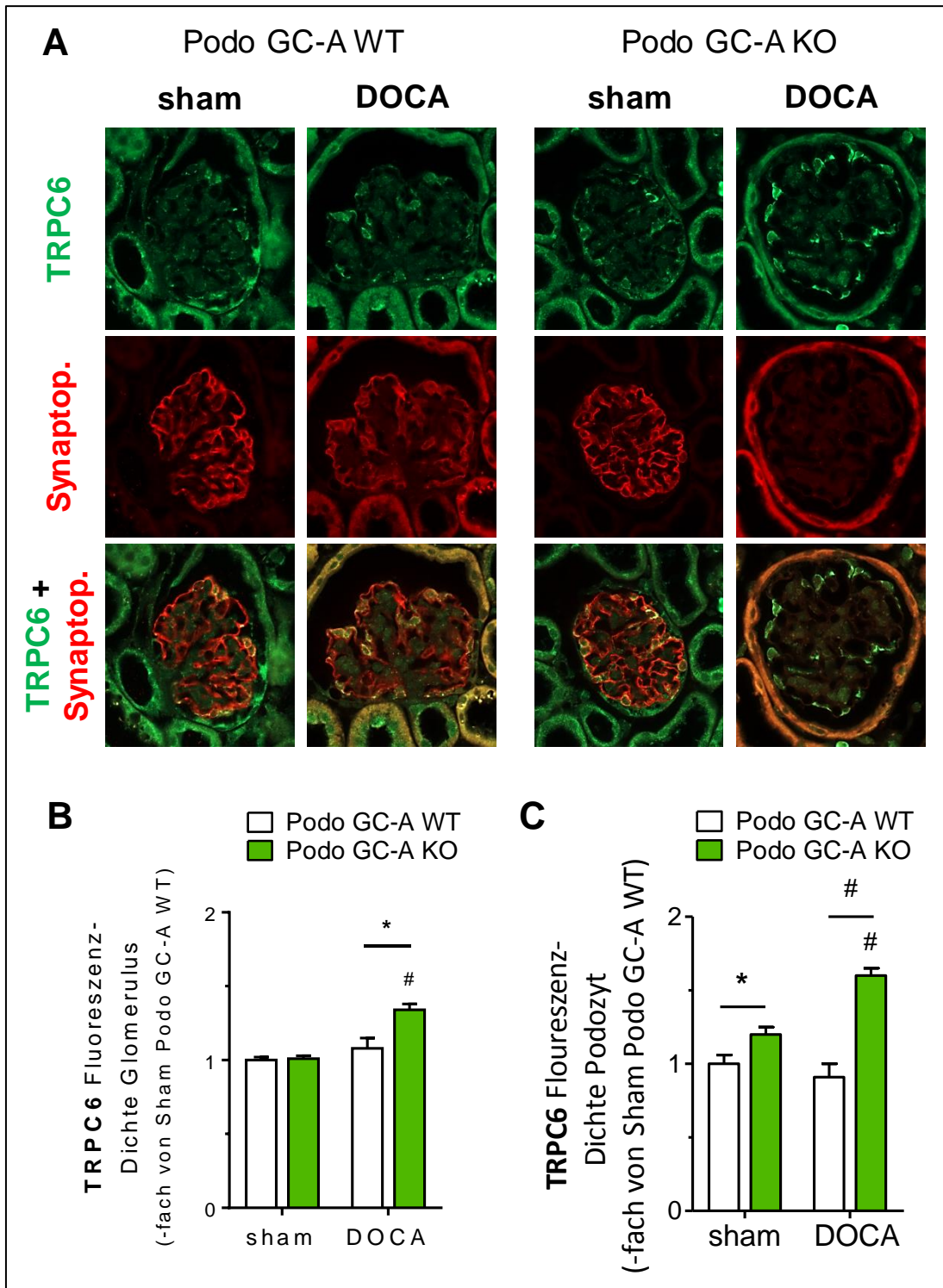


Abb. 5-25: TRPC6-Expression in Podo GC-A KO und WT Mäusen infolge sechswöchiger DOCA-Behandlung. **A.** Immunfluoreszenz-Aufnahmen von TRPC6 und Synaptopodin in den Glomeruli unbehandelter (sham) und DOCA-behandelter Podo GC-A KO und WT Mäuse. Anmerkung: die Belichtungszeit der Synaptopodin-Aufnahmen wurde aufgrund der geringeren Expression in den DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen angepasst. **B und C.** Statistische Analyse der TRPC6-Fluoreszenzdichte in den Glomeruli (B) und Podozyten (C) unbehandelter (sham) und DOCA-behandelter Podo GC-A KO und WT Mäuse. * $p < 0,05$ Podo GC-A WT vs. KO wie durch den Balken angezeigt; # $p < 0,001$ vs. sham desselben Genotyps bzw. wie durch den Balken angezeigt

Zu den Ergebnissen der Protein-Expression passend war die mRNA-Expression des TRPC6-Kanals in den Glomeruli der DOCA-behandelten Podo GC-A Knockout-Mäuse gegenüber den unbehandelten Tieren desselben Genotyps wie auch gegenüber den DOCA-behandelten Wildtypen signifikant erhöht (Abb. 5-26 A). Im Gegensatz dazu konnte für den TRPC5-Kanal, einem weiteren Vertreter der TRPC-Kanal-Familie, der auch in den Podozyten nachgewiesen wurde²⁶⁴, keine erhöhte Expression auf transkriptioneller Ebene festgestellt werden (Abb. 5-26 B).

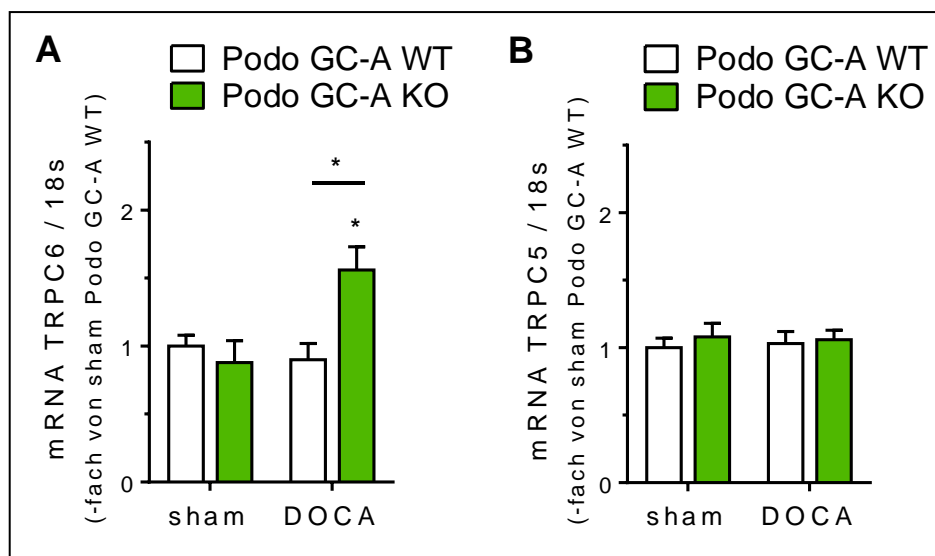


Abb. 5-26: mRNA Expression der TRPC-Kanal-Proteine in den Glomeruli von sham- und DOCA-behandelten Podo GC-A KO und WT Mäusen. **A.** TRPC6. **B.** TRPC5. * $p < 0,05$ vs. sham desselben Genotyps bzw. wie durch den Balken angezeigt.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass die Deletion der GC-A in den Podozyten im pathophysiologischen Situationen zu gravierenden Schädigungen der Glomeruli und der Podozyten führt, die mit einer massiven Proteinurie einhergehen. Damit wurde erstmalig eine direkte nephroprotective Wirkung der kardialen natriuretischen Peptide ANP und BNP durch den Erhalt der Integrität der glomerulären Podozyten dargelegt.

Inwieweit der TRPC6-Kanal eine funktionelle Rolle in der DOCA-vermittelten Schädigung der Podozyten in der Abwesenheit der NP / GC-A / cGMP-Signalkaskade spielt, wurde in weiteren Experimenten untersucht, deren Ergebnisse im folgenden Abschnitt dargestellt sind.

5.3.2 Untersuchung der funktionellen Rolle des TRPC6-Kanals in DOCA-behandelten Podo GC-A KO und WT Mäusen

Da die Expression des TRPC6-Kanals in den Podozyten der Podo GC-A Knockout-Mäuse infolge der sechswöchigen DOCA-Exposition gegenüber den Wildtypen deutlich erhöht war, wurde dessen funktionelle Beteiligung an der Podozytenschädigung in weiteren Experimenten genauer untersucht. Hierfür wurde der TRPC-Kanal-Blocker SKF 96365 verwendet.

5.3.2.1 Messung des Calcium Einstroms in Podozyten isolierter Glomeruli

Der TRPC6-Kanal ist unter anderem permeabel für Calcium und seine Aktivierung in den Podozyten führt zur Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ ²⁴². Wie bereits erwähnt wird dem Ca^{2+} -Ion eine wichtige Rolle in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im Podozyten zugesprochen¹⁶ und eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde in mehreren Studien mit einer Podozytenschädigung in Verbindung gebracht⁷⁹⁻⁸¹. Burford et. al konnten in einer kürzlich erhobenen *in vivo* Studie zeigen, dass die ATP-vermittelte Steigerung von $[Ca^{2+}]_i$ im Podozyten die Bildung von sich rasch ausbreitenden, von Podozyt zu Podozyt weitergeleiteten Calciumwellen entlang der glomerulären Kapillaren auslöste. Dies führte zur Kontraktion des Kapillarnäuels und zu einer erhöhten Permeabilität der Filtrationsbarriere für Albumin²⁶⁵. Die Messung einer, möglicherweise durch die Aktivierung des TRPC6-Kanals verursachten, Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ trägt also wesentlich zur Aufklärung der Schädigungsmechanismen in den Podozyten der Podo GC-A KO Versuchstiere bei.

Für diesen Versuch wurden Podo GC-A KO und WT Mäuse im Hintergrund der mTmG-Reportermaus verwendet, bei denen die Podozyten durch ihre grüne Fluoreszenz leicht identifiziert werden konnten. Um die Bedeutung des TRPC6 in der Krankheitsentstehung zu untersuchen, wurde die Behandlungsdauer der Tiere auf 12 Tage begrenzt.

Die Region, in der die Calcium-Bestimmung stattfinden sollte, wurde in den fluoreszierenden Podozyten als ROI (engl. „Region of interest“) markiert (Abb. 5-27 A).

Für die Stimulation des Calcium-Influx wurde Adenosintriphosphat (ATP) verwendet. ATP steigert wie bereits erwähnt die Calcium-Konzentration in den Podozyten über die Aktivierung von P2Y-Rezeptoren^{61,266} und aktiviert zudem den podozytären TRPC6-Kanal²⁶⁷.

Die Bestimmung der Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration erfolgte anhand der Fura-2-Methode. Wie in Abb. 5-27 B zu sehen ist, induzierte ATP den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in den Podozyten unbehandelter Podo GC-WT (linkes Diagramm) und KO Mäuse (rechtes Diagramm) gleichermaßen (weiße Kurven). Durch die vorherige, 12-tägige Behandlung der Tiere mit DOCA änderte sich der ATP-induzierte Calcium-Influx in den Wildtyp-Podozyten nicht. In den Podozyten der DOCA-behandelten Knockout-Mäuse wurde hingegen ein deutlich verstärkter Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ gemessen (rote Kurven). Wurde dem Perfusionsmedium fünf Minuten vor dem Start der ATP-Applikation der TRPC-Kanal-Blocker SKF 96365 (10 μ M, im Folgenden: SKF) zugegeben, verringerte dies den ATP-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den Podozyten beider Genotypen auf etwa die gleichen Werte (blaue Kurven).

Interessanterweise konnte der ATP-induzierte Calcium-Anstieg in den DOCA-behandelten Podo GC-A Wildtyp-Mäusen auch durch vorherige Applikation einer 200 μ M-Lösung von ANP supprimiert werden. In den Podozyten der DOCA-behandelten Podo GC-A KO Tieren zeigte ANP keinen Effekt auf den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (schwarze Kurven).

Anhand der statistischen Auswertung der Peak-Differenzen (Maximal-Wert – mittlerer Basalwert) und der Flächen unter den Kurven (engl. „Area under the curve“, AUC) konnte die stärkere Ca^{2+} -Antwort auf ATP in den Podozyten der DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäuse bestätigt werden (Abb. 5-27 C und D).

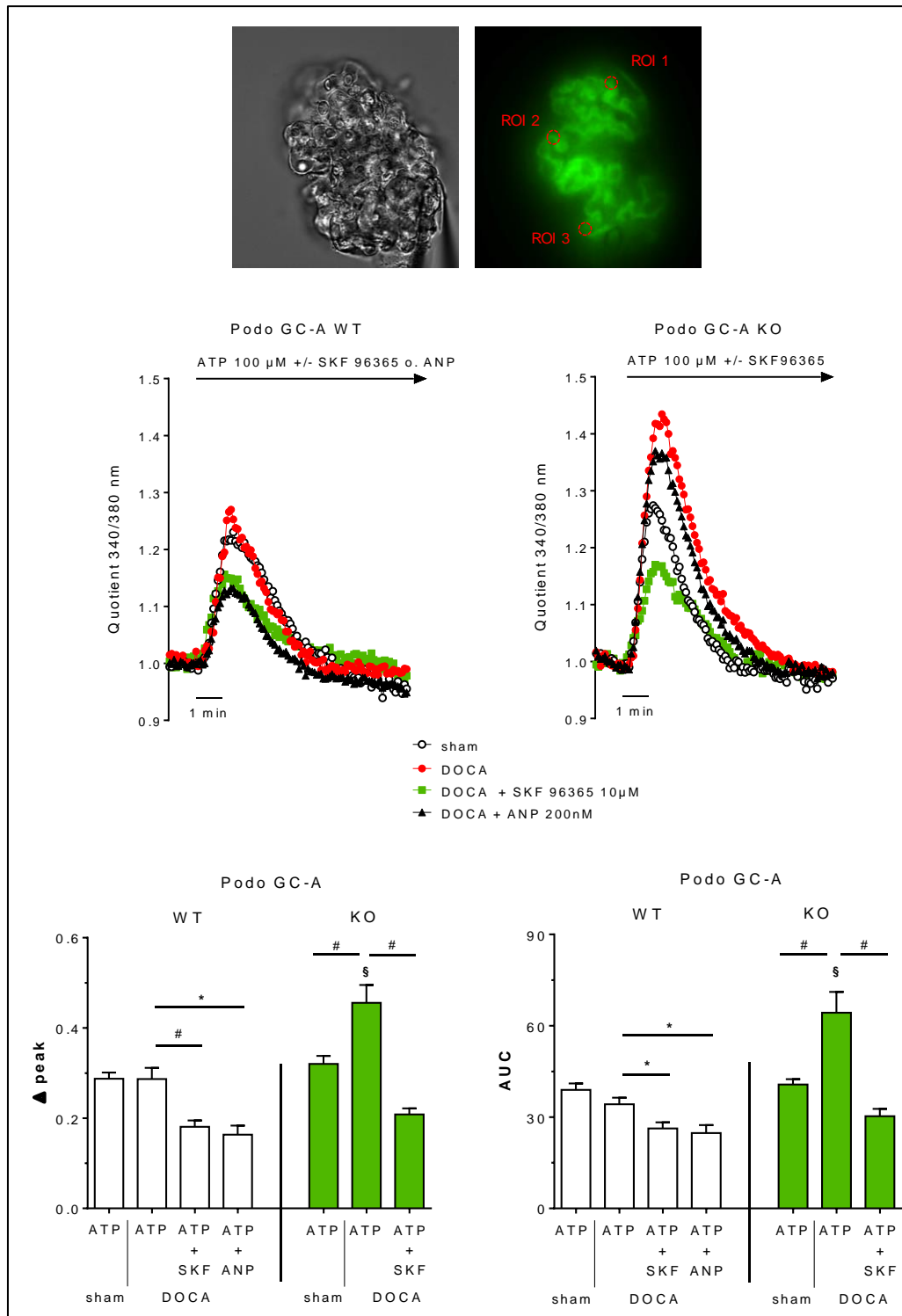


Abb. 5-27: Bestimmung des Calcium-Influx in Podozyten isolierter Glomeruli von Podo GC-A KO und WT Mäusen ohne und nach zwölf-tägiger DOCA-Behandlung. **A.** Mikroskopische Aufnahme eines isolierten Glomerulus (links) und Markierung der grün fluoreszierenden Podozyten (rechts). ROI: Region of interest (engl.): bezeichnet die Region, in der die Messung stattfand. **B.** Messung des ATP-induzierten Ca^{2+} -Einstroms in die Podozyten isolierter Glomeruli von Podo GC-A WT (linkes Diagramm) und Podo GC-A KO Mäusen (rechtes Diagramm). **C.** Analyse der Peak-Differenzen des podozytären Ca^{2+} -Influx nach Zugabe von SKF 96365 oder ANP bezogen auf den Basalwert in den Podozyten von unbehandelten (sham) Podo GC-A WT Tieren. **D.** Analyse der Fläche unter der Kurve (engl. „Area under the curve“, AUC) analog C. * $p < 0,05$; # $p < 0,001$ wie durch den Balken angezeigt. § $p < 0,01$: DOCA / ATP Podo GC-A KO vs. DOCA / ATP Podo GC-A WT

5.3.2.2 Applikation des TRPC-Kanal Blockers SKF 96365 *in vivo*

Die vorhergehenden Versuche zeigten, dass der in der podozytären Basalmembran verankerte TRPC6-Kanal in den DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen stärker exprimiert ist als in den Wildtyp-Wurfgeschwistern. Außerdem konnte in den Versuchen ein verstärkter TRPC6 abhängiger Calcium-Influx in die Podozyten der Podo GC-A KO Mäuse gezeigt werden. Aus diesem Grund wurde im folgenden Versuch der Einfluss des TRPC6 auf die Progression der Nieren- bzw. Podocyten-Schädigung durch eine zweiwöchige DOCA-Behandlung in Podo GC-A KO Mäusen untersucht. Gleichzeitig erfolgte bei einigen Mäusen (n=6 (Podo GC-A WT), n=7 (Podo GC-A KO)) zusätzlich die Gabe des TRPC-Kanal-Blockers SKF 96365 (10 µg / g KGW, einmal täglich, i.p. Injektion; im Folgenden „SKF“). Eine weitere Gruppe (n=5 (Podo GC-A WT), n=6 (Podo GC-A KO)) wurde zur Kontrolle mit einer physiologischen Kochsalzlösung in gleicher Weise behandelt. Auch in diesem Versuch wurden die Versuchstiere mit scheinbehandelten Kontrolltieren (sham) verglichen (n=5 (Podo GC-A WT), n=5 (Podo GC-A KO)). Am Ende des Versuchs wurde der mittlere arterielle Blutdruck (MAD) der anästhesierten Tiere in der Aorta bestimmt.

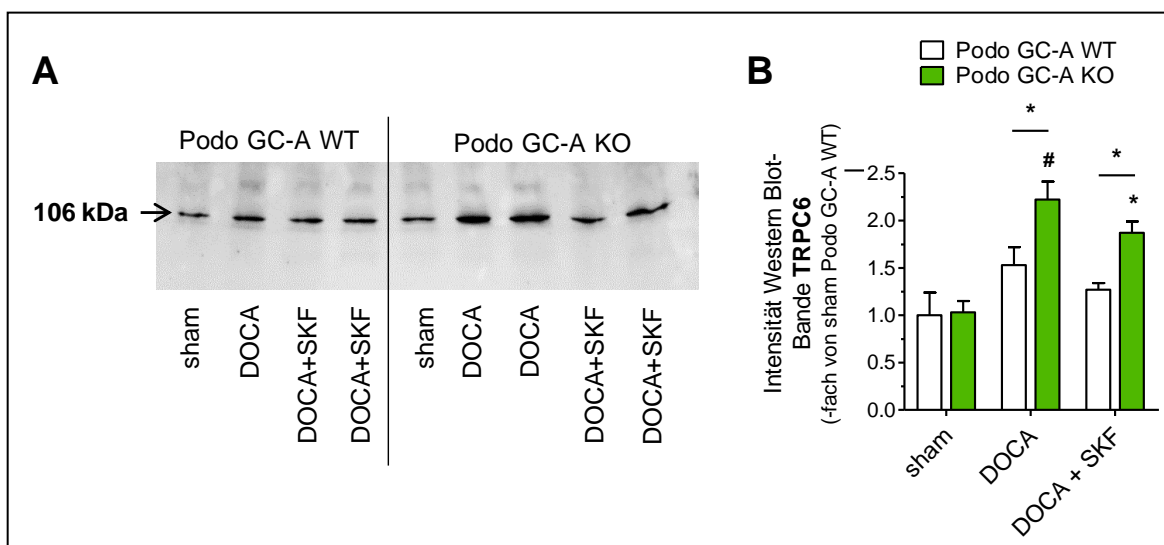


Abb. 5-28: Proteinexpression des TRPC6-Kanals in DOCA-behandelten Podo GC-A KO und WT Mäusen. **A.** Western Blot der isolierten Glomeruli zur Detektion von TRPC6. **B.** Analyse der Intensität der TRPC6 Western Blot-Banden. * $p < 0,05$ vs. sham bzw. wie durch den Balken angezeigt; # $p < 0,001$ vs. sham desselben Genotyps

Die Western Blot-Analyse von TRPC6 (Abb. 5-28) zeigte eine signifikant erhöhte Proteinexpression in den Glomeruli von DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen im Vergleich zu sham Tieren des gleichen Genotyps und auch im Vergleich zu den Wildtyp-

Mäusen ($2,2 \pm 0,2$ -fach von sham Podo GC-A WT vs. $1,5 \pm 0,2$ -fach von sham Podo GC-A WT; $p < 0,05$). Die TRPC6-Proteinexpression wurde durch die simultane Gabe von SKF 96365 nicht signifikant beeinflusst.

Wie auch im Versuch zuvor wurden die Nierenfunktion und hämodynamische Parameter in DOCA-behandelten Podo GC-A KO und WT untersucht und mit den unbehandelten (sham) Tieren des gleichen Genotyps verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 5-3 aufgelistet und in Abb. 5-29 graphisch dargestellt.

Parameter	Podo GC-A WT			Podo GC-A KO		
	sham	DOCA	DOCA + SKF	sham	DOCA	DOCA + SKF
MAD [mmHg]	72 ± 3 (n=5)	89 ± 2* (n=5)	86 ± 4* (n=6)	75 ± 2 (n=5)	88 ± 5* (n=6)	85 ± 3* (n=7)
skGFR [µl / min. / g KGW]	7,7 ± 0,3 (n=5)	14,4 ± 1,6* (n=5)	15,6 ± 1,2* (n=6)	7,7 ± 0,7 (n=5)	12,8 ± 0,6* (n=6)	13,6 ± 0,5* (n=7)
Plasma-ANP-Konz. [pMol / L]	70,3 ± 8,6 (n=5)	113,2 ± 15,6* (n=5)	125,7 ± 6,6* (n=6)	65,8 ± 7,5 (n=5)	107,7 ± 10,4* (n=6)	111,7 ± 11,1* (n=7)
Plasma-BNP-Konz. [pMol / L]	47,1 ± 12,0 (n=5)	64,6 ± 11,4 (n=5)	73,6 ± 17,5 (n=6)	43,6 ± 9,7 (n=5)	74,5 ± 14,1 (n=6)	76,8 ± 13,5 (n=7)
Feuchtgewicht rechte Niere [mg / g KGW]	10,1 ± 0,7 (n=5)	14,5 ± 0,2* (n=5)	15,4 ± 0,7* (n=6)	10,1 ± 0,7 (n=5)	14,6 ± 0,3* (n=6)	13,8 ± 0,8* (n=7)

Tabelle 5-3: Physiologische Parameter von Podo GC-A KO und WT Mäusen ohne (sham) und nach zweiwöchiger DOCA- und DOCA + SKF-Behandlung. * $p < 0,05$ vs. sham

Wie im sechswöchigen Versuch entwickelten sowohl die Podo GC-A KO als auch die Podo GC-A WT Mäuse innerhalb der zweiwöchigen DOCA-Behandlung eine mäßige Hypertonie, eine renale Hypertrophie sowie eine gesteigerte GFR. Die Plasma-Konzentrationen der natriuretischen Peptide ANP und BNP waren erhöht, wenn auch bei BNP nicht statistisch signifikant. Die parallele Behandlung mit dem TRPC-Kanal-Blocker SKF 96365 zeigte keine Veränderung dieser Parameter.

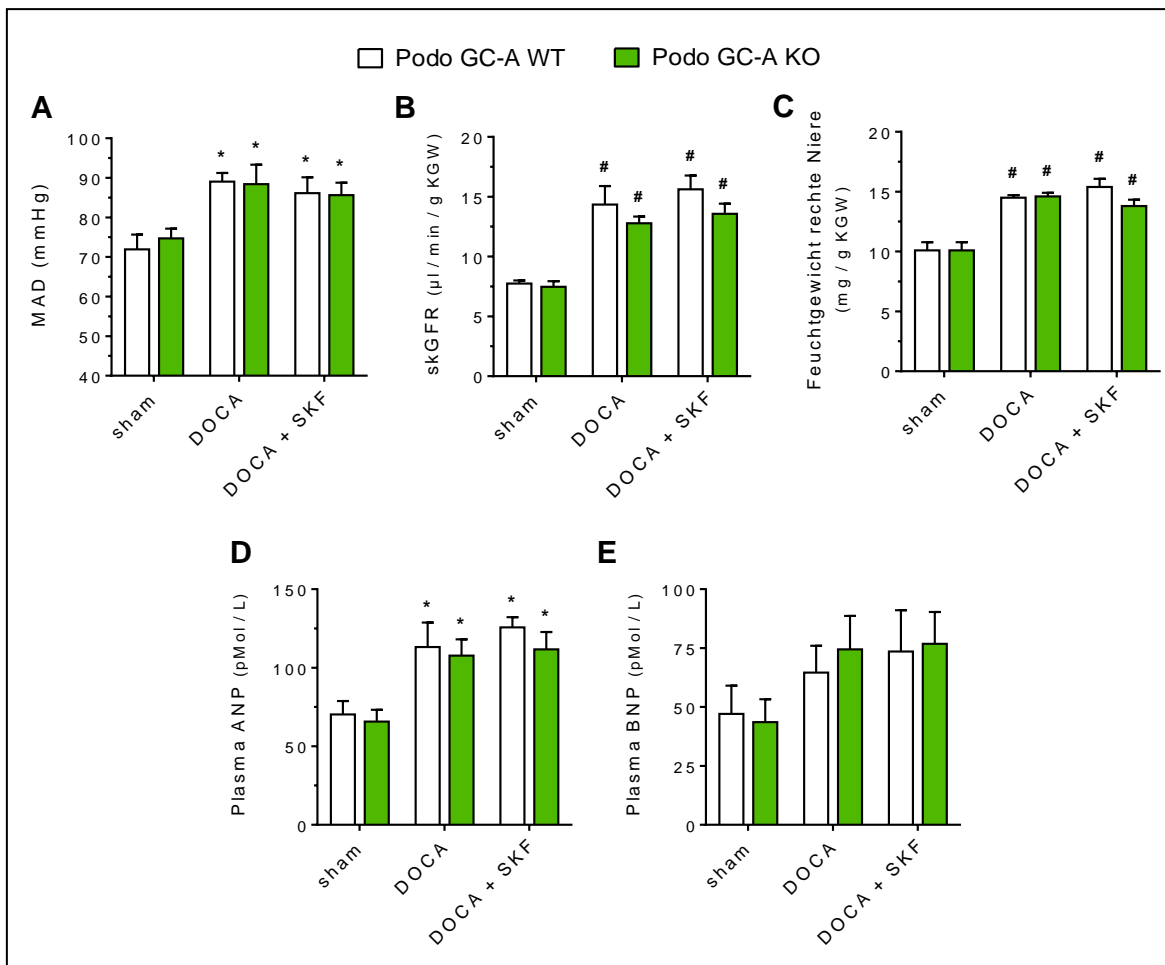


Abb. 5-29: Hämodynamische und renale Parameter in Podo GC-A KO und WT Mäusen ohne und nach zweiwöchiger DOCA- und SKF-Behandlung. **A.** Mittlerer arterieller Blutdruck (MAD), gemessen in der Aorta der anästhesierten Versuchstiere. **B.** Einzelniere-GFR (skGFR) der DOCA-behandelten Tiere mit und ohne gleichzeitige Behandlung mit SKF, verglichen mit der skGFR von unbehandelten Tieren (sham; die skGFR wurde hier durch Halbieren der GFR berechnet).

C. Feuchtwicht der rechten Nieren. **D** und **E.** Plasmakonzentrationen der kardialen natriuretischen Peptide ANP und BNP. * $p < 0,05$ vs. sham; # $p < 0,001$ vs. sham

Bei der Untersuchung der Albumin-Exkretion im Spontanurin (Abb. 5-30) stellte sich heraus, dass die DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäuse schon innerhalb der ersten sechs Tage der DOCA-Behandlung eine ausgeprägte Albuminurie entwickelten (100-fach vs. basal), die sich im weiteren Verlauf der Behandlung verstärkte (170-fach vs. basal am zwölften Tag der Behandlung). Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den DOCA-behandelten Podo GC-A WT Mäusen nur moderate Veränderungen des Albumin-Gehalts im Urin (Tag 6: 28-fach vs. basal, Tag 12: 35-fach vs. basal).

Die parallele Gabe des TRPC-Kanal-Blockers SKF 96365 reduzierte die Albuminurie in Podo GC-A KO Mäusen um etwa 75%. Das weist darauf hin, dass die Blockade der TRPC-Kanäle deutlich zur Verminderung einer DOCA-bedingten Albuminurie in Podo GC-A KO Mäusen beiträgt.

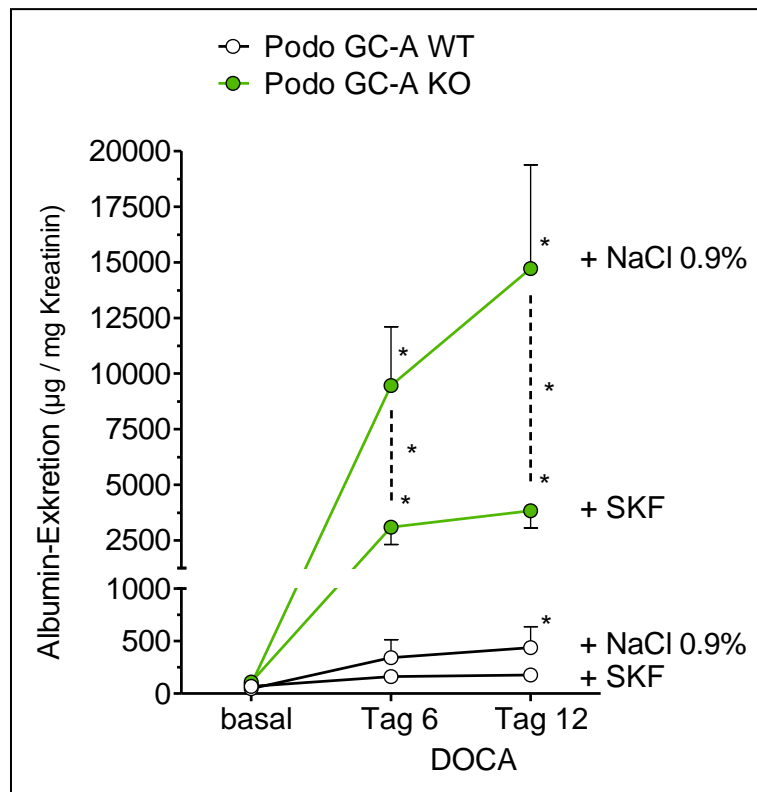


Abb. 5-30: Albumin-Exkretion in Spontanurinproben von Podo GC-A KO und WT Mäusen im Verlauf einer zweiwöchigen DOCA-Behandlung mit und ohne paralleler Applikation von SKF. * $p < 0,01$ vs. basal

Die Untersuchung der Nierenschnitte bestätigte die positive Wirkung der SKF-Applikation in den DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen. Wie in Abb. 5-31 B zu sehen ist, führte die zweiwöchige DOCA-Behandlung in den Podo GC-A KO Mäusen zu einer merklichen Hypertrophie der Glomeruli (3977 ± 233 (sham) vs. 5518 ± 281 (DOCA) μm^2 ; $p < 0,05$ DOCA vs. sham), während die glomeruläre Fläche in den DOCA-behandelten Wildtypen nur marginal zunahm (3773 ± 298 (sham) vs. 4348 ± 228 (DOCA) μm^2 ; * $p < 0,05$ DOCA-behandelte KO vs. WT). Die Applikation von SKF zeigte keine deutliche Auswirkung auf die Größe der Glomeruli.

Schon innerhalb der zweiwöchigen DOCA-Behandlung trat in den Podo GC-A KO Mäusen eine massive Schädigung der Glomeruli auf, einhergehend mit einer deutlichen Expansion des intraglomerulären Mesangiums (Abb. 5-31 A und C). Diese war im Vergleich zu den DOCA-behandelten Podo GC-A WT Mäusen fast 3-fach verstärkt (2737 ± 178 (KO) vs. 1070 ± 129 μm^2 (WT), $p < 0,001$). Die Podo GC-A KO Mäuse, die zusätzlich eine tägliche Injektion des TRPC-Blockers SKF erhielten, wiesen eine merklich geringere Schädigung der Glomeruli mit einer - verglichen mit den Podo GC-A KO Tieren, die kein SKF erhielten - deutlich verminderten Ausweitung des mesangialen Gewebes auf (Abb. 5-31 C: 1742 ± 149 (DOCA + SKF) vs. 2737 ± 178 (DOCA) μm^2 ; $p < 0,05$).

Auch die DOCA-behandelten Podo GC-A WT Mäuse zeigten eine Proliferation der mesangialen Matrix in den Glomeruli, die jedoch deutlich geringer war als in den Podo GC-A KO Mäusen und die nicht durch die Applikation von SKF beeinflusst wurde.

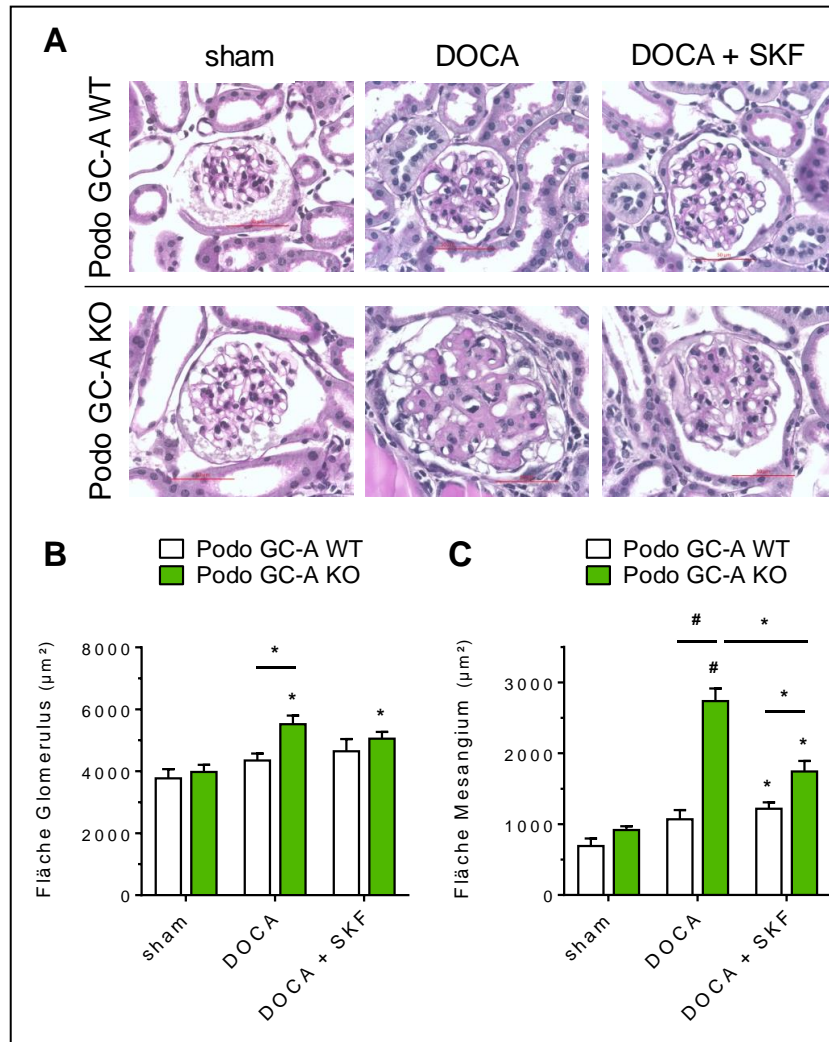


Abb. 5-31: Verminderung der mesangialen Expansion durch Applikation von SKF 96365 in DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen. **A.** PAS-Färbung der Nierenschnitte von DOCA-behandelten Podo GC-A WT (obere Reihe) und KO Mäusen (untere Reihe) mit (rechts) und ohne (mittig) gleichzeitige SKF-Applikation, verglichen mit unbehandelten (sham) Mäusen des gleichen Genotyps (links). **B.** Analyse der glomerulären Fläche. **C.** Analyse des intraglomerulären Mesangiums. * $p < 0,05$ vs. sham bzw. wie durch den Balken angezeigt, # $p < 0,001$ vs. sham bzw. wie durch den Balken angezeigt

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Podozyten zeigte normal aussehende, leicht verbreiterte Fußfortsätze in den Nieren der 2 Wochen mit DOCA behandelten Podo GC-A WT Mäuse (Abb. 5-32 A, oben mittig). Im Gegensatz dazu führte auch die Kurzzeitbehandlung mit DOCA in den Podo GC-A KO Mäusen zu einer gravierenden Schädigung der Podozyten, die mit dem Verschmelzen und Ablösen der Fußfortsätze

einherging (Abb. 5-32 A, unten mittig). Die Fußfortsätze der Podozyten der Knockout-Mäuse waren fast dreimal so breit wie die der Wildtypen (Abb. 5-32 B: 642 ± 88 nm (KO DOCA) vs. 246 ± 17 nm (WT DOCA); $p < 0,001$). Außerdem war, wie auch im Versuch zuvor, die Basalmembran in den Glomeruli dieser Tiere stark verdickt.

In den Knockout-Tieren, die eine begleitende Behandlung mit SKF erhielten, konnte eine deutlich geringere Schädigung der Podozyten registriert werden. Die Fußfortsatzbreite der DOCA / SKF-behandelten Tiere war zwar immer noch größer als die der Wildtypen, aber im Vergleich zu den Podo GC-A KO Tieren, die den TRPC-Blocker nicht erhielten, war sie signifikant reduziert (Abb. 5-32 B: 332 ± 15 nm (KO DOCA + SKF); $p < 0,05$ vs. KO DOCA).

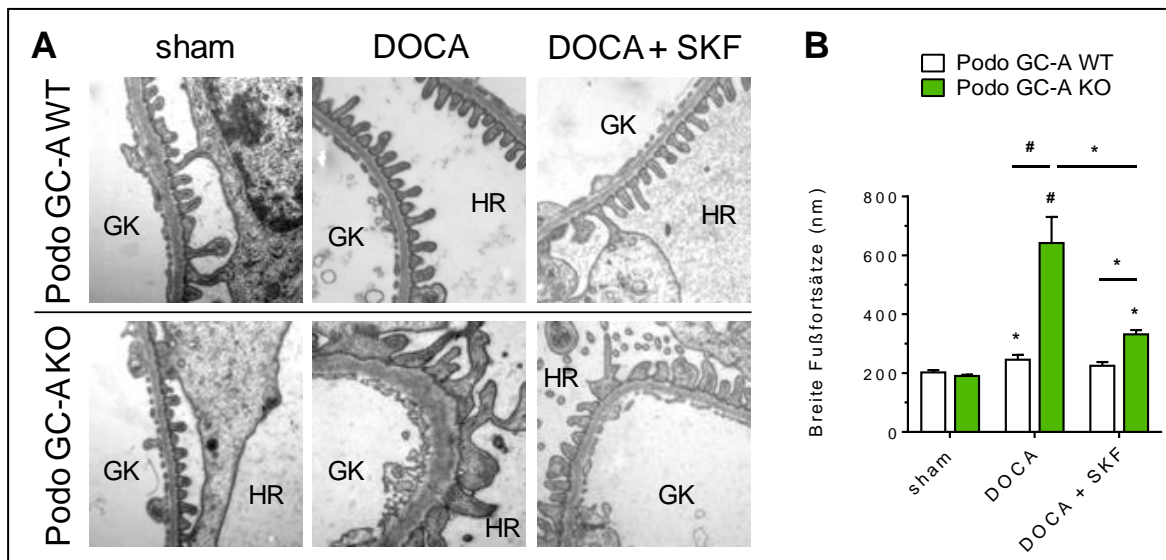


Abb. 5-32: Verminderung der Podozyten-Schädigung in DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen durch simultane Verabreichung von SKF 96365. **A.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der podozytären Fußfortsätze von DOCA-behandelten Podo GC-A WT (obere Reihe) und KO Mäusen (untere Reihe). GK: Lumen der glomerulären Kapillaren. HR: Harnraum. Vergrößerung: 20000-fach. **B.** Analyse der Breite der podozytären Fußfortsätze in unbehandelten (sham) und DOCA-behandelten Podo GC-A KO und WT Mäusen ohne (DOCA) oder mit zusätzlicher Applikation von SKF 96365 (DOCA + SKF). * $p < 0,05$ vs. sham bzw. wie durch den Balken angezeigt, # $p < 0,001$ vs. sham bzw. wie durch den Balken angezeigt

Die Expression des Schlitzmembranproteins Podocin war in den Mäusen mit podozytenspezifischer Deletion der GC-A schon nach zweiwöchiger DOCA-Behandlung leicht, aber signifikant verringert, während die DOCA-behandelten Wildtypen das Protein normal exprimierten (Abb. 5-33 A bis D). Eine begleitende Behandlung der Knockout-Mäuse mit SKF 96365 führte zum Erhalt einer physiologischen Podocin-Expression. Dies zeigte sich durch die höhere Fluoreszenzdichte in den Glomeruli der DOCA / SKF-

behandelten Podo GC-A KO Mäuse (Abb. 5-33 A und B) und konnte zusätzlich durch die Western-Blot-Analyse bestätigt werden (Abb. 5-33 C und D).

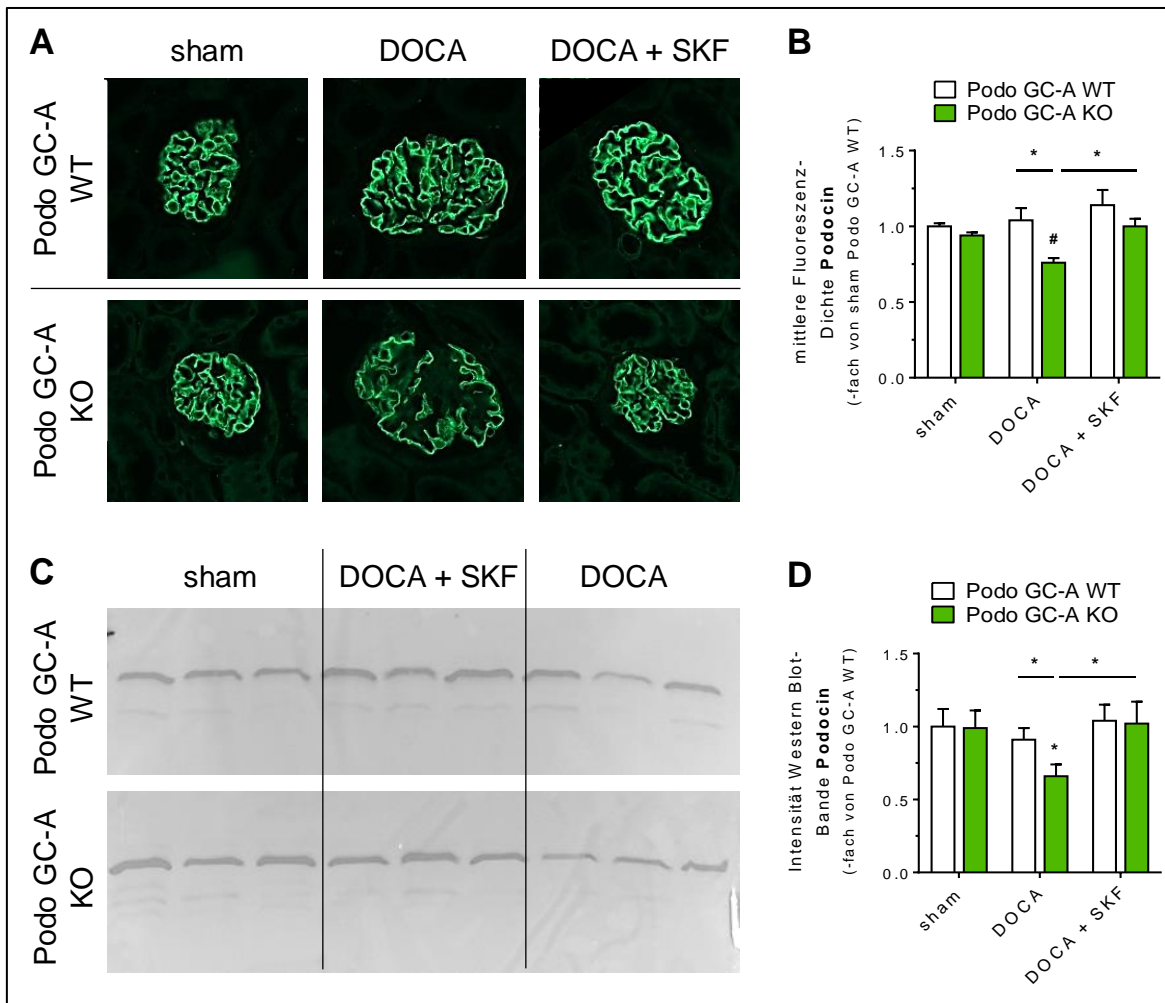


Abb. 5-33: Erhalt des Schlitzmembranproteins Podocin in DOCA / SKF-behandelten Podo GC-A KO Glomeruli. **A.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Glomeruli nach Färbung mit dem primären Podocin-Antikörper und dem sekundären Cy2-konjugierten Antikörper. **B.** Analyse der anti-Podocin-Fluoreszenzdichte. **C.** Podocin-Western Blot. **D.** Intensitäts-Analyse der Western Blot-Banden. * $p < 0,05$ vs. sham oder wie durch den Balken angezeigt

Die Zahl der Podozyten war in den DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen wie im sechswöchigen Versuch im Vergleich zu den gleich behandelten Wildtypen erniedrigt (Abb. 5-34). Die gleichzeitige Behandlung der Tiere mit SKF 96365 konnte den Verlust der Podozyten, wenn auch nicht statistisch signifikant, vermindern.

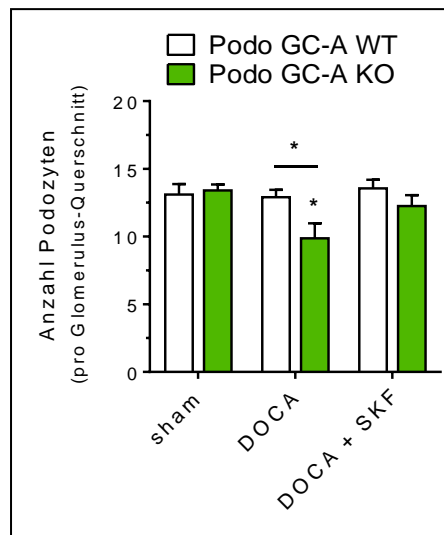


Abb. 5-34: Die Applikation von SKF führt zum Erhalt der Podozyten in DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen. Abgebildet ist die Zahl der Podozyten pro Glomerulus-Querschnitt in unbehandelten (sham) und DOCA- bzw. DOCA+SKF-behandelten Podo GC-A KO und WT Mäusen. * $p < 0,05$ vs. sham bzw. wie durch den Balken angezeigt

Bereits innerhalb der zweiwöchigen DOCA-Applikation zeigten die Podo GC-A KO Mäuse Anzeichen von oxidativem Stress. Das ROS-Marker-Protein 4-HNE war sowohl gegenüber den unbehandelten Tieren beider Genotypen als auch den ebenso mit DOCA behandelten Wildtyp-Mäusen stark erhöht, wie in den Immunfluoreszenzfärbungen deutlich zu sehen ist (Abb. 5-35 A).

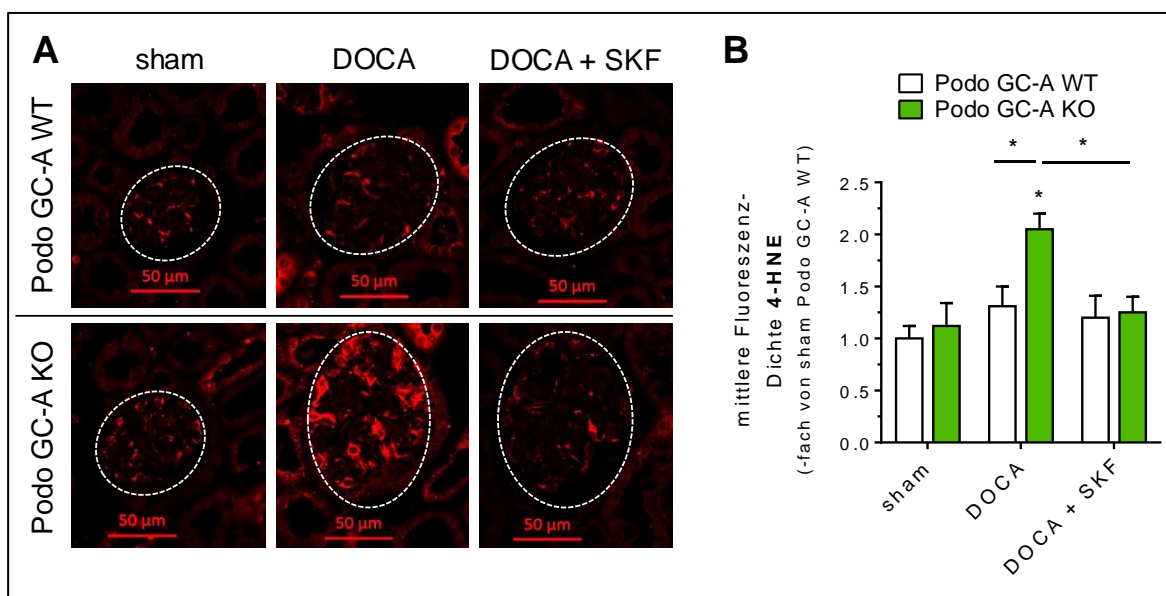


Abb. 5-35: SKF-Behandlung führt zu geringen Spiegeln des ROS-Marker-Proteins 4-HNE in den Glomeruli der Podo GC-A KO Mäuse. **A.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Glomeruli nach Färbung mit dem primären 4-HNE-Antikörper und dem sekundären TRITC-konjugierten Antikörper. **B.** Analyse der 4-HNE-Fluoreszenzdichte in den Glomeruli. * $p < 0,05$ vs. sham bzw. wie durch den Balken angezeigt

Die Analyse der Fluoreszenzdichte bestätigte die erhöhten Level von 4-HNE in den Glomeruli statistisch (Abb. 5-35 B: $p < 0,05$ vs. sham und vs. DOCA WT). In den SKF-behandelten Tieren waren die Spiegel von 4-HNE ähnlich derer in den unbehandelten Tieren, was auf eine geringe Belastung durch oxidativen Stress hindeutet.

Die Ergebnisse der SKF-Versuche zeigen einen deutlichen Einfluss des TRPC6-Kanals auf die Progression einer Nierenschädigung infolge der Behandlung mit dem Steroidhormon DOCA. Die durch die DOCA-Behandlung hervorgerufene Albuminurie konnte durch die Gabe des TRPC-Kanal-Blockers SKF 96365 signifikant verbessert werden. Auch die Schädigung der Glomeruli, angezeigt durch die erhöhte mesangiale Expansion und die vermehrte Expression von alphaSMA, konnte durch SKF vermindert werden. Das Verschmelzen und Ablösen der podozytären Fußfortsätze wurde durch die TRPC-Kanal-Blockade fast vollständig verhindert und die Bildung des ROS-Markers 4-Hydroxynonenal deutlich reduziert.

Die Ergebnisse der DOCA- und SKF-Versuche zeigen eine direkte nephroprotektive Wirkung der kardialen natriuretischen Peptide ANP und BNP, die sie durch die Aktivierung der GC-A im Podozyten entfalten. Hierbei ist eine Suppression des glomerulären TRPC6-Kanals durch die natriuretischen Peptide denkbar.

Die zu Beginn gestellten Fragen konnten im Rahmen dieses Projektes beantwortet werden:

- I. Die Aktivierung der GC-A durch die natriuretischen Peptide im Podozyten hat keinen Einfluss auf die Regulation der glomerulären Filtrationsrate.
- II. Die nephroprotektive Wirkung der kardialen natriuretischen Peptide ANP und BNP resultiert aus einer direkten protektiven Wirkung auf die Integrität der Podozyten, die sehr wahrscheinlich auf einer Suppression des TRPC6-Kanals in Podozyten beruht.

6 Diskussion

6.1 Regulation der GFR durch die natriuretischen Peptide über die Aktivierung der GC-A in Podozyten

Die kardialen natriuretischen Peptide ANP und BNP spielen eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung des Flüssigkeitsgleichgewichts und die Regulierung des Blutdrucks. In der Niere induzieren sie nicht nur eine Diurese und Natriurese, sondern steigern auch die glomeruläre Filtrationsrate.

Schon frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass der Rezeptor für die natriuretischen Peptide ANP und BNP, die Guanylatzyklase A, nicht nur im Tubulussystem exprimiert wird, wo man sie aufgrund der natriuretischen Effekte auch erwarten würde, sondern auch im Glomerulus. Hier konnte die GC-A in den afferenten und efferenten Arteriolen¹³⁵⁻¹³⁷, Mesangialzellen^{138,139} und auch den Podozyten^{64,139,140} nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die signifikante glomeruläre Expression der GC-A und zeigen erstmals, dass die höchste mRNA Abundanz im Glomerulus in den Podozyten zu finden ist. Dieser etwas unerwartete Befund war der Startpunkt zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der natriuretischen Peptide auf die Podozytenfunktion. Basierend auf Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die gezeigt hatten, dass ANP die GFR über eine Erhöhung des Filtrationskoeffizienten steigert^{268,269} wurde als erste Arbeitshypothese überprüft, ob die natriuretischen Peptide die GFR über die Aktivierung der GC-A in den Podozyten reguliert. Die Ergebnisse der Experimente an Mäusen mit podozytenspezifischer Deletion der GC-A (Podo GC-A KO) weisen jedoch klar darauf hin, dass diese klassischen renalen Wirkungen der natriuretischen Peptide, also die Regulation der GFR und Natriurese, nicht durch einen Effekt an den Podozyten vermittelt werden. Podo GC-A KO Mäuse haben eine normale GFR und Natrium-Exkretion unter Kontrollbedingungen (gemessen an der wachen Maus). Auch der Verlust von funktionsfähigem Nierengewebe, der bei Wildtyp-Mäusen zu einem Anstieg der GFR führt, und die akute Infusion von BNP in anästhesierten Mäusen führte zu einem unverzüglichen Anstieg der GFR und der Wasser- und Natrium-Ausscheidung, die sich nicht von der in Mäusen mit einer intakten GC-A Signalkaskade in den Podozyten unterschied. All diese renalen Effekte blieben in konventionellen GC-A KO Mäusen mit einer globalen Deletion der GC-A vollständig aus, was darauf hinweist, dass ANP und BNP die Nierenfunktion ausschließlich über die Aktivierung dieses Rezeptors regulieren, jedoch nicht in den Podozyten. Dementsprechend müssen hier andere Zellen die Zielstrukturen der natriuretischen Peptide sein. Diese klare Schlussfolgerung kann man nur unter der Voraussetzung ziehen, dass die angewendete Cre-LoxP-Technik tatsächlich

zu einer deutlichen Reduktion der GC-A Expression geführt hatte. Da die mRNA-Expression der GC-A in den Podozyten der Podo GC-A KO Mäuse auf unter 1% des Expressionslevels der Wildtypgeschwister reduziert war und zudem im zweiten Teil der Arbeit deutliche Effekte in den Podo GC-A KO Tieren nachweisbar waren, ist in der Tat von einer funktionell relevanten Reduktion der GC-A Expression auszugehen.

Wie bereits erwähnt ist die GC-A entlang des gesamten Nephrons in Zellen exprimiert, die an der Regulation der GFR und der Natriurese beteiligt sind¹³³⁻¹³⁶. Hierbei ist es wahrscheinlich, dass die Natrium-Ausscheidung durch andere zelluläre Mechanismen reguliert wird als die GFR. Roy et al. zeigten z.B. in einer Mikropunktionsstudie der Henle-Schleife im Rattenmodell, dass ANP die Natriurese unabhängig von der GFR beeinflusst. So führte die Infusion von ANP in einer Konzentration von 0,6 µg / h / 100 g KGW zu einer zehnfachen Zunahme der Natriurese, die Einzel-Nephron-GFR blieb aber im gleichen Zeitraum völlig unverändert²⁷⁰.

Winaver et al. zeigten schon im Jahr 1990 die Inhibierung des Na⁺ / H⁺-Antiporters im proximalen Tubulus durch die Infusion von ANP in anästhesierte Kaninchen¹⁸⁸. Auch eine Hemmung der basolateral verankerten Na⁺ / K⁺-ATPase wurde gezeigt¹⁸⁹. Im distalen Tubulus konnten Nonoguchi et al. eine cGMP- und cGK-abhängige Hemmung des Chlorid-Transports nachweisen¹⁹², die Ortiz et al. auf eine Inhibierung des NKCC2-Symporters zurückführten¹⁹³. Das medulläre Sammelrohr gilt als der Hauptwirkort der kardialen natriuretischen Peptide^{187,271}. Auch hier findet die Regulation der Natrium-Ausscheidung über eine Hemmung der Na⁺ / K⁺-ATPase über die cGKII-induzierte Phosphorylierung in den Hauptzellen statt¹⁹⁴. Zudem konnte eine Inhibierung des epithelialen Natriumkanals (ENaC)¹⁹⁵ und der CNG-Kanäle¹⁹⁷ gezeigt werden. Weiterhin hemmen ANP und BNP die Vasopressin-induzierte Phosphorylierung der Aquaporin-2-Kanäle im Sammelrohr und modulieren dadurch den transepithelialen Wassertransport¹⁹⁶.

Dementsprechend ist es nachzuvollziehen, dass die Aktivierung der GC-A im Podozyten für die natriuretische Wirkung von ANP und BNP verzichtbar ist.

Die Regulation der glomerulären Filtrationsrate durch die kardialen natriuretischen Peptide scheint etwas komplexer zu sein. Wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, wird die GFR durch den Nettofiltrationsdruck und Filtrationskoeffizienten bestimmt, die wiederum durch Änderungen des hydrostatischen und onkotischen Druck in den Kapillaren und der Bowman-Kapsel sowie durch die osmotische Wasserpermeabilität und die Filtrationsfläche beeinflusst werden. Die Guanylatzyklase A ist in allen hierfür relevanten Zellen exprimiert (siehe oben) und die GFR-steigernde Wirkung wurde in diversen Studien beschrieben^{116,136,183-185}. Abb. 6-1 zeigt eine Übersicht der Mechanismen, die hierbei eine Rolle spielen könnten.

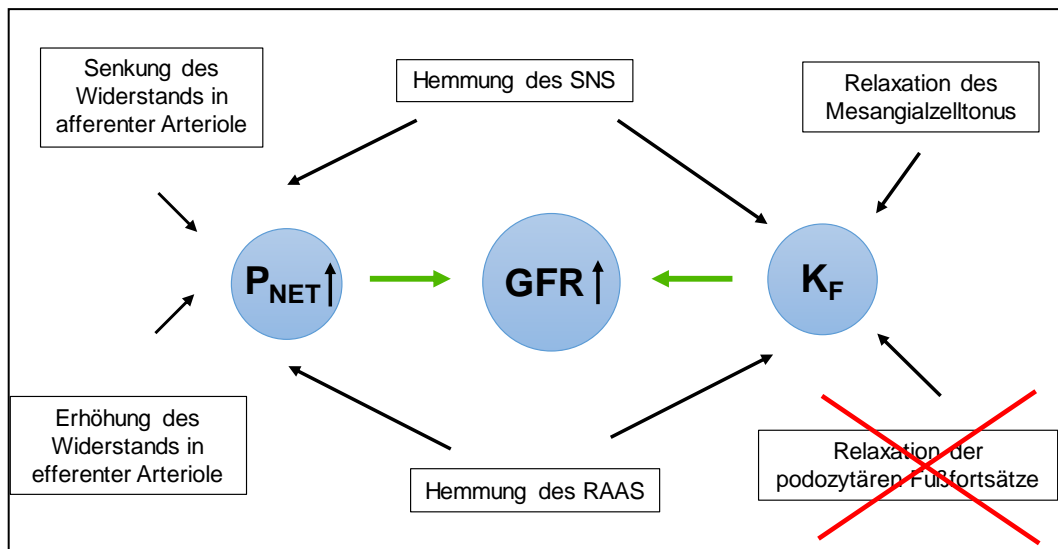


Abb. 6-1: Mögliche Mechanismen der GFR-Steigerung durch die natriuretischen Peptide

Die Podozyten umschließen die glomerulären Kapillaren und bedecken die Filtrationsfläche von außen. Da sie durch ihre kontraktile Eigenschaften und der damit einhergehenden Flexibilität dem Kapillardruck entgegenwirken^{22,25,57}, wurde über eine Involvierung der Podozyten in die Regulation der glomerulären Filtrationsrate durch die Modulation des Kapillartonus und des Filtrationskoeffizienten spekuliert. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch zeigen, spielen die Podozyten hier, zumindest für die Steigerung der GFR durch die natriuretische Peptide, keine nachweisbare Rolle.

Da die GC-A auch in den glomerulären Mesangialzellen exprimiert ist^{138,139} stellen diese Zellen einen weiteren Angriffspunkt der kardialen natriuretischen Peptide dar. Wie glatte Muskelzellen zeigen auch die Zellen des Mesangiums kontraktile Eigenschaften^{138,272} und einige Studien deuten darauf hin, dass sie durch die Modulation der Filtrationsfläche in die Regulation der GFR eingreifen²⁷³.

Die Aktivierung der GC-A in den glatten Gefäßmuskelzellen der afferenten und efferenten Arteriole scheint von wesentlicher Bedeutung für die Kontrolle der GFR durch die NP zu sein. Schon im Jahr 1986 zeigten Dunn et al. an anästhesierten Ratten, dass ANP den hydrostatischen Druck in den glomerulären Kapillaren (P_{GK}) durch die Dilatation der afferenten und die Konstriktion der efferenten Arteriole erhöht¹³⁶. Die Befunde wurden durch Marin-Gretz et al. im gleichen Jahr bestätigt¹³⁵. Diese Wirkung könnte durch ANP und BNP nicht nur direkt, sondern auch indirekt durch die Hemmung des RAAS und des SNS vermittelt werden. So verhindert ANP die Bildung des Vasokonstriktors Angiotensin II (ANG II) durch die Inhibierung der Renin-Sekretion in den juxtaglomerulären Zellen¹³³. Der AT_1 -Rezeptor ist sowohl in der afferenten, als auch in der efferenten Arteriole

exprimiert²⁷⁴. Blantz et al. zeigten zudem, dass ANG II den Filtrationskoeffizienten senkt²⁷⁵. Somit könnten die natriuretischen Peptide durch die Hemmung der ANGII-Bildung indirekt sowohl P_{NET} als auch K_F modulieren. Weiterhin konnten Awazu et al. an isolierten Glomeruli denervierter Rattennieren den hemmenden Einfluss von ANP auf die vasokonstriktorisches und K_F -senkenden Effekte des Sympathikotonus feststellen²⁷⁶.

Diese Studien zeigen gute Ansatzpunkte zu den Mechanismen der GFR-Regulierung durch die natriuretischen Peptide, deren Aufklärung allerdings noch weiterer Forschungsarbeit bedarf.

6.2 Nephroprotektive Wirkung der kardialen natriuretischen Peptide

Neben ihren klassischen Wirkungen zeigen die kardialen natriuretischen Peptide auch nephroprotektive Effekte. Während die Deletion ihres gemeinsamen Rezeptors GC-A unter pathophysiologischen Bedingungen zur Verstärkung einer Nierenschädigung führt, kann diese durch die Überexpression oder Infusion von ANP oder BNP merklich verbessert werden, was in verschiedenen Studien am Tiermodell und in klinischen Studien bewiesen wurde. So konnten z.B. die nephrotoxischen Wirkungen des Chemotherapeutikums Cisplatin im Mausmodell durch die gleichzeitige Applikation von ANP abgeschwächt werden²⁷⁷. Kasahara et al. zeigten an transgenen Mäusen, die einer subtotalen Nephrektomie unterzogen wurden, dass die Überexpression von BNP in der Leber zu einer verringerten mesangialen Expansion im Glomerulus und zu einer reduzierten Albuminurie führte²²⁰. Diese Ergebnisse konnten von derselben Arbeitsgruppe auch anhand von anderen Krankheitsmodellen, wie der diabetischen Nephropathie²⁷⁸ und der immunvermittelten proliferativen Glomerulonephritis²⁷⁹ bestätigt werden. Nikishimi et al. zeigten im Jahr 2009 am Mausmodell, dass die Infusion von ANP die im Zuge der unilateralen Ureterobstruktion auftretende renale Fibrose merklich verbesserte²²¹. Bei Patienten, die eine chirurgische Maßnahme am Herzen erhielten, war der Serum-Kreatinin-Wert merklich reduziert, wenn sie während der Operation eine ANP-Infusion erhielten und dieser positive Effekt hielt bis zu ein Jahr nach der OP an²²⁷. Zudem wurden durch die perioperative Infusion der natriuretischen Peptide die GFR und die Urinausscheidung erhöht. Dementsprechend konnte die Gabe von Diuretika nach der OP reduziert und der Krankenhausaufenthalt der Patienten verkürzt werden. Es traten weniger Arrhythmien auf und die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie sank deutlich²²⁶.

Wie die natriuretischen Peptide ihre nephroprotektiven Wirkungen entfalten, ist derzeit noch unklar. ANP und BNP senken den arteriellen Blutdruck, unterdrücken die Freisetzung vasokonstriktorischer Hormone wie Angiotensin II und Aldosteron, und inhibieren das sympathische Nervensystem. Alle eben genannten Parameter haben, sofern sie im Übermaß vorhanden sind, schädliche Wirkungen auf die Nieren. Zum Beispiel führt die übermäßige Produktion und Sekretion von Aldosteron, wie es zum Beispiel beim primären Hyperaldosteronismus der Fall ist, zu Bluthochdruck durch eine gesteigerte Na^+ - und H_2O -Retention in den Sammelrohren, Hypokaliämie und metabolischer Alkalose²⁸⁰. Zudem zeigen Patienten, die unter der Krankheit leiden, ein erhöhtes Risiko für Herz- und Nierenerkrankungen^{281,282}.

Dementsprechend ist die Annahme plausibel, dass die kardialen natriuretischen Peptide ihre nephroprotektive Wirkung durch die Suppression dieser krankheitsfördernden, systemischen Faktoren vermitteln.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen hingegen zum ersten Mal einen anderen, direkten zellulären Ansatz der nephroprotektiven Wirkung der natriuretischen Peptide. Über die Aktivierung des GC-A / cGMP-Signalweges in den Podozyten schützen sie diese vor Funktionsverlust und morphologischer Schädigung, zumindest im Rahmen der durch das Mineralokortikoid DOCA hervorgerufenen Hypertension. Diese Schlussfolgerung stimmt mit der kürzlich von Ogawa et al. erhobenen Studie überein, in der die Exposition mit Aldosteron zu einer verstärkten Albuminurie und Nierenschädigung führte¹⁴⁴. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden in dieser Studie jedoch konventionelle GC-A KO Mäuse verwendet, die durch die globale Deletion der GC-A schon unter Kontrollbedingungen eine deutliche Hypertonie aufweisen¹⁴⁴. Der Grad der Nierenschädigung und der Albuminurie war in der genannten Studie an konventionellen und in der vorliegenden Untersuchung an podozytenspezifischen GC-A KO Mäusen interessanterweise sehr ähnlich, was zeigt, dass der maßgebliche nephroprotektive Effekt der kardialen natriuretischen Peptide direkt durch die Aktivierung der GC-A im Podozyten vermittelt wird. Indirekt vermittelte, hämodynamische und neurohormonale, also systemische Effekte der NP / GC-A / cGMP-Signalkaskade scheinen eine untergeordnete Rolle in diesem Prozess zu spielen. Einschränkend muss hier allerdings erwähnt werden, dass die beiden Mausmodelle sich in mehreren Punkten, die das Ausmaß der Proteinurie unabhängig vom Verlust der GC-A beeinflussen könnten, unterscheiden. So war zum einen der genetische Hintergrund der Mäuse, der einen erheblichen Einfluss auf das Versuchsergebnis haben kann, nicht gleich. Zudem wurde in der Studie von Ogawa et al. Aldosteron und in der vorliegenden Arbeit der Aldosteron-Präkursor DOCA verwendet. DOCA wird in der Nebennierenrinde aus Progesteron gebildet und durch die

11 β -Dehydrogenase in Corticosteron umgewandelt, aus dem nachfolgend Aldosteron durch die Aldosteronsynthese entsteht. Auch DOCA zeigt MR-Rezeptor-Aktivität, die allerdings nur ca. ein Zwanzigstel der von Aldosteron beträgt²⁸³. Die Hauptwirkung sollte dementsprechend durch die nachfolgende Synthese und Sekretion von Aldosteron verursacht werden. Ob dies wirklich der Fall ist, könnte anhand der Plasma-Konzentrationen in den behandelten Mäusen untersucht werden.

Zu den Schädigungsmechanismen der Podozyten im verwendeten Tiermodell gibt es verschiedene Theorien (Abb. 6-2). Die einseitige Entfernung einer Niere in Kombination mit DOCA und Hochsals kann die Podozyten entweder indirekt durch die begleitende arterielle Hypertonie, die deutliche glomeruläre Hyperfiltration oder direkt durch die Aktivierung des Mineralokortikoid-Rezeptors in den Podozyten beeinträchtigen. Die Expression des Rezeptors in den Podozyten wurde in der vorliegenden Arbeit wie auch in vorangegangenen Studien demonstriert und im Tiermodell sowie in kultivierten Podozyten konnte gezeigt werden, dass dessen Aktivierung durch Aldosteron oder Analoga zu gesteigertem oxidativem Stress führt^{144,284}. Des Weiteren verbesserte die systemische Applikation des Radikalfängers Tempol sowohl die Proteinurie als auch die Nierenschädigung in DOCA- oder Aldosteron-behandelten Tieren^{144,284}. Oxidativer Stress spielt eine wichtige Rolle in der Krankheitsentwicklung verschiedener renaler Erkrankungen²⁸⁵, z.B. durch die Aktivierung von MAP-Kinasen und die Induktion von Apoptose⁷³. Dazu konform zeigten auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Podozyten der DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäuse Zeichen von oxidativem Stress. Die reduzierte Expression der antioxidativ wirksamen NAD(P)H-Quinone-acceptor-Reduktase-1 (NQO-1) und die erhöhte Lipidperoxidation, erkennbar an dem erhöhten Spiegel von 4-Hydroxynonenal, wiesen auf ein Ungleichgewicht des Redox-Status der Zellen hin, was in den Podozyten der Kontrollmäuse nicht der Fall war.

Vorangegangene Studien zeigen, dass die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies Einfluss auf die Regulation von TRPC6 in den Podozyten hat, z.B. in Puromycin-Aminonucleosid-Nephritiden (PAN) und als Reaktion auf hohe Blut-Glucose-Level^{286,287}. Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen der ROS-Bildung und der Aktivierung von TRPC6 in Podozyten durch ATP und Angiotensin II hergestellt^{267,288}. TRPC6 ist ein calciumpermeabler Kationenkanal, der eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Podozytopathien durch die von ihm vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration spielt^{242,264,266,289-291}. Hierbei sind Rho-Kinasen wie RhoA mögliche Mediatoren des Umbaus des podozytären Zytoskeletts durch die Erhöhung der Anzahl der Stressfasern⁷⁵.

In der vorliegenden Arbeit war die Expression des TRPC6-Kanals in den Glomeruli und insbesondere auch in den Podozyten der DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäuse gegenüber den ebenso behandelten WT Mäusen wie auch den unbehandelten Mäusen deutlich erhöht. Auch die intrazelluläre Calcium-Konzentration wurde durch die Behandlung mit dem Mineralokortikoid in den Podozyten der Mäuse mit genetischer Deletion der GC-A im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen sichtlich gesteigert. Hierbei ist anzumerken, dass die funktionellen Experimente zum Calcium-Influx in Podozyten frisch isolierter Glomeruli in einem sehr frühen Stadium der Entwicklung der Nierenschädigung durchgeführt wurden (neun bis zwölf Tage nach Beginn der DOCA-Behandlung). Daraus lässt sich schließen, dass die Hochregulation von TRPC6 einen pathophysiologischen Einfluss hat und keine Begleiterscheinung oder Folge der Glomerulosklerose ist, die in den späteren Stadien der Krankheitsentwicklung auftritt.

Im Gegensatz zur TRPC6-Expression ist die Ausbildung der TRPC5-Kanals in beiden Genotypen weder unter Kontrollbedingungen noch infolge der DOCA-Behandlung verändert. Dieses Ergebnis stimmt mit einer erst kürzlich von Sonneveld et al. erhobenen Zellkultur-Studie überein, in der die Regulation der beiden Kanäle in den Podozyten infolge einer erhöhten Glucose-Exposition untersucht wurde. Auch die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine unterschiedliche Regulation von TRPC5 und TRPC6 in den Podozyten²⁹⁰.

Die durch ATP induzierte Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde durch die Zugabe des TRPC-Kanalblockers SKF 96365 unterbunden, was den funktionellen Effekt der erhöhten TRPC6-Expression auf die podozytäre Calcium-Regulation bestätigt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass SKF den TRPC6-Kanal nicht spezifisch blockiert, sondern auch inhibitorische Effekte auf andere TRPC-Kanäle, inklusive TRPC5, hat²⁹².

Auch eine Hemmung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle durch SKF 96365 wurde gezeigt²⁹³, wobei spannungsaktivierte Calcium-Kanäle für das Calcium-Signaling im Podozyten eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen⁶³. Insgesamt gibt es sieben Kanäle der TRPC-Familie, von denen die Expression von TRPC2, TRPC3, TRPC5 und TRPC6 in Podozyten nachgewiesen wurde^{54,294}.

Nichtsdestotrotz zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit deutlich, dass die Expression und Aktivität von Signalwegen, die den Calcium-Influx in die Podozyten beeinflussen, durch die Applikation von DOCA in Abwesenheit der NP / GC-A-Signalkaskade erhöht sind und zu gesteigerten intrazellulären Calcium-Konzentrationen führen. Darüber hinaus konnte zum ersten Mal die direkte Suppression des ATP-induzierten Calcium-Influx durch

das atriale natriuretische Peptid in den Podozyten gezeigt werden, was einen weiteren protektiven Einfluss auf die Podozyten haben könnte.

Auch in Kardiomyozyten schwächte ANP den durch ANG II vermittelten zytosolischen Calcium-Einstrom ab und die cGMP / cGKI-Signalkaskade inhibierte die TRPC6-Expression und -Aktivierung^{295,296}. Dazu passend wurde erst kürzlich eine Zellkultur-Studie erhoben, in der eine inhibitorische Rolle von cGMP auf den podozytären TRPC6-Kanal gezeigt werden konnte²⁹⁷.

Die schädigenden Effekte der gesteigerten intrazellulären Calcium-Konzentration im Podozyten werden, wie in der Einleitung bereits angesprochen, durch verschiedene nachfolgende Veränderungen vermittelt, z.B. durch die Aktivierung von Calcineurin, die Degradierung von Synaptopodin und die Desorganisation des Aktin-Zytoskeletts, sowie das Verschmelzen und Ablösen der podozytären Fußfortsätze und die Apoptose der Zellen^{264,298,299}. Dementsprechend wird angenommen, dass die Aufrechterhaltung der physiologischen $[Ca^{2+}]_i$ zu einer Verbesserung oder sogar Prävention der Podozytenschädigung führt. Wie die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, kann dies durch die Aktivierung podozytären GC-A erreicht werden. Hierbei scheinen ANP und BNP eine supprimierende Wirkung auf den TRPC6-Kanal zu haben.

Bestätigt wird dies mit Hilfe der Blockade der TRPC-Kanäle durch SKF 96365 *in vivo*, was zu einer deutlichen Verminderung der Effekte einer mehrwöchigen DOCA-Behandlung in den Podo GC-A KO Mäusen führt. So zeigte sich in diesen Tieren eine geringere Albuminausscheidung im Urin und eine Reduktion der Schädigung der Podozyten, vor allem des „Foot process effacement“ und der mesangialen Expansion. Darüber hinaus führte die Applikation von SKF zum Erhalt der Podocin-Expression und zur Verhinderung einer verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in den Podozyten der DOCA-behandelten Knockout-Mäuse. Das weist darauf hin, dass die erhöhte TRPC6-Expression und -Aktivität die Ursache und nicht die Folge des oxidativen Stresses in den Podozyten ist, in welchen die NP / GC-A-Signalkaskade unterdrückt wurde. Wie schon erwähnt ist SKF 96365 kein selektiver TRPC6-Inhibitor und darüber hinaus wird TRPC6 in zahlreichen Geweben wie z.B. in Blutgefäßen und im zentralen Nervensystem exprimiert³⁰⁰. Unsere *in vivo* Studie mit SKF 96365 lässt daher nicht den direkten Schluss zu, dass die beobachteten positiven Effekte von SKF 96365 auf einer Hemmung von TRPC6 in Podozyten beruhen. Sie wären auch durch unspezifische Blockade anderer Kanäle oder die Blockade der Kanäle in anderen Geweben erklärbar, die dann indirekt protektiv auf die Podozyten einwirken. Ein indirekter Effekt über eine Blutdrucksenkende Wirkung von SKF 96365 wäre aufgrund der Expression und Wirkung des Kanals im Kreislaufsystem durchaus vorstellbar. Dies konnte allerdings durch die Blutdruck-

messungen ausgeschlossen werden. Zum Nachweis eines direkten Effektes von TRPC6 im Podozyten wäre ein podozytenspezifisches TRPC6 / GC-A-Doppelknockout-Mausmodell geeignet, das weitere Einblicke in die Interaktionen der natriuretischen Peptide und dem TRPC6 geben könnte. Die Daten von Dietrich et al. an konventionellen TRPC6 Knockout-Mäusen deuten allerdings daraufhin, dass ein Verlust der TRPC6-Aktivität durch andere TRPC-Kanäle wie TRPC3 kompensiert werden könnte³⁰⁰.

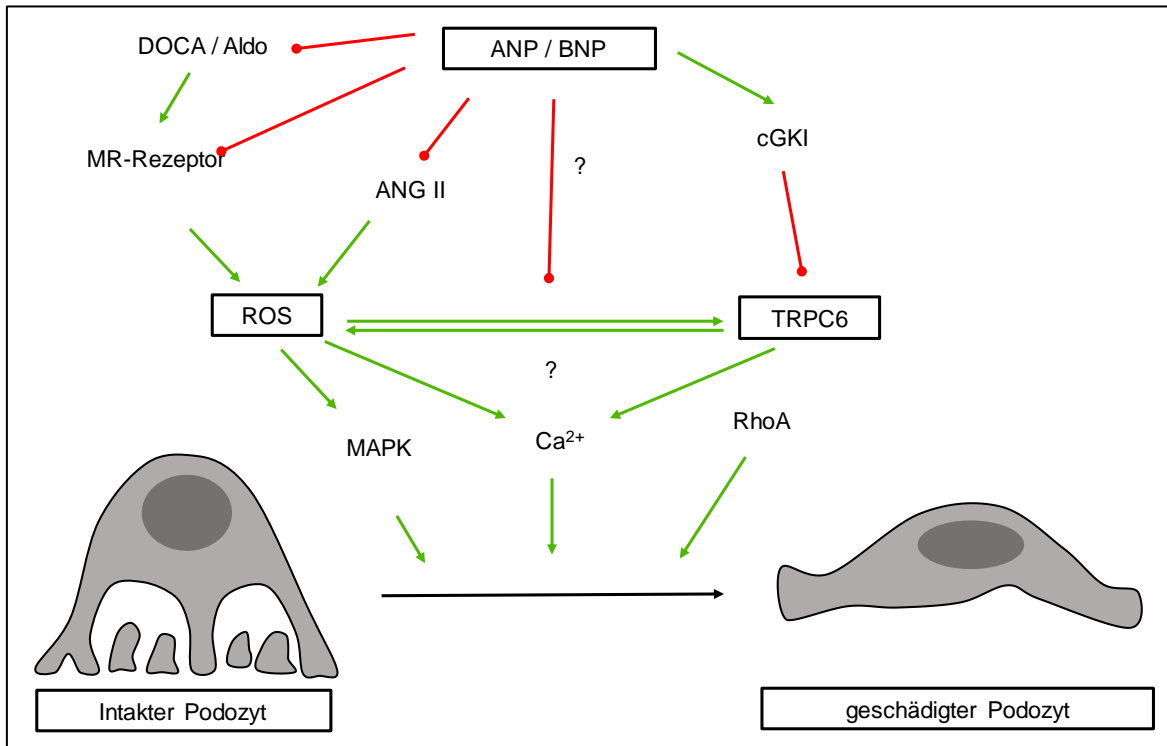


Abb. 6-2: Mögliche Schädigungsmechanismen im Podozyten und Angriffspunkte der kardialen natriuretischen Peptide. Quellen: siehe Fließtext.

Einige wenige Zellen der Podo GC-A KO Mäuse zeigten Anzeichen von Apoptose infolge der sechswöchigen Behandlung mit dem Aldosteron-Präkursor DOCA. Als Nachweis für das Vorliegen von Apoptose kamen dabei der TUNEL Assay, der fragmentierte DNA-Stränge im Zellkern apoptotischer Zellen nachweist sowie der immunhistochemische Nachweis von Caspase-3, einem Schlüsselenzym der Apoptosereaktion, zum Einsatz. Um zu überprüfen, ob die Podozyten von der Apoptose betroffen waren, wurde eine Co-Färbung mit dem Podozytenmarker Synaptopodin durchgeführt. Allerdings fand sich in keinem Fall eine Co-Färbung der Apoptosemarker mit Synaptopodin. Das heißt, dass es sich entweder um andere Zellen als Podozyten handelt (z.B. Mesangialzellen, die man mit einem spezifischen Antikörper, z.B. gegen Desmin³⁰¹ anfärben könnte) oder um Podozyten, die die Expression von Synaptopodin komplett eingestellt haben. Da die

Anzahl der apoptotischen Zellen infolge der sechswöchigen DOCA-Behandlung sehr gering war und nach zweiwöchiger DOCA-Applikation keine Anzeichen von Apoptose in den Glomeruli der Versuchstiere sichtbar waren, scheint dieser Mechanismus keine wesentliche Rolle in diesem Krankheitsmodell zu spielen.

6.3 Fazit

Zusammengefasst lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit schlussfolgern, dass die lokale Deletion der Guanylatzyklase A in den Podozyten keinen Einfluss auf die Regulation der Nierenfunktion unter Kontrollbedingungen und nach unilateraler Nephrektomie hat. Die fehlende Wirkung der kardialen natriuretischen Peptide im Podozyten führt jedoch zu einer massiven Schädigung der Glomeruli und renaler Fibrose, die mit einer extrem erhöhten Ausscheidung von Albumin im Urin einhergeht.

Somit zeigt die vorliegende Arbeit zum ersten Mal einen direkten nephroprotektiven Effekt der kardialen natriuretischen Peptide durch die Aktivierung ihres Rezeptors GC-A im Podozyten. Dieses wichtige Erkenntnis bildet die Basis für neue Therapiemöglichkeiten, so dass Arzneimittel wie „Entresto“ und Co. (siehe 3.3.6), die die Plasmaspiegel der natriuretischen Peptide erhöhen, nicht nur für kardiovaskuläre, sondern auch für renale Erkrankungen zugelassen werden könnten.

7 Quellenverzeichnis

- 1 Schnermann, J. B. & Sayegh, S. I. *Kidney Physiology*. 200 (Lippincott-Raven, 1998).
- 2 Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A. & Silbernagl, S. *Physiologie*. 6th edn, (Georg Thieme Verlag, 2009).
- 3 Thews, Mutschler & Vaupel. *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen*. 6th edn, (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2007).
- 4 Lea, P. J., Silverman, M., Hegele, R. & Hollenberg, M. J. Tridimensional ultrastructure of glomerular capillary endothelium revealed by high-resolution scanning electron microscopy. *Microvascular research* **38**, 296-308 (1989).
- 5 Haraldsson, B., Nystrom, J. & Deen, W. M. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiological reviews* **88**, 451-487, doi:10.1152/physrev.00055.2006 (2008).
- 6 Deen, W. M., Lazzara, M. J. & Myers, B. D. Structural determinants of glomerular permeability. *American journal of physiology. Renal physiology* **281**, F579-596 (2001).
- 7 Rostgaard, J. & Qvortrup, K. Electron microscopic demonstrations of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrae. *Microvascular research* **53**, 1-13, doi:10.1006/mvre.1996.1987 (1997).
- 8 Comper, W. D., Lee, A. S., Tay, M. & Adal, Y. Anionic charge concentration of rat kidney glomeruli and glomerular basement membrane. *The Biochemical journal* **289 (Pt 3)**, 647-652 (1993).
- 9 Miner, J. H. The glomerular basement membrane. *Experimental cell research* **318**, 973-978, doi:10.1016/j.yexcr.2012.02.031 (2012).
- 10 Barker, D. F. *et al.* Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science (New York, N. Y.)* **248**, 1224-1227 (1990).
- 11 Noakes, P. G. *et al.* The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin beta 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin beta 1. *Nature genetics* **10**, 400-406, doi:10.1038/ng0895-400 (1995).
- 12 Zenker, M. *et al.* Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Human molecular genetics* **13**, 2625-2632, doi:10.1093/hmg/ddh284 (2004).
- 13 Kanwar, Y. S., Danesh, F. R. & Chugh, S. S. Contribution of proteoglycans towards the integrated functions of renal glomerular capillaries: a historical perspective. *The American journal of pathology* **171**, 9-13, doi:10.2353/ajpath.2007.070356 (2007).
- 14 Wartiovaara, J. *et al.* Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *The Journal of clinical investigation* **114**, 1475-1483, doi:10.1172/jci22562 (2004).
- 15 Schiessl, I. M. & Castrop, H. Angiotensin II AT2 receptor activation attenuates AT1 receptor-induced increases in the glomerular filtration of albumin: a multiphoton microscopy study. *American journal of physiology. Renal physiology* **305**, F1189-1200, doi:10.1152/ajprenal.00377.2013 (2013).
- 16 Pavenstadt, H., Kriz, W. & Kretzler, M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiological reviews* **83**, 253-307, doi:10.1152/physrev.00020.2002 (2003).
- 17 Greka, A. & Mundel, P. Cell Biology and Pathology of Podocytes. *Annual review of physiology* **74**, 299-323, doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153238 (2012).
- 18 Reiser, J. & Altintas, M. M. Podocytes. *F1000Research* **5**, doi:10.12688/f1000research.7255.1 (2016).
- 19 Abrahamson, D. R. Role of the Podocyte (and Glomerular Endothelium) in Building the GBM. *Seminars in nephrology* **32**, 342-349, doi:10.1016/j.semnephrol.2012.06.005 (2012).
- 20 Eremina, V. *et al.* Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *The Journal of clinical investigation* **111**, 707-716, doi:10.1172/jci17423 (2003).
- 21 Scott, R. P. & Quaggin, S. E. Review series: The cell biology of renal filtration. *The Journal of cell biology* **209**, 199-210, doi:10.1083/jcb.201410017 (2015).
- 22 Kriz, W. *et al.* A role for podocytes to counteract capillary wall distension. *Kidney international* **45**, 369-376 (1994).
- 23 Vasmant, D., Maurice, M. & Feldmann, G. Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat. *The Anatomical record* **210**, 17-24, doi:10.1002/ar.1092100104 (1984).

- 24 Lachapelle, M. & Bendayan, M. Contractile proteins in podocytes: immunocytochemical localization of actin and alpha-actinin in normal and nephrotic rat kidneys. *Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology* **60**, 105-111 (1991).
- 25 Drenckhahn, D. & Franke, R. P. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **59**, 673-682 (1988).
- 26 Sanden, S., Elger, M., Mundel, P. & Kriz, W. The architecture of podocyte cytoskeleton suggests a role in glomerular filtration dynamics. *Ann Anat* **177**, 44-45 (1995).
- 27 Kaplan, J. M. *et al.* Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nature genetics* **24**, 251-256, doi:10.1038/73456 (2000).
- 28 Michaud, J. L. *et al.* Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **14**, 1200-1211 (2003).
- 29 Chase, S. E. *et al.* Podocyte-specific knockout of myosin 1e disrupts glomerular filtration. *American journal of physiology. Renal physiology* **303**, F1099-1106, doi:10.1152/ajprenal.00251.2012 (2012).
- 30 Faul, C., Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K. & Mundel, P. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends in cell biology* **17**, 428-437, doi:10.1016/j.tcb.2007.06.006 (2007).
- 31 El-Aouni, C. *et al.* Podocyte-specific deletion of integrin-linked kinase results in severe glomerular basement membrane alterations and progressive glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **17**, 1334-1344, doi:10.1681/asn.2005090921 (2006).
- 32 Dedhar, S., Jewell, K., Rojiani, M. & Gray, V. The receptor for the basement membrane glycoprotein entactin is the integrin alpha 3/beta 1. *The Journal of biological chemistry* **267**, 18908-18914 (1992).
- 33 Kreidberg, J. A. & Symons, J. M. Integrins in kidney development, function, and disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **279**, F233-F242 (2000).
- 34 Kretzler, M. *et al.* Integrin-linked kinase as a candidate downstream effector in proteinuria. *The FASEB Journal* **15**, 1843-1845 (2001).
- 35 Smoyer, W. E. & Mundel, P. Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **76**, 172-183 (1998).
- 36 Takeda, T., Go, W. Y., Orlando, R. A. & Farquhar, M. G. Expression of podocalyxin inhibits cell-cell adhesion and modifies junctional properties in Madin-Darby canine kidney cells. *Molecular biology of the cell* **11**, 3219-3232 (2000).
- 37 Asanuma, K. *et al.* Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1188-1198, doi:10.1172/jci23371 (2005).
- 38 Mundel, P. *et al.* Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *The Journal of cell biology* **139**, 193-204 (1997).
- 39 Noris, M. & Remuzzi, G. Non-muscle myosins and the podocyte. *Clinical Kidney Journal* **5**, 94-101, doi:10.1093/ckj/sfs032 (2012).
- 40 Rodewald, R. & Karnovsky, M. J. POROUS SUBSTRUCTURE OF THE GLOMERULAR SLIT DIAPHRAGM IN THE RAT AND MOUSE. *The Journal of cell biology* **60**, 423-433 (1974).
- 41 Tryggvason, K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **10**, 2440-2445 (1999).
- 42 Reiser, J., Kriz, W., Kretzler, M. & Mundel, P. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *Journal of the American Society of Nephrology* **11**, 1-8 (2000).
- 43 Schnabel, E., Dekan, G., Miettinen, A. & Farquhar, M. Biogenesis of podocalyxin--the major glomerular sialoglycoprotein--in the newborn rat kidney. *European journal of cell biology* **48**, 313-326 (1989).
- 44 Huang, T. & Langlois, J. Podoendin. A new cell surface protein of the podocyte and endothelium. *The Journal of experimental medicine* **162**, 245-267 (1985).
- 45 Sawada, H., Stukenbrok, H., Kerjaschki, D. & Farquhar, M. Epithelial polyanion (podocalyxin) is found on the sides but not the soles of the foot processes of the glomerular epithelium. *The American journal of pathology* **125**, 309 (1986).
- 46 Kestila, M. *et al.* Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molecular cell* **1**, 575-582 (1998).

- 47 Shih, N. Y. *et al.* Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science (New York, N.Y.)* **286**, 312-315 (1999).
- 48 Boute, N. *et al.* NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature genetics* **24**, 349-354, doi:10.1038/74166 (2000).
- 49 Schnabel, E., Anderson, J. M. & Farquhar, M. G. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *The Journal of cell biology* **111**, 1255-1263 (1990).
- 50 Huber, T. B. *et al.* The carboxyl terminus of Neph family members binds to the PDZ domain protein zonula occludens-1. *The Journal of biological chemistry* **278**, 13417-13421, doi:10.1074/jbc.C200678200 (2003).
- 51 Welsch, T., Endlich, N., Kriz, W. & Endlich, K. CD2AP and p130Cas localize to different F-actin structures in podocytes. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **281**, F769-F777 (2001).
- 52 Schwarz, K. *et al.* Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *Journal of Clinical Investigation* **108**, 1621-1629 (2001).
- 53 Shih, N. Y. *et al.* CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *The American journal of pathology* **159**, 2303-2308, doi:10.1016/s0002-9440(10)63080-5 (2001).
- 54 Reiser, J. *et al.* TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nature genetics* **37**, 739-744, doi:10.1038/ng1592 (2005).
- 55 Winn, M. P. *et al.* A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science (New York, N.Y.)* **308**, 1801-1804, doi:10.1126/science.1106215 (2005).
- 56 Trenchev, P., Dorling, J., Webb, J. & Holborow, E. J. Localization of smooth muscle-like contractile proteins in kidney by immunoelectron microscopy. *Journal of anatomy* **121**, 85-95 (1976).
- 57 Saleem, M. A. *et al.* The molecular and functional phenotype of glomerular podocytes reveals key features of contractile smooth muscle cells. *American journal of physiology. Renal physiology* **295**, F959-970, doi:10.1152/ajprenal.00559.2007 (2008).
- 58 Gordon, A., Homsher, E. & Regnier, M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological reviews* **80**, 853-924 (2000).
- 59 Henger, A. *et al.* Angiotensin II increases the cytosolic calcium activity in rat podocytes in culture. *Kidney international* **52**, 687-693 (1997).
- 60 Nitschke, R. *et al.* Angiotensin II increases the intracellular calcium activity in podocytes of the intact glomerulus. *Kidney international* **57**, 41-49 (2000).
- 61 Fischer, K. G., Saueressig, U., Jacobshagen, C., Wichelmann, A. & Pavenstadt, H. Extracellular nucleotides regulate cellular functions of podocytes in culture. *American journal of physiology. Renal physiology* **281**, F1075-1081 (2001).
- 62 Hoffmann, S., Podlich, D., Hahnel, B., Kriz, W. & Gretz, N. Angiotensin II type 1 receptor overexpression in podocytes induces glomerulosclerosis in transgenic rats. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **15**, 1475-1487 (2004).
- 63 Pavenstadt, H. *et al.* Effect of nucleotides on the cytosolic free calcium activity and inositol phosphate formation in human glomerular epithelial cells. *British journal of pharmacology* **107**, 189-195 (1992).
- 64 Chevalier, R. L. *et al.* Localization of cGMP after infusion of ANP or nitroprusside in the maturing rat. *The American journal of physiology* **262**, F417-424 (1992).
- 65 Lewko, B. & Stepinski, J. Cyclic GMP signaling in podocytes. *Microscopy research and technique* **57**, 232-235, doi:10.1002/jemt.10080 (2002).
- 66 Endlich, N. *et al.* Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **12**, 413-422 (2001).
- 67 Kim, J. M. *et al.* CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science (New York, N.Y.)* **300**, 1298-1300, doi:10.1126/science.1081068 (2003).
- 68 Dreyer, S. D. *et al.* Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nature genetics* **19**, 47-50 (1998).
- 69 Pelletier, J. *et al.* Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* **67**, 437-447 (1991).
- 70 Dai, S. *et al.* Functional analysis of promoter mutations in the ACTN4 and SYNPO genes in focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official*

- publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association **25**, 824-835, doi:10.1093/ndt/gfp394 (2010).
- 71 Lemley, K. V. *et al.* Glomerular permselectivity at the onset of nephropathy in type 2 diabetes mellitus. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **11**, 2095-2105 (2000).
- 72 Wang, G. *et al.* Podocyte loss in human hypertensive nephrosclerosis. *American journal of hypertension* **22**, 300-306, doi:10.1038/ajh.2008.360 (2009).
- 73 Susztak, K., Raff, A. C., Schiffer, M. & Bottinger, E. P. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes* **55**, 225-233 (2006).
- 74 Barisoni, L., Kriz, W., Mundel, P. & D'Agati, V. The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **10**, 51-61 (1999).
- 75 Tian, D. *et al.* Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. *Science signaling* **3**, ra77, doi:10.1126/scisignal.2001200 (2010).
- 76 Thomas, P. E. *et al.* GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit. *The Journal of biological chemistry* **269**, 19953-19962 (1994).
- 77 Hsu, H. H. *et al.* Mechanisms of angiotensin II signaling on cytoskeleton of podocytes. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **86**, 1379-1394, doi:10.1007/s00109-008-0399-y (2008).
- 78 Teixeira Vde, P. *et al.* Functional consequences of integrin-linked kinase activation in podocyte damage. *Kidney international* **67**, 514-523, doi:10.1111/j.1523-1755.2005.67108.x (2005).
- 79 Sharma, R., Lovell, H. B., Wiegmann, T. B. & Savin, V. J. Vasoactive substances induce cytoskeletal changes in cultured rat glomerular epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **3**, 1131-1138 (1992).
- 80 Tsunoda, S. *et al.* Cultured rat glomerular epithelial cells show gene expression and production of transforming growth factor- β : expression is enhanced by thrombin. *Nephrology Dialysis Transplantation* **16**, 1776-1782 (2001).
- 81 Greiber, S. *et al.* NAD (P) H oxidase activity in cultured human podocytes: effects of adenosine triphosphate. *Kidney international* **53**, 654-663 (1998).
- 82 Remuzzi, A., Puntorieri, S., Battaglia, C., Bertani, T. & Remuzzi, G. Angiotensin converting enzyme inhibition ameliorates glomerular filtration of macromolecules and water and lessens glomerular injury in the rat. *The Journal of clinical investigation* **85**, 541-549, doi:10.1172/jci114470 (1990).
- 83 Benigni, A. *et al.* Blocking angiotensin II synthesis/activity preserves glomerular nephrin in rats with severe nephrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* **12**, 941-948 (2001).
- 84 Gross, J. L. *et al.* Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care* **28**, 164-176 (2004).
- 85 Luke, R. G. Hypertensive nephrosclerosis: pathogenesis and prevalence. Essential hypertension is an important cause of end-stage renal disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **14**, 2271-2278 (1999).
- 86 de Bold, A. J., Borenstein, H. B., Veress, A. T. & Sonnenberg, H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. Reprinted from *Life Sci.* 28:89-94, 1981. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **12**, 403-409; discussion 403-408, 408-409 (2001).
- 87 Kangawa, K. *et al.* Identification of rat gamma atrial natriuretic polypeptide and characterization of the cDNA encoding its precursor. *Nature* **312**, 152-155 (1984).
- 88 Sudoh, T., Kangawa, K., Minamino, N. & Matsuo, H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* **332**, 78-81, doi:10.1038/332078a0 (1988).
- 89 Sudoh, T., Minamino, N., Kangawa, K. & Matsuo, H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochemical and biophysical research communications* **168**, 863-870 (1990).
- 90 Kuhn, M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circulation research* **93**, 700-709, doi:10.1161/01.res.0000094745.28948.4d (2003).

- 91 Pfeifer, A. *et al.* Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **135**, 105-149 (1999).
- 92 Chusho, H. *et al.* Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4016-4021, doi:10.1073/pnas.071389098 (2001).
- 93 Schulz-Knappe, P. *et al.* Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klinische Wochenschrift* **66**, 752-759 (1988).
- 94 Potter, L. R., Abbey-Hosch, S. & Dickey, D. M. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocrine reviews* **27**, 47-72, doi:10.1210/er.2005-0014 (2006).
- 95 Garbers, D. L. & Lowe, D. G. Guanylyl cyclase receptors. *The Journal of biological chemistry* **269**, 30741-30744 (1994).
- 96 Kuhn, M. Molecular physiology of natriuretic peptide signalling. *Basic research in cardiology* **99**, 76-82, doi:10.1007/s00395-004-0460-0 (2004).
- 97 Potter, L. R. & Hunter, T. Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 6057-6060, doi:10.1074/jbc.R000033200 (2001).
- 98 Theilig, F. & Wu, Q. ANP-induced signaling cascade and its implications in renal pathophysiology. *American journal of physiology. Renal physiology* **308**, F1047-1055, doi:10.1152/ajprenal.00164.2014 (2015).
- 99 Yan, W., Wu, F., Morser, J. & Wu, Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8525-8529, doi:10.1073/pnas.150149097 (2000).
- 100 Chan, J. C. *et al.* Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 785-790, doi:10.1073/pnas.0407234102 (2005).
- 101 John, S. W. *et al.* Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science (New York, N.Y.)* **267**, 679-681 (1995).
- 102 Holtwick, R. *et al.* Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *The Journal of clinical investigation* **111**, 1399-1407, doi:10.1172/jci17061 (2003).
- 103 Edwards, B. S., Zimmerman, R. S., Schwab, T. R., Heublein, D. M. & Burnett, J. C., Jr. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circulation research* **62**, 191-195 (1988).
- 104 de Bold, A. J. *et al.* The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **79**, 705-714 (2001).
- 105 Stockmann, P. T. *et al.* Reversible induction of right ventricular atriopeptin synthesis in hypertrophy due to hypoxia. *Circulation research* **63**, 207-213 (1988).
- 106 Soualmia, H. *et al.* Angiotensin II-induced phosphoinositide production and atrial natriuretic peptide release in rat atrial tissue. *Journal of cardiovascular pharmacology* **29**, 605-611 (1997).
- 107 Cha, S. A., Park, B. M., Gao, S. & Kim, S. H. Stimulation of ANP by angiotensin-(1-9) via the angiotensin type 2 receptor. *Life sciences* **93**, 934-940, doi:10.1016/j.lfs.2013.10.020 (2013).
- 108 Stasch, J. P., Hirth-Dietrich, C., Kazda, S. & Neuser, D. Endothelin stimulates release of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo. *Life sciences* **45**, 869-875 (1989).
- 109 Matsubara, H. *et al.* Effects of steroid and thyroid hormones on synthesis of atrial natriuretic peptide by cultured atrial myocytes of rat. *Biochemical and biophysical research communications* **145**, 336-343 (1987).
- 110 Knowlton, K. U. *et al.* Co-regulation of the atrial natriuretic factor and cardiac myosin light chain-2 genes during alpha-adrenergic stimulation of neonatal rat ventricular cells. Identification of cis sequences within an embryonic and a constitutive contractile protein gene which mediate inducible expression. *The Journal of biological chemistry* **266**, 7759-7768 (1991).
- 111 Morita, E. *et al.* Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* **88**, 82-91 (1993).

- 112 Lopez, M. J., Garbers, D. L. & Kuhn, M. The guanylyl cyclase-deficient mouse defines differential pathways of natriuretic peptide signaling. *The Journal of biological chemistry* **272**, 23064-23068 (1997).
- 113 Suda, M. *et al.* Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 2337-2342 (1998).
- 114 Azzazy, H. M. & Christenson, R. H. B-type natriuretic peptide: physiologic role and assay characteristics. *Heart failure reviews* **8**, 315-320 (2003).
- 115 Volpe, M. Natriuretic peptides and cardio-renal disease. *International Journal of Cardiology* **176**, 630-639, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.08.032 (2014).
- 116 Hirsch, J. R., Meyer, M. & Forssmann, W. G. ANP and urodilatin: who is who in the kidney. *European journal of medical research* **11**, 447-454 (2006).
- 117 Ruskoaho, H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacological reviews* **44**, 479-602 (1992).
- 118 Polzin, D. *et al.* Decreased renal corin expression contributes to sodium retention in proteinuric kidney diseases. *Kidney international* **78**, 650-659, doi:10.1038/ki.2010.197 (2010).
- 119 Bennett, B. D. *et al.* Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. Hormone pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera. *The Journal of biological chemistry* **266**, 23060-23067 (1991).
- 120 John, S. W. *et al.* Blood pressure and fluid-electrolyte balance in mice with reduced or absent ANP. *The American journal of physiology* **271**, R109-114 (1996).
- 121 Tamura, N. *et al.* Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 4239-4244, doi:10.1073/pnas.070371497 (2000).
- 122 Mukoyama, M. *et al.* Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *The Journal of clinical investigation* **87**, 1402-1412, doi:10.1172/jci115146 (1991).
- 123 Potter, L. R. & Hunter, T. Identification and characterization of the phosphorylation sites of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors A and B. *Methods (San Diego, Calif.)* **19**, 506-520, doi:10.1006/meth.1999.0893 (1999).
- 124 Koller, K. J., de Sauvage, F. J., Lowe, D. G. & Goeddel, D. V. Conservation of the kinaselike regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Molecular and cellular biology* **12**, 2581-2590 (1992).
- 125 Potter, L. R. & Garbers, D. L. Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. *The Journal of biological chemistry* **267**, 14531-14534 (1992).
- 126 Airhart, N., Yang, Y. F., Roberts, C. T., Jr. & Silberbach, M. Atrial natriuretic peptide induces natriuretic peptide receptor-cGMP-dependent protein kinase interaction. *The Journal of biological chemistry* **278**, 38693-38698, doi:10.1074/jbc.M304098200 (2003).
- 127 Haneda, M. *et al.* Dual mechanism of angiotensin II inhibits ANP-induced mesangial cGMP accumulation. *Kidney international* **40**, 188-194 (1991).
- 128 Pandey, K. N., Nguyen, H. T., Sharma, G. D., Shi, S. J. & Kriegel, A. M. Ligand-regulated internalization, trafficking, and down-regulation of guanylyl cyclase/atrial natriuretic peptide receptor-A in human embryonic kidney 293 cells. *The Journal of biological chemistry* **277**, 4618-4627, doi:10.1074/jbc.M106436200 (2002).
- 129 Nagase, M., Katafuchi, T., Hirose, S. & Fujita, T. Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension* **15**, 1235-1243 (1997).
- 130 Kawaguchi, S. *et al.* Immunohistochemical localization of atrial natriuretic peptide receptor in bovine kidney and lung. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **37**, 1739-1742 (1989).
- 131 Ritter, D., Dean, A. D., Gluck, S. L. & Greenwald, J. E. Natriuretic peptide receptors A and B have different cellular distributions in rat kidney. *Kidney international* **48**, 5758-5766 (1995).
- 132 Nonoguchi, H., Knepper, M. A. & Manganiello, V. C. Effects of atrial natriuretic factor on cyclic guanosine monophosphate and cyclic adenosine monophosphate accumulation in microdissected nephron segments from rats. *Journal of Clinical Investigation* **79**, 500-507 (1987).
- 133 Kurtz, A., Della Bruna, R., Pfeilschifter, J., Taugner, R. & Bauer, C. Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 4769-4773 (1986).
- 134 Sexton, P. M., Zhuo, J. & Mendelsohn, F. A. Localization and regulation of renal receptors for angiotensin II and atrial natriuretic peptide. *The Tohoku journal of experimental medicine* **166**, 41-56 (1992).
- 135 Marin-Grez, M., Fleming, J. T. & Steinhausen, M. Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* **324**, 473-476 (1986).
- 136 Dunn, B. R., Ichikawa, I., Pfeffer, J. M., Troy, J. L. & Brenner, B. M. Renal and systemic hemodynamic effects of synthetic atrial natriuretic peptide in the anesthetized rat. *Circulation research* **59**, 237-246 (1986).
- 137 Endlich, K. & Steinhausen, M. Natriuretic peptide receptors mediate different responses in rat renal microvessels. *Kidney international* **52**, 202-207 (1997).
- 138 Ballermann, B. J., Hoover, R. L., Karnovsky, M. J. & Brenner, B. M. Physiologic regulation of atrial natriuretic peptide receptors in rat renal glomeruli. *The Journal of clinical investigation* **76**, 2049-2056, doi:10.1172/jci112207 (1985).
- 139 Chansel, D., Pham, P., Nivez, M. P. & Ardaillou, R. Characterization of atrial natriuretic factor receptors in human glomerular epithelial and mesangial cells. *The American journal of physiology* **259**, F619-627 (1990).
- 140 Shimonaka, M. *et al.* Visualization of ANP receptor on glomeruli of bovine kidney by use of a specific antiserum. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **253**, F1058-F1062 (1987).
- 141 Lopez, M. J. *et al.* Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* **378**, 65-68, doi:10.1038/378065a0 (1995).
- 142 Oliver, P. M. *et al.* Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 14730-14735 (1997).
- 143 Demerath, T., Staffel, J., Schreiber, A., Valletta, D. & Schweda, F. Natriuretic peptides buffer renin-dependent hypertension. *American journal of physiology. Renal physiology* **306**, F1489-1498, doi:10.1152/ajprenal.00668.2013 (2014).
- 144 Ogawa, Y. *et al.* Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A protects podocytes from aldosterone-induced glomerular injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **23**, 1198-1209, doi:10.1681/asn.2011100985 (2012).
- 145 Oliver, P. M. *et al.* Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 2547-2551 (1998).
- 146 Holtwick, R. *et al.* Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 7142-7147, doi:10.1073/pnas.102650499 (2002).
- 147 Sabrane, K. *et al.* Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1666-1674, doi:10.1172/jci23360 (2005).
- 148 Kishimoto, I., Rossi, K. & Garbers, D. L. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2703-2706, doi:10.1073/pnas.051625598 (2001).
- 149 Feil, R. & Kemp-Harper, B. cGMP signalling: from bench to bedside. Conference on cGMP generators, effectors and therapeutic implications. *EMBO reports* **7**, 149-153, doi:10.1038/sj.embor.7400627 (2006).
- 150 Lucas, K. A. *et al.* Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological reviews* **52**, 375-414 (2000).
- 151 Biel, M. Cyclic nucleotide-regulated cation channels. *The Journal of biological chemistry* **284**, 9017-9021, doi:10.1074/jbc.R800075200 (2009).
- 152 Sonnenburg, W. K. & Beavo, J. A. Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* **26**, 87-114 (1994).
- 153 Pfeifer, A. *et al.* Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *The EMBO journal* **17**, 3045-3051, doi:10.1093/emboj/17.11.3045 (1998).
- 154 Schlossmann, J. *et al.* Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature* **404**, 197-201, doi:10.1038/35004606 (2000).

- 155 Elesgaray, R. *et al.* Signaling cascade that mediates endothelial nitric oxide synthase activation induced by atrial natriuretic peptide. *Regulatory peptides* **151**, 130-134, doi:10.1016/j.regpep.2008.05.008 (2008).
- 156 Klaiber, M. *et al.* The ANP/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway counteracts Angiotensin II-stimulated calcium mobilization in cardiac myocytes. *BMC Pharmacology* **9**, P34-P34, doi:10.1186/1471-2210-9-S1-P34 (2009).
- 157 Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F. & Kurtz, A. Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *The Journal of clinical investigation* **102**, 1576-1582, doi:10.1172/jci4044 (1998).
- 158 Spiessberger, B. *et al.* cGMP-dependent protein kinase II and aldosterone secretion. *The FEBS journal* **276**, 1007-1013, doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06839.x (2009).
- 159 Chanez, P. *et al.* Atrial natriuretic factor (ANF) is a potent bronchodilator in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* **86**, 321-324 (1990).
- 160 Moro, C. & Lafontan, M. Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **304**, H358-368, doi:10.1152/ajpheart.00704.2012 (2013).
- 161 Sengenès, C., Berlan, M., De Glisezinski, I., Lafontan, M. & Galitzky, J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **14**, 1345-1351 (2000).
- 162 Ropero, A. B. *et al.* The atrial natriuretic peptide and guanylyl cyclase-A system modulates pancreatic beta-cell function. *Endocrinology* **151**, 3665-3674, doi:10.1210/en.2010-0119 (2010).
- 163 Calderone, A., Thaik, C. M., Takahashi, N., Chang, D. L. & Colucci, W. S. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *The Journal of clinical investigation* **101**, 812-818, doi:10.1172/JCI119883.
- 164 Hayashi, D. *et al.* Atrial natriuretic peptide inhibits cardiomyocyte hypertrophy through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Biochemical and biophysical research communications* **322**, 310-319, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.119 (2004).
- 165 Cao, L. & Gardner, D. G. Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension* **25**, 227-234 (1995).
- 166 Kapoun, A. M. *et al.* B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. *Circulation research* **94**, 453-461, doi:10.1161/01.res.0000117070.86556.9f (2004).
- 167 Curry, F. R. Atrial natriuretic peptide: an essential physiological regulator of transvascular fluid, protein transport, and plasma volume. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1458-1461, doi:10.1172/jci25417 (2005).
- 168 Kuhn, M. Endothelial actions of atrial and B-type natriuretic peptides. *British journal of pharmacology* **166**, 522-531, doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01827.x (2012).
- 169 Samson, W. K., Aguila, M. C., Martinovic, J., Antunes-Rodrigues, J. & Norris, M. Hypothalamic action of atrial natriuretic factor to inhibit vasopressin secretion. *Peptides* **8**, 449-454 (1987).
- 170 Brenner, B. M., Ballermann, B. J., Gunning, M. E. & Zeidel, M. L. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiological reviews* **70**, 665-699 (1990).
- 171 Schultz, H. D., Gardner, D. G., Deschepper, C. F., Coleridge, H. M. & Coleridge, J. C. Vagal C-fiber blockade abolishes sympathetic inhibition by atrial natriuretic factor. *The American journal of physiology* **255**, R6-13 (1988).
- 172 Melo, L. G. *et al.* Chronic regulation of arterial blood pressure in ANP transgenic and knockout mice: role of cardiovascular sympathetic tone. *Cardiovascular research* **43**, 437-444 (1999).
- 173 Imaizumi, T., Takeshita, A., Higashi, H. & Nakamura, M. alpha-ANP alters reflex control of lumbar and renal sympathetic nerve activity and heart rate. *The American journal of physiology* **253**, H1136-1140 (1987).
- 174 Luchner, A. & Schunkert, H. Interactions between the sympathetic nervous system and the cardiac natriuretic peptide system. *Cardiovascular research* **63**, 443-449, doi:10.1016/j.cardiores.2004.05.004 (2004).
- 175 Cogan, M. G. Atrial natriuretic factor can increase renal solute excretion primarily by raising glomerular filtration. *The American journal of physiology* **250**, F710-714 (1986).

- 176 Kiberd, B. A., Larson, T. S., Robertson, C. R. & Jamison, R. L. Effect of atrial natriuretic peptide on vasa recta blood flow in the rat. *The American journal of physiology* **252**, F1112-1117 (1987).
- 177 Atarashi, K., Mulrow, P. J. & Franco-Saenz, R. Effect of atrial peptides on aldosterone production. *The Journal of clinical investigation* **76**, 1807-1811, doi:10.1172/JCI112172 (1985).
- 178 Aronson, D. & Burger, A. J. Intravenous nesiritide (human B-type natriuretic peptide) reduces plasma endothelin-1 levels in patients with decompensated congestive heart failure. *The American journal of cardiology* **90**, 435-438 (2002).
- 179 Volpe, M. *et al.* Vagal mediation of the effects of atrial natriuretic factor on blood pressure and arterial baroreflexes in the rabbit. *Circulation research* **60**, 747 (1987).
- 180 Ferrari, A. U. *et al.* Effect of atrial natriuretic factor on arterial baroreceptor control of heart rate and blood pressure in conscious rats. *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension* **6**, S284-286 (1988).
- 181 Nakagawa, H. *et al.* Atrial natriuretic peptide locally counteracts the deleterious effects of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor activation. *Circulation. Heart failure* **7**, 814-821, doi:10.1161/circheartfailure.113.000885 (2014).
- 182 Boerrigter, G. & Burnett, J. C., Jr. Recent advances in natriuretic peptides in congestive heart failure. *Expert opinion on investigational drugs* **13**, 643-652, doi:10.1517/13543784.13.6.643 (2004).
- 183 Jensen, K. T., Carstens, J. & Pedersen, E. B. Effect of BNP on renal hemodynamics, tubular function and vasoactive hormones in humans. *The American journal of physiology* **274**, F63-72 (1998).
- 184 La Villa, G. *et al.* Cardiovascular and renal effects of low dose brain natriuretic peptide infusion in man. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **78**, 1166-1171, doi:10.1210/jcem.78.5.8175974 (1994).
- 185 Lazzeri, C. *et al.* Systemic hemodynamics and renal function during brain natriuretic peptide infusion in patients with essential hypertension. *American journal of hypertension* **8**, 799-807 (1995).
- 186 Harris, P. J., Skinner, S. L. & Zhuo, J. The effects of atrial natriuretic peptide and glucagon on proximal glomerulo-tubular balance in anaesthetized rats. *The Journal of physiology* **402**, 29-42 (1988).
- 187 Zhao, D., Pandey, K. N. & Navar, L. G. ANP-mediated inhibition of distal nephron fractional sodium reabsorption in wild-type and mice overexpressing natriuretic peptide receptor. *American journal of physiology. Renal physiology* **298**, F103-108, doi:10.1152/ajprenal.00479.2009 (2010).
- 188 Winaver, J., Burnett, J. C., Tyce, G. M. & Dousa, T. P. ANP inhibits Na(+)-H+ antiport in proximal tubular brush border membrane: role of dopamine. *Kidney international* **38**, 1133-1140 (1990).
- 189 Aperia, A. *et al.* Activation/deactivation of renal Na+,K(+)-ATPase: a final common pathway for regulation of natriuresis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **8**, 436-439 (1994).
- 190 Darvish, N., Winaver, J. & Dagan, D. A novel cGMP-activated Cl- channel in renal proximal tubules. *The American journal of physiology* **268**, F323-329 (1995).
- 191 Hirsch, J. R. *et al.* cGMP-dependent and -independent inhibition of a K+ conductance by natriuretic peptides: molecular and functional studies in human proximal tubule cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **10**, 472-480 (1999).
- 192 Nonoguchi, H., Tomita, K. & Marumo, F. Effects of atrial natriuretic peptide and vasopressin on chloride transport in long- and short-looped medullary thick ascending limbs. *The Journal of clinical investigation* **90**, 349-357, doi:10.1172/jci115869 (1992).
- 193 Ortiz, P. A., Hong, N. J. & Garvin, J. L. NO decreases thick ascending limb chloride absorption by reducing Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter activity. *American journal of physiology. Renal physiology* **281**, F819-825 (2001).
- 194 Brismar, H., Holtback, U. & Aperia, A. Mechanisms by which intrarenal dopamine and ANP interact to regulate sodium metabolism. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. : 1993)* **22**, 303-307 (2000).
- 195 Guo, L. J., Alli, A. A., Eaton, D. C. & Bao, H. F. ENaC is regulated by natriuretic peptide receptor-dependent cGMP signaling. *American journal of physiology. Renal physiology* **304**, F930-937, doi:10.1152/ajprenal.00638.2012 (2013).

- 196 Klokke, J. *et al.* Atrial natriuretic peptide and nitric oxide signaling antagonizes vasopressin-mediated water permeability in inner medullary collecting duct cells. *American journal of physiology. Renal physiology* **297**, F693-703, doi:10.1152/ajprenal.00136.2009 (2009).
- 197 Light, D. B., Corbin, J. D. & Stanton, B. A. Dual ion-channel regulation by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *Nature* **344**, 336-339, doi:10.1038/344336a0 (1990).
- 198 Maack, T. Receptors of atrial natriuretic factor. *Annu Rev Physiol* **54**, 11-27, doi:10.1146/annurev.ph.54.030192.000303 (1992).
- 199 Matsukawa, N. *et al.* The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 7403-7408 (1999).
- 200 Li, Y., Sarkar, O., Brochu, M. & Anand-Srivastava, M. B. Natriuretic peptide receptor-C attenuates hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of nitroxidative stress and Gi proteins. *Hypertension* **63**, 846-855, doi:10.1161/hypertensionaha.113.01772 (2014).
- 201 Kanazawa, M., Casley, D. J., Sybertz, E. J., Haslanger, M. F. & Johnston, C. I. Localization and characterization of neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11), the degradative enzyme for atrial natriuretic peptide, in rat kidney using a radioiodinated neutral metalloendopeptidase inhibitor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **261**, 1231-1237 (1992).
- 202 Matsumura, T. *et al.* Neutral endopeptidase 24.11 in neutrophils modulates protective effects of natriuretic peptides against neutrophils-induced endothelial cytotoxicity. *The Journal of clinical investigation* **97**, 2192-2203, doi:10.1172/jci118660 (1996).
- 203 Olins, G. M., Spear, K. L., Siegel, N. R., Reinhard, E. J. & Zurcher-Neely, H. A. Atrial peptide inactivation by rabbit-kidney brush-border membranes. *European journal of biochemistry / FEBS* **170**, 431-434 (1987).
- 204 Kenny, A. J., Bourne, A. & Ingram, J. Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11. *The Biochemical journal* **291 (Pt 1)**, 83-88 (1993).
- 205 Stephenson, S. L. & Kenny, A. J. Metabolism of neuropeptides. Hydrolysis of the angiotensins, bradykinin, substance P and oxytocin by pig kidney microvillar membranes. *Biochemical Journal* **241**, 237-247, doi:10.1042/bj2410237 (1987).
- 206 Abassi, Z., Golomb, E. & Keiser, H. R. Neutral endopeptidase inhibition increases the urinary excretion and plasma levels of endothelin. *Metabolism* **41**, 683-685, doi:http://dx.doi.org/10.1016/0026-0495(92)90303-R (1992).
- 207 Lewis, J. *et al.* Atrial natriuretic factor in oliguric acute renal failure. Anaritide Acute Renal Failure Study Group. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **36**, 767-774 (2000).
- 208 Colucci, W. S. *et al.* Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group. *The New England journal of medicine* **343**, 246-253, doi:10.1056/nejm200007273430403 (2000).
- 209 Sackner-Bernstein, J. D., Skopicki, H. A. & Aaronson, K. D. Risk of worsening renal function with nesiritide in patients with acutely decompensated heart failure. *Circulation* **111**, 1487-1491, doi:10.1161/01.cir.0000159340.93220.e4 (2005).
- 210 O'Connor, C. M. *et al.* Effect of nesiritide in patients with acute decompensated heart failure. *The New England journal of medicine* **365**, 32-43, doi:10.1056/NEJMoa1100171 (2011).
- 211 Potter, L. R., Yoder, A. R., Flora, D. R., Antos, L. K. & Dickey, D. M. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handbook of experimental pharmacology*, 341-366, doi:10.1007/978-3-540-68964-5_15 (2009).
- 212 McKie, P. M., Ichiki, T. & Burnett, J. C. M-Atrial Natriuretic Peptide: A Novel Antihypertensive Protein Therapy. *Current Hypertension Reports* **14**, 62-69, doi:10.1007/s11906-011-0244-5 (2012).
- 213 Bevan, E. G. *et al.* Candoxatril, a neutral endopeptidase inhibitor: efficacy and tolerability in essential hypertension. *Journal of hypertension* **10**, 607-613 (1992).
- 214 Richards, A. M. *et al.* Chronic inhibition of endopeptidase 24.11 in essential hypertension: evidence for enhanced atrial natriuretic peptide and angiotensin II. *Journal of hypertension* **11**, 407-416 (1993).
- 215 Rouleau, J. L. *et al.* Comparison of vasopeptidase inhibitor, omapatrilat, and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial. *Lancet (London, England)* **356**, 615-620 (2000).

- 216 Blaeser-Kiel, G. Vasopeptidase-Inhibition : Omapatrilat wird weiter untersucht. *Dtsch Arztebl International* **97**, 3279- (2000).
- 217 Tabrizchi, R. Omapatrilat. Bristol-Myers Squibb. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)* **2**, 1414-1422 (2001).
- 218 McMurray, J. J. *et al.* Dual angiotensin receptor and neprilysin inhibition as an alternative to angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with chronic systolic heart failure: rationale for and design of the Prospective comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact on Global Mortality and morbidity in Heart Failure trial (PARADIGM-HF). *European journal of heart failure* **15**, 1062-1073, doi:10.1093/eurjhf/hft052 (2013).
- 219 [Sacubitril/valsartan receives European approval]. *MMW Fortschritte der Medizin* **157**, 84, doi:10.1007/s15006-015-7627-5 (2015).
- 220 Kasahara, M. *et al.* Ameliorated glomerular injury in mice overexpressing brain natriuretic peptide with renal ablation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **11**, 1691-1701 (2000).
- 221 Nishikimi, T. *et al.* Natriuretic peptide/natriuretic peptide receptor-A (NPR-A) system has inhibitory effects in renal fibrosis in mice. *Regulatory peptides* **154**, 44-53, doi:10.1016/j.regpep.2009.02.006 (2009).
- 222 Das, S., Au, E., Krazit, S. T. & Pandey, K. N. Targeted disruption of guanylyl cyclase-A/natriuretic peptide receptor-A gene provokes renal fibrosis and remodeling in null mutant mice: role of proinflammatory cytokines. *Endocrinology* **151**, 5841-5850, doi:10.1210/en.2010-0655 (2010).
- 223 Das, S., Periyasamy, R. & Pandey, K. N. Activation of IKK/NF-kappaB provokes renal inflammatory responses in guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A gene-knockout mice. *Physiological genomics* **44**, 430-442, doi:10.1152/physiolgenomics.00147.2011 (2012).
- 224 Patel, N. N., Rogers, C. A., Angelini, G. D. & Murphy, G. J. Pharmacological therapies for the prevention of acute kidney injury following cardiac surgery: a systematic review. *Heart failure reviews* **16**, 553-567, doi:10.1007/s10741-011-9235-5 (2011).
- 225 Mori, Y., Kamada, T. & Ochiai, R. Reduction in the incidence of acute kidney injury after aortic arch surgery with low-dose atrial natriuretic peptide: a randomised controlled trial. *European journal of anaesthesiology* **31**, 381-387, doi:10.1097/eja.0000000000000035 (2014).
- 226 Mitaka, C., Kudo, T., Haraguchi, G. & Tomita, M. Cardiovascular and renal effects of carperitide and nesiritide in cardiovascular surgery patients: a systematic review and meta-analysis. *Critical care (London, England)* **15**, R258, doi:10.1186/cc10519 (2011).
- 227 Sezai, A. *et al.* Results of low-dose human atrial natriuretic peptide infusion in nondialysis patients with chronic kidney disease undergoing coronary artery bypass grafting: the NU-HIT (Nihon University working group study of low-dose HANP Infusion Therapy during cardiac surgery) trial for CKD. *Journal of the American College of Cardiology* **58**, 897-903, doi:10.1016/j.jacc.2011.03.056 (2011).
- 228 Voors, A. A. *et al.* Renal effects of the angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *European journal of heart failure* **17**, 510-517, doi:10.1002/ejhf.232 (2015).
- 229 Judge, P., Haynes, R., Landray, M. J. & Baigent, C. Neprilysin inhibition in chronic kidney disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **30**, 738-743, doi:10.1093/ndt/gfu269 (2015).
- 230 Nagy, A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **26**, 99-109 (2000).
- 231 Lukowski, R. *et al.* Role of smooth muscle cGMP/cGKI signaling in murine vascular restenosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**, 1244-1250, doi:10.1161/atvbaha.108.166405 (2008).
- 232 Muzumdar, M. D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L. & Luo, L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **45**, 593-605, doi:10.1002/dvg.20335 (2007).
- 233 Qi, Z. *et al.* Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *American journal of physiology. Renal physiology* **286**, F590-596, doi:10.1152/ajprenal.00324.2003 (2004).

- 234 Takemoto, M. *et al.* A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *The American journal of pathology* **161**, 799-805, doi:10.1016/s0002-9440(10)64239-3 (2002).
- 235 Boerries, M. *et al.* Molecular fingerprinting of the podocyte reveals novel gene and protein regulatory networks. *Kidney international* **83**, 1052-1064, doi:10.1038/ki.2012.487 (2013).
- 236 Burghardt, T. *et al.* LMX1B is essential for the maintenance of differentiated podocytes in adult kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **24**, 1830-1848, doi:10.1681/asn.2012080788 (2013).
- 237 Trenchev, P. & Konopka, M. Combined haematoxylin, eosin and fluorescent stain for paraffin sections. *Pathology* **12**, 79-81 (1980).
- 238 Dubray, G. & Bezard, G. A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry* **119**, 325-329 (1982).
- 239 Goldner, J. A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *The American journal of pathology* **14**, 237-243 (1938).
- 240 Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* **119**, 493-501 (1992).
- 241 Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* **260**, 3440-3450 (1985).
- 242 Ilatovskaya, D. V. *et al.* Angiotensin II has acute effects on TRPC6 channels in podocytes of freshly isolated glomeruli. *Kidney international* **86**, 506-514, doi:10.1038/ki.2014.71 (2014).
- 243 Moeller, M. J., Sanden, S. K., Soofi, A., Wiggins, R. C. & Holzman, L. B. Podocyte-specific expression of cre recombinase in transgenic mice. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **35**, 39-42, doi:10.1002/gene.10164 (2003).
- 244 Argiles, A. *et al.* Acute adaptative changes to unilateral nephrectomy in humans. *Kidney international* **32**, 714-720 (1987).
- 245 Schreiber, A. *Die Mechanismen der kompensatorischen renalen Hypertrophie*, Universität Regensburg, (2012).
- 246 Amann, K. *et al.* Lack of nidogen-2 increases blood pressure, glomerular and tubulointerstitial damage in DOCA-salt hypertension. *European journal of clinical investigation* **39**, 116-125, doi:10.1111/j.1365-2362.2008.02065.x (2009).
- 247 Wang, Y., Babankova, D., Huang, J., Swain, G. M. & Wang, D. H. Deletion of transient receptor potential vanilloid type 1 receptors exaggerates renal damage in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension* **52**, 264-270, doi:10.1161/hypertensionaha.108.110197 (2008).
- 248 Ji, X. *et al.* P2X7 deficiency attenuates hypertension and renal injury in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *American journal of physiology. Renal physiology* **303**, F1207-1215, doi:10.1152/ajprenal.00051.2012 (2012).
- 249 Schordan, S. *et al.* OPN deficiency results in severe glomerulosclerosis in uninephrectomized mice. *American journal of physiology. Renal physiology* **304**, F1458-1470, doi:10.1152/ajprenal.00615.2012 (2013).
- 250 Thomas, W., Dooley, R. & Harvey, B. J. Aldosterone as a renal growth factor. *Steroids* **75**, 550-554, doi:10.1016/j.steroids.2009.09.008 (2010).
- 251 Hostetter, T. H. Progression of renal disease and renal hypertrophy. *Annu Rev Physiol* **57**, 263-278, doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.001403 (1995).
- 252 Chugh, S. S., Clement, L. C. & Mace, C. New insights into human minimal change disease: lessons from animal models. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **59**, 284-292, doi:10.1053/j.ajkd.2011.07.024 (2012).
- 253 Alpers, C. E., Hudkins, K. L., Gown, A. M. & Johnson, R. J. Enhanced expression of "muscle-specific" actin in glomerulonephritis. *Kidney international* **41**, 1134-1142 (1992).
- 254 Kawasaki, Y. *et al.* Renal expression of alpha-smooth muscle actin and c-Met in children with Henoch-Schonlein purpura nephritis. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* **23**, 913-919, doi:10.1007/s00467-008-0749-6 (2008).
- 255 Meran, S. & Steadman, R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *International Journal of Experimental Pathology* **92**, 158-167, doi:10.1111/j.1365-2613.2011.00764.x (2011).

- 256 Hewitson, T. D. Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. *American journal of physiology. Renal physiology* **296**, F1239-1244, doi:10.1152/ajprenal.90521.2008 (2009).
- 257 Modlinger, P. S., Wilcox, C. S. & Aslam, S. Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. *Seminars in nephrology* **24**, 354-365 (2004).
- 258 Dinkova-Kostova, A. T. & Talalay, P. NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Archives of biochemistry and biophysics* **501**, 116-123, doi:10.1016/j.abb.2010.03.019 (2010).
- 259 Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Mattson, M. P. & Markesbery, W. R. Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* **18**, 457-461 (1997).
- 260 Zarkovic, N. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Molecular aspects of medicine* **24**, 281-291 (2003).
- 261 Bauer, G. & Zarkovic, N. Revealing mechanisms of selective, concentration-dependent potentials of 4-hydroxy-2-nonenal to induce apoptosis in cancer cells through inactivation of membrane-associated catalase. *Free radical biology & medicine* **81**, 128-144, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.010 (2015).
- 262 Dominguez, J. H. *et al.* Renal injury: similarities and differences in male and female rats with the metabolic syndrome. *Kidney international* **69**, 1969-1976, doi:10.1038/sj.ki.5000406 (2006).
- 263 Kamiyama, M. *et al.* Oxidative Stress/Angiotensinogen/Renin-Angiotensin System Axis in Patients with Diabetic Nephropathy. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 23045-23062, doi:10.3390/ijms141123045 (2013).
- 264 Greka, A. & Mundel, P. Balancing calcium signals through TRPC5 and TRPC6 in podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **22**, 1969-1980, doi:10.1681/asn.2011040370 (2011).
- 265 Burford, J. L. *et al.* Intravital imaging of podocyte calcium in glomerular injury and disease. *The Journal of clinical investigation* **124**, 2050-2058, doi:10.1172/jci71702 (2014).
- 266 Ilatovskaya, D. V., Palygin, O., Levchenko, V. & Staruschenko, A. Pharmacological characterization of the P2 receptors profile in the podocytes of the freshly isolated rat glomeruli. *American journal of physiology. Cell physiology* **305**, C1050-1059, doi:10.1152/ajpcell.00138.2013 (2013).
- 267 Roshanravan, H. & Dryer, S. E. ATP acting through P2Y receptors causes activation of podocyte TRPC6 channels: role of podocin and reactive oxygen species. *American journal of physiology. Renal physiology* **306**, F1088-1097, doi:10.1152/ajprenal.00661.2013 (2014).
- 268 Fried, T. A., McCoy, R. N., Osgood, R. W. & Stein, J. H. Effect of atriopeptin II on determinants of glomerular filtration rate in the in vitro perfused dog glomerulus. *The American journal of physiology* **250**, F1119-1122 (1986).
- 269 Sugimoto, E., Shigemi, K., Okuno, T., Yawata, T. & Morimoto, T. Effect of ANP on circulating blood volume. *The American journal of physiology* **257**, R127-131 (1989).
- 270 Roy, D. R. Effect of synthetic ANP on renal and loop of Henle functions in the young rat. *The American journal of physiology* **251**, F220-225 (1986).
- 271 Sonnenberg, H., Honrath, U., Chong, C. K. & Wilson, D. R. Atrial natriuretic factor inhibits sodium transport in medullary collecting duct. *The American journal of physiology* **250**, F963-966 (1986).
- 272 Stockand, J. D. & Sansom, S. C. Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction. *Physiological reviews* **78**, 723-744 (1998).
- 273 Ghayur, M. N., Krepinsky, J. C. & Janssen, L. J. CONTRACTILITY OF THE RENAL GLOMERULUS AND MESANGIAL CELLS: LINGERING DOUBTS AND STRATEGIES FOR THE FUTURE. *Medical hypotheses and research : MHR* **4**, 1-9 (2008).
- 274 Carmines, P. K. & Fleming, J. T. Control of the renal microvasculature by vasoactive peptides. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **4**, 3300-3309 (1990).
- 275 Blantz, R. C., Konnen, K. S. & Tucker, B. J. Angiotensin II effects upon the glomerular microcirculation and ultrafiltration coefficient of the rat. *Journal of Clinical Investigation* **57**, 419-434 (1976).
- 276 Awazu, M. *et al.* Renal sympathetic nerves modulate glomerular ANP receptors and filtration. *The American journal of physiology* **261**, F29-35 (1991).

- 277 Nojiri, T. *et al.* Atrial natriuretic peptide protects against cisplatin-induced acute kidney injury. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **75**, 123-129, doi:10.1007/s00280-014-2624-4 (2015).
- 278 Makino, H. *et al.* Transgenic overexpression of brain natriuretic peptide prevents the progression of diabetic nephropathy in mice. *Diabetologia* **49**, 2514-2524, doi:10.1007/s00125-006-0352-y (2006).
- 279 Suganami, T. *et al.* Overexpression of brain natriuretic peptide in mice ameliorates immune-mediated renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **12**, 2652-2663 (2001).
- 280 Funder, J. W. *et al.* Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **93**, 3266-3281, doi:10.1210/jc.2008-0104 (2008).
- 281 Milliez, P. *et al.* Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *Journal of the American College of Cardiology* **45**, 1243-1248, doi:10.1016/j.jacc.2005.01.015 (2005).
- 282 Steichen, O., Lorthioir, A., Zinzindohoue, F., Plouin, P. F. & Amar, L. Outcomes of drug-based and surgical treatments for primary aldosteronism. *Advances in chronic kidney disease* **22**, 196-203, doi:10.1053/j.ackd.2014.10.003 (2015).
- 283 Oddie, C. J., Coghlan, J. P. & Scoggins, B. A. Plasma desoxycorticosterone levels in man with simultaneous measurement of aldosterone, corticosterone, cortisol and 11-deoxycortisol. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **34**, 1039-1054, doi:10.1210/jcem-34-6-1039 (1972).
- 284 Shibata, S., Nagase, M., Yoshida, S., Kawachi, H. & Fujita, T. Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension* **49**, 355-364, doi:10.1161/01.HYP.0000255636.11931.a2 (2007).
- 285 Shah, S. V., Baliga, R., Rajapurkar, M. & Fonseca, V. A. Oxidants in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **18**, 16-28, doi:10.1681/asn.2006050500 (2007).
- 286 Wang, Z. *et al.* NADPH oxidase-derived ROS contributes to upregulation of TRPC6 expression in puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **24**, 619-626, doi:10.1159/000257517 (2009).
- 287 Thilo, F., Lee, M., Xia, S., Zakrzewicz, A. & Tepel, M. High glucose modifies transient receptor potential canonical type 6 channels via increased oxidative stress and syndecan-4 in human podocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **450**, 312-317, doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.116 (2014).
- 288 Anderson, M., Roshanravan, H., Khine, J. & Dryer, S. E. Angiotensin II activation of TRPC6 channels in rat podocytes requires generation of reactive oxygen species. *Journal of cellular physiology* **229**, 434-442, doi:10.1002/jcp.24461 (2014).
- 289 Schaldecker, T. *et al.* Inhibition of the TRPC5 ion channel protects the kidney filter. *The Journal of clinical investigation* **123**, 5298-5309, doi:10.1172/jci71165 (2013).
- 290 Sonneveld, R. *et al.* Glucose specifically regulates TRPC6 expression in the podocyte in an AngII-dependent manner. *The American journal of pathology* **184**, 1715-1726, doi:10.1016/j.ajpath.2014.02.008 (2014).
- 291 Moller, C. C. *et al.* Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **18**, 29-36, doi:10.1681/asn.2006091010 (2007).
- 292 Xu, S. Z. *et al.* Activation of TRPC cationic channels by mercurial compounds confers the cytotoxicity of mercury exposure. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **125**, 56-68, doi:10.1093/toxsci/kfr268 (2012).
- 293 Singh, A., Hildebrand, M. E., Garcia, E. & Snutch, T. P. The transient receptor potential channel antagonist SKF96365 is a potent blocker of low-voltage-activated T-type calcium channels. *British journal of pharmacology* **160**, 1464-1475, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00786.x (2010).
- 294 Kim, E. Y., Alvarez-Baron, C. P. & Dryer, S. E. Canonical transient receptor potential channel (TRPC)3 and TRPC6 associate with large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BKCa) channels: role in BKCa trafficking to the surface of cultured podocytes. *Molecular pharmacology* **75**, 466-477, doi:10.1124/mol.108.051912 (2009).
- 295 Koitabashi, N. *et al.* Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation Novel mechanism of

- cardiac stress modulation by PDE5 inhibition. *Journal of molecular and cellular cardiology* **48**, 713-724, doi:10.1016/j.yjmcc.2009.11.015 (2010).
- 296 Klaiber, M. *et al.* Novel insights into the mechanisms mediating the local antihypertrophic effects of cardiac atrial natriuretic peptide: role of cGMP-dependent protein kinase and RGS2. *Basic research in cardiology* **105**, 583-595, doi:10.1007/s00395-010-0098-z (2010).
- 297 Hall, G. *et al.* Phosphodiesterase 5 inhibition ameliorates angiotensin II-induced podocyte dysmotility via the protein kinase G-mediated downregulation of TRPC6 activity. *American journal of physiology. Renal physiology* **306**, F1442-1450, doi:10.1152/ajprenal.00212.2013 (2014).
- 298 Vassiliadis, J. *et al.* Calcium mediates glomerular filtration through calcineurin and mTORC2/Akt signaling. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **22**, 1453-1461, doi:10.1681/asn.2010080878 (2011).
- 299 Zhang, H., Ding, J., Fan, Q. & Liu, S. TRPC6 up-regulation in Ang II-induced podocyte apoptosis might result from ERK activation and NF-kappaB translocation. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* **234**, 1029-1036, doi:10.3181/0901-rm-11 (2009).
- 300 Dietrich, A. *et al.* Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Molecular and cellular biology* **25**, 6980-6989, doi:10.1128/mcb.25.16.6980-6989.2005 (2005).
- 301 Vaughan, M. R. & Quaggin, S. E. How do mesangial and endothelial cells form the glomerular tuft? *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **19**, 24-33, doi:10.1681/asn.2007040471 (2008).

8 Anhang I

8.1 Materialien und Geräte

8.1.1 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller / Lieferant
10% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels	BioRad
Eppendorf-Cups (0,2-2,0 ml)	Sarstedt, Nerbe
Falcon-Röhrchen (15-50 ml)	Sarstedt, Nerbe
Glaswaren	Schott, Roth
Hautklammern	FST
Kanülen, versch. Größen	BD, Medishop
Kapillaren, diverse	Hirschmann Laborgeräte
LightCycler-96-Well-Platten	Roche
Messpipetten, Polyethylen	Sarstedt
Nähseide 7.0	Resorba Wundversorgung
Nitrocellulose Membran	BioRad
Pipettenspitzen, mit und ohne Filter	Sarstedt, Nerbe
Polyethylen-Röhrchen (13 ml)	Sarstedt
Polyethylen-Schläuche	Science Products
Polystyrol-Röhrchen (13 ml)	Sarstedt
Skalpellklingen	Heinz Herenz
Terylene 4.0	Serag-Wiessner

8.1.2 Reagenzien

Produkt	Hersteller / Lieferant
Agarose	Bio & Sell
ATP	Sigma-Aldrich
BNP-45, mouse	Phoenix Pharmaceuticals
BSA	Sigma-Aldrich
Chloroform	Merck
Dako Mounting Medium	Dako
DEPEX Mounting Medium	Serva Elektrophoresis
DOCA-Pellets	International Research of America
Dynabeads®	Dynal Invitrogen
Einbettkassetten	Neolab
Eisessig	Merck
Ethanol	Merck

Evans Blue	Sigma Aldrich
FITC-Sinistrin	Fresenius
Fura-2-AM	Invitrogen
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Fermentas
Glycerol	Merck
GoTaq Reaction Buffer	Promega
GoTaq DNA Polymerase	Promega
Heparin (25.000 I.E.)	Rotexmedica
HEPES 1M	Sigma-Aldrich
HiMark Pre-Stained Standard	LifeTechnologies
Isofluran	Baxter
Isopronanol	Merck
Ketamin	CP-Pharma
Methanol	Merck
Methylbutan	Merck
NaCl 0,9%, steril	B. Braun
Oligo(dT)-Primer	Promega
Paraffin	Leica
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
PeqGREEN	Peqlab
Proteinase K	Peqlab
Reverse Transkriptase	Roche
Saccharose	Sigma-Aldrich
SKF 96365	Abcam
SYBR Green	Roche
TissueTek	Hartenstein
TRIS	Sigma-Aldrich
TRISure	Bioline
Triton X-100	Boehringer
Xylazin	Ratiopharm

8.1.3 Assay Kits

Angiotensin I RIA	DiaSorin
ANP / BNP EIA	Phoenix Pharmaceuticals
Kreatinin Assay	BioassaySystems
Mouse Albumin ELISA	Immunology Consultants Laboratory, Inc. (ICL)
TUNEL Assay	Roche

8.1.4 Futtermittel

Produkt	Hersteller
Hochsalzdiät (4% NaCl)	Ssniff Spezialdiäten GmbH
Standarddiät	Ssniff Spezialdiäten GmbH

8.1.5 Primer

Die Primer für die Genotypisierung und die qPCR wurden von der Firma biomers.net GmbH in gewünschter Nukleotidabfolge synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wurde eine Konzentration von 100 pmol / μ l eingestellt. Es handelt sich um murine Primer, die in 5'- zu 3'-Richtung aufgelistet sind.

8.1.5.1 Genotypisierungs-Primer

Gen	Forward-Primer	Reverse-Primer
GC-A ^{flox/flox}	TCCTGTCTCCCGTGACCTTCC	ATCAGAGAATAACCAGCCAGAG
Cre	GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG	GTAGTTATTCGGATCATCAGCTACAC

8.1.5.2 qPCR-Primer

Gen	Forward-Primer	Reverse-Primer
GC-A	GGCTTTGCCCAAACACATCC	CTCAACATCACAGTAAATCACC
NPR-C	GGCTCAATGAGGAGGATTACGTG	CACAGAGAAGTCCCCATACCG
cGKI α	CGCCAGGCGTTCCGG AAGTT	GTGCAGAGCTTCACGCCT T
cGKI β	GGAGAAGATCGAGGAGCTGA	TTCGTCCTTCTGATCCAACTC
AT1	TCACCAGATCAAGTGCATTTTGA	AGAGTTAAGGGCCATTTTGCTTT
MR	TGCCTTGAGTTGGAGATCGT	CCCTGGCACAGCTCATAACAT
Renin	GGTGTCTAGGCATGGGCTT	GATAATGCTGCGGGTCGCTA
Podocin	TTGGCACATCGATCCCTCAC	GGGACTCTGAAGCAGCCTTT
Nephrin	CTGGGGGACAGTGGATTGAC	AAGACCACCAACCGCAAAGA
CD31	CAGCTTCACTGCTTTGCTTG	GGTGACACTGGACAAAAAGG
Megalin	CCCTCTCTGCCAAGCTGCC	CTGACGGTCCCTGCACTGCC
TRPC6	GCAAAAAGGTTAGCGACAAGC	CCTTGCACTGCATAGACAGC
TRPC5	CCAACAATTGCTAGCCACCT	AAATCCATCAGGTTCCACCA
NOX-2	CGGAGGGGCTATTCAATGCT	CACTGGCTGTACCAAAGGGT
NOX-4	CTACTACATTACCAAATGTTGGGC	GCAGTTGAGGTTCAGGACAGA
NQO-1	AACGTCATTCTCTGGCCGAT	TGTGGCCAATGCTGTAAACC

8.1.6 Antikörper

8.1.6.1 Primärantikörper

Name	Verwendung für	Verd.	Art.-Nr.	Hersteller / Lieferant
Goat-Anti-Podocin	Immunfluoreszenzfärbung (IF)	1:200	sc 22298	Santa Cruz
	Western Blot (WB)	1:1000		Santa Cruz
Goat-Anti-Synaptopodin	Immunfluoreszenzfärbung	1:200	sc 21537	Santa Cruz
Rabbit-Anti-TPRC6	Immunfluoreszenzfärbung	1:200	ab 62461	Abcam
	Western Blot	1:500		Abcam
Mouse-Anti-alpha-SMA	Immunfluoreszenzfärbung	1:600	ab 7817	Abcam
Rabbit-Anti-4-HNE	Immunfluoreszenzfärbung	1:100	HNE 11-S	Alpha Diagnostics / Biotrend (Köln)
Rabbit-Anti-Cleaved Caspase-3 (asp175)	Immunfluoreszenzfärbung	1:100	ab 32042	Abcam

8.1.6.2 Sekundärantikörper

Name	Konjug.	Verwend.	Verd.	Art.-Nr.	Hersteller / Lieferant
donkey-anti-goat	IgG-HRP	Podocin WB	1:2000	sc 2033	Santa Cruz
donkey-anti-rabbit	IgG-HRP	TRPC6 WB	1:1000	sc 2317	Santa Cruz
DyLight 488 (Donkey-Anti-Goat)	Cy2	IF	1:400	705-485-147	Jackson Immuno Reseach / Dianova
DyLight 488 (Donkey-Anti-Rabbit)	Cy2	IF	1:400	711-485-152	Jackson Immuno Reseach / Dianova
DyLight 488 (Donkey-Anti-Mouse)	Cy2	IF	1:400	715-485-150	Jackson Immuno Reseach / Dianova
Rhodamin (Donkey-Anti-Mouse)	TRITC	IF	1:400	715-025-150	Jackson Immuno Reseach / Dianova
Cy TM 5 (Donkey-Anti-Goat)	Cy5	IF	1:400	705-175-147	Jackson Immuno Reseach / Dianova

8.1.7 Puffer und Lösungen

8.1.7.1 Färbungen

Beschichtungsmedium:

- 97 ml F-12
- 1 ml Fibronectin
- 1 ml Kollagen
- 50 µl BSA
- 1 ml Penicillin / Streptomycin

PBS, pH 7,4:

- 138 mM NaCl
- 2,71 mM KCl
- 10,2 mM Na₂HPO₄
- 1,77 mM KH₂PO₄
- H₂O ad 1 l

<u>Coomassie Fixierlösung:</u>	50% Methanol 10% Eisessig 40% H ₂ O
<u>Coomassie Färbelösung:</u>	50% Methanol 0,05% CBB-R250 (lösen in Methanol) 10% Eisessig 40% H ₂ O
<u>Coomassie Entfärbungslösung:</u>	7% Eisessig 5% Methanol 88% H ₂ O
<u>Hämalaun nach Mayer:</u>	1g Hämatoxylin 0,2g Natriumiodat 50g Kaliumaluminiumsulfat 1000ml Aqua bidest 50g Chloralhydrat 1g kristalline Zitronensäure

8.1.7.2 Western Blot

<u>Lämmli-Puffer:</u>	1 % Triton X-100 150 mM NaCl 10 mM TRIS pH 8.0 2 mM EDTA
<u>RIPA Puffer:</u>	2 % SDS 150 mM NaCl 10 mM TRIS pH 8.0 50 mM NaF
<u>SDS-PAGE Laufpuffer:</u>	15,14 g Tris 72 g Glyzin 5 g SDS H ₂ O ad 5 l
<u>Transferpuffer:</u>	25 mM Tris 0,2 M Glyzin 20 % Methanol p.a. H ₂ O ad 1 l
<u>PBS-T:</u>	PBS 0,05 % Tween
<u>Blockierlösung:</u>	PBS 0,05 % Tween 3% Magermilchpulver

<u>Ponceaurot S-Lösung:</u>	2 % Ponceau S 30 % Trichloressigsäure 30 % Sulfosalicylsäure
<u>Detektionslösung:</u>	Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (ThermoScientific)

8.1.7.3 Sonstige

<u>HEPES 0,5 M (pH 7,4):</u>	25 ml HEPES 1M 25 ml Aqua dest NaOH 0,1 M q.s.
<u>TBE:</u>	108g Tris 55g Borsäure 40ml 0,5M EDTA pH 8,0
<u>TNES:</u>	10mM Tris pH7,5 400mM NaCl 100mM EDTA pH8,0 0,6% SDS
<u>HBSS:</u>	5,4 mM KCl 0,3 mM Na ₂ HPO ₄ 0,4 mM KH ₂ PO ₄ 4,2 mM NaHCO ₃ 1,3 mM CaCl ₂ 0,5 mM MgCl ₂ 0,6 mM MgSO ₄ 137 mM NaCl 5,6 mM D-Glucose H ₂ O ad 1 l

8.1.8 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller / Lieferant</u>
Blockcycler "Labcycler"	Sensoquest GmbH
Brückenverstärker "FE221"	ADInstruments
Drucksensor "MLT844"	ADInstruments
Durchflusszytometer "BD FACS Aria liu"	BD Biosciences
Elektrophorese-System „EV231“	Consort
Flammenphotometer "Sherwood Modell 410"	Kleinfeld Labortechnik
Fluoreszenz-Mikroskop "Observer Z1"	Zeiss

Fluoreszenzspektrometer "Nanodrop ND-3300"	ThermoScientific
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories
GFR-Kammern	Braintree scientific
Hämatokrit-Zentrifuge "210"	Hettich
Homogenisator "Ultra-Turrax T25"	Janke & Kunkel
Imager „Fusion FX7“	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Isofluran-Verdampfer	Harvard Apparatus GmbH
Light Cyclers "LC480"	Roche
Maus-Operationstisch, beheizbar	KE Med. Techn. Gerätebau
Metabolische Käfige "MMC 100"	Hatteras Systems Inc.
Narkosegas-Absorber	Harvard Apparatus GmbH
Operationsbesteck	FST
OP-Lichtmikroskop	Zeiss
Perfusionspumpe	Watson Marlow
PowerLab	ADInstruments
Retraktoren	FST
Spritzenpumpe "AL-300"	WPI
Stereomikroskop "Discovery V8"	Zeiss
Stereomikroskop "Stemi 2000"	Zeiss
Tail-Cuff-Blutdruckmesssystem	TSE Deutschland
Tischzentrifuge	Neolab
UV / VIS-Spektrometer "Nanodrop ND-1000"	ThermoScientific
UV-Tisch „N 90 MV 312 nm“	Faust
Western Blot Apparatur	BioRad
Zentrifuge "541702"	Eppendorff

8.1.9 Verwendete Software

Microsoft Office 2010

ImageJ 1.4.3 (2006)

Visiview 2.1.4

Labchart 8

GraphPad Prism 6

Axiovision Zeiss

LightCycler 480 SW 1.5

Endnote 7

8.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celcius
A	Filtrationsfläche
ANOVA	engl. "Analysis of variances", Varianzanalyse
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
Bp	Basenpaare
BSA	bovines (Rinder-) Serumalbumin
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
Cy	Cyanin
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylidcarbonat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DOCA	Deoxycorticonsteronacetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorecence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
for	forward
FSGS	Fokale segmentale Glomerulosklerose
g	Gramm
GC-A	Guanylatcyclase A, auch NPR-A
GC-B	Guanylatcyclase B, auch NPR-B
GFP	Green fluorescent protein
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBSS	Hank`s Buffered Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1
IPN	Isoliert perfundierte (Mäuse-) Niere
k	Kilo
K _f	Filtrationskoeffizient
Kg	Kilogramm

KG	Körpergewicht
KGW	Körpergewicht
KO	Knockout
L	osmotische Wasserpermeabilität der glomerulären Kapillaren
L	Liter
LoxP	Locus of X-over of P1
m	Milli
m	Meter
M	Molar
MeOH	Methanol
min	Minute
mmHg	Millimeter an der Quecksilbersäule, Einheit des Druckes
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
n	Stichprobenmenge, Anzahl
n	Nano
n.s.	Nicht signifikant
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat-Oxidase
NIH	National Institute of Health
NP(s)	Natriuretische(s) Peptid€
NPPA	Natriuretic peptide precursor A
NPPB	Natriuretic Peptide Precursor B
NPR-A	Natriuretischer Peptid Rezeptor A, auch GC-A
NPR-B	Natriuretischer Peptid Rezeptor B, auch GC-B
NPR-C	Natriuretischer Peptid Rezeptor C
O ₂	Sauerstoff
OP	Operation
p	Piko
P _B	hydrostatischer Druck in der Bowman-Kapsel
PBS	Phosphat buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
P _{GK}	hydrostatischer Druck in glomerulären Kapillaren
P _{net}	Nettofiltrationsdruck
Podo	Podocin
rev	reverse
RFP	Red fluorescent protein
ROS	reactive oxygen species = Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Sek.	Sekunde
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
US	United States
WT	Wildtyp
μ	Mikro
π _B	onkotischer Druck in der Bowman-Kapsel
π _{GK}	onkotischer Druck in den glomerulären Kapillaren

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Niere und des Nephrons.....	5
Abb. 3-2: Schematische Darstellung des Glomerulus.....	6
Abb. 3-3: Determinanten der GFR.....	8
Abb. 3-4: Schematische Darstellung und elektronenmikroskopische Aufnahme der glomerulären Filtrationsbarriere.	10
Abb. 3-5: Podozytäre Schlitzmembran und Komponenten des Zytoskeletts der Fußfortsätze (angelehnt an Pavenstädt 2003 ¹⁶ und Noris 2012 ³⁹).	14
Abb. 3-6: Aminosäuresequenz und Struktur der natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP (modifiziert nach Potter et al. 2006 ⁹⁴).	20
Abb. 3-7: Topologie der GC-A im basalen, aktivierten und desensitierten Zustand (angelehnt an Kuhn 2003 ⁹⁰ und Potter 2001 ⁹⁷).	25
Abb. 3-8: cGMP abhängige Signalmechanismen (angelehnt an Feil 2006 ¹⁴⁹).....	27
Abb. 3-9: Interaktionen der kardialen natriuretischen Peptide mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und dem sympathischen Nervensystem (SNS) (modifiziert nach Volpe 2014 ¹¹⁵).	30
Abb. 4-1: Generierung der Podo GC-A KO Maus anhand des Cre / LoxP-Systems.	35
Abb. 4-2: Versuchsaufbau zur BNP-Infusion am narkotisierten Versuchstier.	40
Abb. 4-3: Versuchsplan der sechswöchigen DOCA-Behandlung.	41
Abb. 4-4: Versuchsplan der zweiwöchigen DOCA-Behandlung mit gleichzeitiger Applikation des TRPC-Kanalblockers SKF 96365.....	42
Abb. 5-1: DNA-Genotypisierung der Podo GC-A Mäuse auf einem 2%igem Argarosegel.....	64
Abb. 5-2: Fluoreszenz-Aufnahmen der Nierenschnitte von mTmG Mäusen.	65
Abb. 5-3: Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen des Glomerulus einer Podo GC-A mTmG Maus und Co-Färbung mit Synaptopodin.	66
Abb. 5-4: Überprüfung der Reinheit der Zellsuspension nach FACS anhand der mRNA Expression spezifischer Marker-Gene.....	67
Abb. 5-5: mRNA Expression der Guanylatzyklase A nach Isolierung der Podozyten von Podo GC-A WT und KO Mäusen mittels FACS.	68
Abb. 5-6: mRNA Expression von Downstream-Proteinen der NP / GC-A-Signalkaskade, bezogen auf das Housekeeper-Protein 18s.....	69
Abb. 5-7: mRNA Expression regulatorischer Rezeptoren in isolierten Podozyten von Podo GC-A KO und WT Mäusen, bezogen auf 18s.	69
Abb. 5-8: Einzel-Nieren-GFR von Podo GC-A KO und WT Mäusen sowie konventionellen GC-A KO Mäusen (Daten aus der Dissertation von Dr. Andrea Schreiber ²⁴⁵) vor und drei bis vier Tage nach Uninephrektomie.	72
Abb. 5-9: Plasma BNP-Konzentration der Versuchstiere unter Kontrollbedingungen und nach 30-minütiger BNP-Infusion	73
Abb. 5-10: BNP-Infusion in narkotisierten Podo GC-A KO und WT Mäusen sowie konventionellen GC-A KO Mäusen	75
Abb. 5-11: Veränderungen des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz in Podo GC-A KO und WT Mäusen im Verlauf sechswöchiger DOCA-Behandlung.....	77
Abb. 5-12: Regulierung des RAAS-Enzyms Renin in DOCA-behandelten Podo GC-A KO und WT Mäusen.....	77

Abb. 5-13: Hypertrophie der Nieren von Podo GC-A KO (n=7) und WT (n=6) Mäusen nach sechswöchiger DOCA-Behandlung	78
Abb. 5-14: Einzel-Nieren-GFR der Podo GC-A KO und WT Mäuse infolge sechswöchiger DOCA-Behandlung	79
Abb. 5-15: Albumin-Exkretion in Podo GC-A KO und WT Mäusen infolge DOCA-Behandlung.	80
Abb. 5-16: HE-Färbung der Nierenschnitte nach DOCA-Salz-Behandlung.	81
Abb. 5-17: Mesangiale Expansion in Podo GC-A KO und WT Mäusen infolge sechswöchiger DOCA-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten (sham) Tieren beider Genotypen.....	82
Abb. 5-18: DOCA-Behandlung führt zu erhöhter Expression des Fibrose-Marker-Proteins alpha-SMA in Podo GC-A KO Mäusen.	83
Abb. 5-19: Masson-Goldner-Färbung der Nierenschnitte unbehandelter (sham) und DOCA-behandelter Podo GC-A KO und WT Mäuse	84
Abb. 5-20: Schädigung der Podozyten in DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen.....	85
Abb. 5-21: podozytäre Apoptose nach DOCA-Salz-Behandlung.	86
Abb. 5-22: Reduzierte Expression von Podocin und Synaptopodin in den Podozyten der DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäuse.	87
Abb. 5-23: Genexpression Oxidativer-Stress-Marker in den Podozyten DOCA-behandelter Podo GC-A KO und WT Mäuse.	89
Abb. 5-24: Analyse des Oxidativen Stress-Markers 4-Hydroxynonenal (4-HNE) nach sechswöchiger DOCA-Behandlung.....	90
Abb. 5-25: TRPC6-Expression in Podo GC-A KO und WT Mäusen infolge sechswöchiger DOCA-Behandlung.	92
Abb. 5-26: mRNA Expression der TRPC-Kanal-Proteine in den Glomeruli von sham- und DOCA-behandelten Podo GC-A KO und WT Mäusen.....	93
Abb. 5-27: Bestimmung des Calcium-Influx in Podozyten isolierter Glomeruli von Podo GC-A KO und WT Mäusen ohne und nach zwölf-tägiger DOCA-Behandlung.	96
Abb. 5-28: Proteinexpression des TRPC6-Kanals in DOCA-behandelten Podo GC-A KO und WT Mäusen.	97
Abb. 5-29: Hämodynamische und renale Parameter in Podo GC-A KO und WT Mäusen ohne und nach zweiwöchiger DOCA- und SKF-Behandlung.	99
Abb. 5-30: Albumin-Exkretion in Spontanurinproben von Podo GC-A KO und WT Mäusen im Verlauf einer zweiwöchigen DOCA-Behandlung mit und ohne paralleler Applikation von SKF	100
Abb. 5-31: Verminderung der mesangialen Expansion durch Applikation von SKF 96365 in DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen.	101
Abb. 5-32: Verminderung der Podozyten-Schädigung in DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen durch simultane Verabreichung von SKF 96365.....	102
Abb. 5-33: Erhalt des Schlitzmembranproteins Podocin in DOCA / SKF-behandelten Podo GC-A KO Glomeruli.	103
Abb. 5-34: Die Applikation von SKF führt zum Erhalt der Podozyten in DOCA-behandelten Podo GC-A KO Mäusen.....	104
Abb. 5-35: SKF-Behandlung führt zu geringen Spiegeln des ROS-Marker-Proteins 4-HNE in den Glomeruli der Podo GC-A KO Mäuse.	104
Abb. 6-1: Mögliche Mechanismen der GFR-Steigerung durch die natriuretischen Peptide.....	109
Abb. 6-2: Mögliche Schädigungsmechanismen im Podozyten und Angriffspunkte der kardialen natriuretischen Peptide. Quellen: siehe Fließtext.....	115

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Gene, deren Mutationen die Podozyten-Struktur und -Funktion beeinträchtigen und mit einer Proteinurie einhergehen (angelehnt an Greka und Mundel 2012 ¹⁷).	17
Tabelle 3-2: Vergleich von ANP und BNP (zusammengefasst aus ^{94,114,115})	22
Tabelle 3-3: Mausmodelle mit genetischer Veränderung der GC-A.	26
Tabelle 3-4: Effekte der NP auf Blutdruck und Blutvolumen.	29
Tabelle 4-1: Mastermix-Zusammensetzung für die Genotypisierungs-PCR.	37
Tabelle 4-2: Amplifizierungs-Protokoll der Genotypisierungs-PCR.....	38
Tabelle 4-3: Versuchsprotokoll der BNP-Infusion in anästhesierten Mäusen.	40
Tabelle 4-4: Scherprotokoll zum Erhalten einer Einzelzellsuspension aus frisch isolierten Glomeruli.	51
Tabelle 4-5: Mastermix-Zusammensetzung für die reverse Transkription.	53
Tabelle 4-6: Mastermix-Zusammensetzung für die qPCR..	54
Tabelle 4-7: Amplifizierungs- und Schmelz-Protokoll der qPCR.....	54
Tabelle 5-1: Physiologische Parameter von unbehandelten Podo GC-A WT und KO Mäusen.	70
Tabelle 5-2: Auflistung der Werte analog zu Abb. 5-10.	75
Tabelle 5-3: Physiologische Parameter von Podo GC-A KO und WT Mäusen ohne (sham) und nach zweiwöchiger DOCA- und DOCA + SKF-Behandlung.	98

8.5 Erklärungen zum Copyright

Grundlagen und bisherige Erkenntnisse:

Abb. 3-6: Die Zeitschrift „Endocrine Reviews“ gestattet freundlicherweise die Übernahme der Abbildung zur Veröffentlichung in dieser Dissertationsschrift.

(Originalartikel: <https://doi.org/10.1210/er.2005-0014>)

Abb. 3-9: Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung des „International Journal of Cardiology“ gedruckt.

(Originalartikel: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.08.032>)

Ergebnisse:

Ein Großteil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde im „Journal of the American Society of Nephrology“ publiziert. Das Journal genehmigt freundlicherweise die Veröffentlichung der Daten in dieser Dissertationsschrift.

(Originalartikel: <https://doi.org/10.1681/ASN.2015070731>)

Abb. 5-8: Die Daten zur Untersuchung der konventionellen GC-A KO Mäuse stammen aus der Dissertation von Dr. Andrea Schreiber und wurden mit freundlicher Genehmigung der Universitätsbibliothek Regensburg gedruckt.

(Originalschrift: <urn:nbn:de:bvb:355-epub-255466>)

9 Anhang II

9.1 Publikationen

Staffel, J, Valletta, D, Federlein, A, Ehm, K, Volkmann, R, Fuchsl, AM, Witzgall, R, Kuhn, M, Schweda, F: Natriuretic Peptide Receptor Guanylyl Cyclase-A in Podocytes is Renoprotective but Dispensable for Physiologic Renal Function. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2016.

Demerath T, **Staffel J**, Schreiber A, Valletta D, and Schweda F. Natriuretic peptides buffer renin-dependent hypertension. *American journal of physiology Renal physiology* 306: F1489-1498, 2014.

R. Hennig, A. Ohlmann, **J. Staffel**, K. Pollinger, A. Haunberger, M. Breunig, F. Schweda, E.R. Tamm, A. Goepferich, Multivalent nanoparticles bind the retinal and choroidal vasculature, *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 220 (2015) 265-274.

9.2 Präsentationen

9.2.1 Posterpräsentationen

Kongress für Nephrologie 2013, Berlin

05.10.2013 - 08.10.2013

Janina Staffel, Andrea Schreiber, Daniela Valletta, Frank Schweda:

„Renale kompensatorische Hypertrophie: Rolle des B-type natriuretischen Hormons BNP“

93rd Annual Meeting of the German Physiological Society, Mainz

13.03.2014 - 15.03.2014

Janina Staffel, Andrea Schreiber, Daniela Valletta and Frank Schweda:

“The role of BNP in the renal adaptation to loss of kidney tissue”

94nd Annual Meeting of the German Physiological Society, Magdeburg

05.03.2015 - 08.03.2015

Janina Staffel, Daniela Valletta, Michaela Kuhn, Frank Schweda:

“Natriuretic peptides exert marked renoprotective effects via activation of the natriuretic peptide receptor GC-A in podocytes”,

ausgezeichnet mit dem Posterpreis der „Deutschen physiologischen Gesellschaft“ in der Kategorie “Renal functions“

9.2.2 Vorträge

Experimental Biology Meeting 2015, Boston (MA)

28.03.2015 - 01.04.2015

Janina Staffel, Daniela Valletta, Anna Federlein, Michaela Kuhn, Frank Schweda:
“Natriuretic Peptides Exert Marked Renoprotective Effects via Activation of the
Natriuretic Peptide Receptor GC-A in Podocytes”

95th Annual Meeting of the German Physiological Society, Lübeck

03.03.2016 - 05.03.2016

Janina Staffel, Daniela Valletta, Anna Federlein, Michaela Kuhn, Frank Schweda:
“Natriuretic peptides exert marked renoprotective effects via guanylyl cyclase-A
dependent suppression of TRPC6 in podocytes”

9.3 Danksagung

An dieser Stelle ist es mir sehr wichtig, allen Personen zu danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu allererst gilt mein Dank meinem Betreuer **Prof. Frank Schweda** für die Überlassung dieses interessanten Themas und vor allem für die viele Zeit, die er in meine Betreuung investiert hat. Ich wüsste niemanden, auf den die Bezeichnung „Doktorvater“ besser zutrifft als auf ihn. Ich danke ihm für seine stets offene Tür, seine freundschaftliche und offene Art und die motivierende Gespräche, die mir geholfen haben, über mich hinauszuwachsen.

Als nächstes möchte ich mich bei meinen wunderbaren Arbeitskollegen der **AG Schweda** bedanken, die in den letzten vier Jahren zu meiner zweiten Familie geworden sind: **Regine**, meiner lieben Arbeits-Mama, danke ich für die Rundumbetreuung in und auch außerhalb des Labors und vor allem dafür, dass sie mir immer wieder klar macht, dass Aufgeben einfach keine Option ist. **Kathi**, unserer Meisterin der Pipettierkunst, danke ich für die Hilfe bei der RNA-Isolierung und der qPCR. Danke auch für die tollen Gespräche, den Zuspruch, die Umarmungen und die Schoki. Unserer Postdoc **Daniela** danke ich dafür, dass sie mir einen Teil ihres umfangreichen molekulargenetischen Wissens vermittelt und damit das Primer designen und die Auswertung der mRNA-Daten erleichtert hat. Abgesehen davon hätte ich diverse Vorträge, Posterpräsentationen und vor allem den schriftlichen Teil der Doktorarbeit ohne sie nicht gemeistert. Danke fürs Händchenhalten, das Korrekturlesen, das gute Zureden und das Mut machen. **Friedl**, unserer Mäuse-Mama, danke ich für ihre Hilfe bei der Genotypisierung der Versuchstiere, für ihre Hilfsbereitschaft und ihre lieben Worte. Meiner Mitstreiterin **Anna** danke ich für die Hilfe bei den Färbungen der Nierenschnitte, die Einweisung ins Mikroskop, für die lustigen Gespräche und die gemeinsame Zeit während der Kongresse. Ein großer Dank auch an **Robert** für die Hilfe bei der Mausperfusion und seine vollen Schubladen, sowie für die netten Unterhaltungen in der Küche. Und auch unserem Neuzugang **Andrea** möchte ich für ihre hilfreichen Tipps beim Erstellen des schriftlichen Teils dieser Arbeit danken. Liebe **AG Schweda**, bin sehr froh darüber, dass ihr mich vor vier Jahren in eurer Mitte aufgenommen habt und mir über die gesamte Zeit immer eine unverzichtbare Hilfe wart. Danke, dass ihr dafür gesorgt habt, dass ich jeden Tag in der Arbeit genossen habe. Ich bin dankbar für jedes Frühstück, jedes Mittagessen, jeden Abend und jede Feier, die wir miteinander verbracht haben!

Apropos Frühstück, den anderen Teilnehmern unserer „Küchen-Connection“, **Ines, Brigitte und Hilde** danke ich ebenfalls für die lustigen Gespräche und die nützlichen Tipps für Labor, Haushalt und das Leben!

Außerdem möchte ich mich herzlich bei den Mitgliedern der **AG von Prof. Hayo Castrop** für ihre Hilfsbereitschaft und die Zurverfügungstellung diverser Labor-Gerätschaften bedanken. Besonders ihrer ehemaligen Mitarbeiterin **Dr. Katharina Ebert** danke ich für ihre Hilfe beim Erlernen der *in vivo*-Methoden. Den Mitarbeitern der **AG von Prof. Richard Warth** danke ich ebenfalls für ihre Hilfsbereitschaft, vor allem in den ersten Monaten meiner Doktorandenzeit. Allen weiteren **Mitarbeitern der Institute für Physiologie und Molekulare Zellbiologie** danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre, den freundlichen Umgang miteinander und die Hilfsbereitschaft, die man sich hier immer entgegenbringt. Besonders **Evi, Ilona, Philipp, Katha, Carsten, Anna, Alex** und **Julia** danke ich für die schöne Zeit in und außerhalb des Instituts.

Meiner Familie, die gerade in der letzten Zeit oft auf mich verzichten musste, danke ich für ihr Verständnis und ihre Rücksichtnahme. Vor allem meinem **Vater Wolfgang** danke ich dafür, dass er mir meine Ausbildung ermöglicht hat, niemals an mir zweifelt und mich in jedem meiner Vorhaben unterstützt. Bei meinen „Geschwistern“ **Christian, Lysann, Diana** und **Beni** möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir den nötigen Halt geben und jederzeit für mich da sind!

Ein großer Dank geht auch an meine wunderbaren Freunde **Vroni, Johanna** (danke für das Korrekturlesen!), **Sarah und Micha**, die immer wussten, wie es mir ging, weil es ihnen genauso ging. Es ist schön, Menschen um sich zu haben, von denen man verstanden und jederzeit unterstützt wird.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine liebe Freundin **Ina**, die mich zu dieser Doktorarbeit ermutigt hat, nie an mir zweifelt und mich immer wieder dazu bringt, auch selbst an mich zu glauben! Ich danke ihr für das Korrekturlesen, die tollen Gespräche und für die tiefe Freundschaft, die uns verbindet.

Meinem Partner **Dominik** danke ich für seine Liebe, seine Geduld und dafür, dass er den Menschen in mir sieht, der ich gern sein möchte.

Auch seiner Mutter **Claudia** danke ich für ihre Fürsorge und ihre hilfreichen Ratschläge.

Allen im Methodenteil dieser Arbeit erwähnten Personen danke ich nochmals recht herzlich für ihre tatkräftige Unterstützung und Hilfe!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben und hier nicht namentlich erwähnt wurden.