AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PHYSIOLOGIE
PROF. DR. ARMIN KURTZ
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

NEPHROPROTEKTIVE EFFEKTE DER PODOCYTÄREN GUANYLAT-CYCLASE A

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER MEDIZIN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON
STEFAN STRÖHL
AUS SULZBACH-ROSENBERG

MMXVII

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
Erster Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Frank Schweda
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Matthias Mack
Tag der mündlichen Prüfung:	06. September 2017

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG 5

II. THEORETISCHER HINTERGRUND 7

1. Aufbau und Funktion der Niere 7

2. Glomerulärer Filterapparat und Podocyten 10

2.1. Filtrationsbarriere 10

2.2. Podocyten 13

3. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System 16

4. Chronische Niereninsuffizienz 18

4.1. Nierenersatztherapie 18

4.2. Definition und Abstufung der CKD 18

4.3. Prognose 19

4.4. Ätiologie und Pathophysiologie 20

4.5. Medikamentöse Therapie 25

5. Natriuretische Peptide 27

5.1. Allgemeine Wirkungen 27

5.2. Spezielle Effekte auf den Podocyten 30

III. METHODEN 34

1. Versuchstiere und Haltung 34

2. Übersicht über den Versuchsablauf 35

3. Einseitige Nierenarterienstenose 36

4. Messung physiologischer Parameter 37

4.1. Blutdruck und Herzfrequenz 37

4.2. Plasmarenin 37

4.3. Hämatokrit und Körpergewicht 38

4.4. Glomeruläre Filtrationsrate 38

5. Urinanalyse 38

5.1. Spontan- und Sammelurin 38

5.2. Bestimmung von Elektrolyten und Osmolarität 39

5.3. Albumin- und Kreatinin-Messung 39

6. Untersuchung der entnommenen Organe 40

6.1. Organentnahme 40

6.2. Isolierung von RNA 40

INHALTSVERZEICHNIS

6.3. Reverse Transkription und quantitative real time PCR 40

IV. ERGEBNISSE 41

1. Physiologische Parameter 42

1.1. Blutdruck und Herzfrequenz 42

1.2. Renin 43

1.3. Hämatokrit und Körpergewicht 44

1.4. Glomeruläre Filtrationsrate 45

2. Urinanalyse 46

2.1. Elektrolytgehalt 46

2.2. Albuminausscheidung 48

3. Untersuchung der entnommenen Organe 49

3.1. Makroskopischer Aspekt und Gewicht 49

3.2. RNA-Expressionsraten 50

V. DISKUSSION 54

VI. KURZFASSUNG/ABSTRACT 66

VII. ANHANG 69

Danksagung 69

Lebenslauf 70

Protokolle und Materialien 71

Abkürzungsverzeichnis 74

Tabellenverzeichnis 75

Abbildungsverzeichnis 76

Literaturverzeichnis 77

Selbstständigkeitserklärung 92

I. EINLEITUNG

Während bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts ein länger anhaltendes Versagen der Nieren praktisch immer tödlich endete, lässt sich deren Funktion heutzutage zumindest zeitweise durch Dialyse oder dauerhaft durch Transplantation ersetzen. Diese Verfahren sind jedoch mit erheblichen Einschränkungen und Risiken verbunden bzw. in ihrer Verfügbarkeit stark begrenzt, was vor allem bei der Behandlung von chronischer Niereninsuffizienz ein großes Problem darstellt. Dort gilt es, den Progress der Erkrankung zu verzögern oder im Optimalfall sogar aufzuhalten, um eine ausreichende Nierenfunktion möglichst lange zu bewahren. Hierfür werden, neben der Behandlung der Grunderkrankung und Vermeidung nephrotoxischer Substanzen, gemäß den aktuellen Leitlinien hauptsächlich Antagonisten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) eingesetzt (KDIGO-CKD-3, 2013). Einen neueren Therapieansatz stellt die Kombination einer RAAS-Blockade mit Neprilysin-Inhibitoren dar. Diese hemmen unter anderem den Abbau natriuretischer Peptide, welche als physiologische Gegenspieler der RAAS-Signalkaskade agieren. Die beiden Hauptvertreter ANP und BNP (atrial/brain-type natriuretic peptide) sollen so über eine Beeinflussung des Blutdrucks und des Elektrolythaushalts sowie möglicherweise auch über lokale Wirkungen in der Niere den Progress der Niereninsuffizienz verlangsamen (Judge, et al., 2014). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht genauer erforscht. Nach heutigem Wissensstand kann nur unzureichend beantwortet werden, inwieweit dieses therapeutische Potential auf systemische oder nierenspezifische Effekte zurückzuführen ist.

Ein möglicher Angriffspunkt der nierenspezifischen Wirkungen natriuretischer Peptide könnte der Podocyt sein, der ein zentraler Bestandteil des glomerulären Filtrationsapparates ist. Es gibt bereits ältere Arbeiten, die Hinweise auf eine solche Wirkung auf den Podocyten liefern (Ogawa, et al., 2012; Fang, et al., 2013). Bei den dort durchgeführten Untersuchungen am Tiermodell wurde jedoch keine Unterscheidung zwischen renaler und systemischer Wirkung der natriuretischen Peptide getroffen, da ein globaler Knockout des ANP/BNP-Rezeptors, der Guanylatcyclase A, verwendet wurde. Diese Problematik wurde in Experimenten an definierten und modifizierten Zelllinien umgangen. Solche *in vitro* gemachten Beobachtungen können hingegen ungleich schwerer auf den Menschen übertragen werden, da sich vor allem die den Podocyten umgebenden Strukturen und die Einbindung in das Glomerulum kaum nachstellen lassen.

Indem mit Hilfe des lox/Cre-Systems ein Podocyten-spezifischer Knockout der Guanylatcyclase A erzeugt wurde, konnten Staffel et al. erstmals die Vorteile der Zellkultur mit denen des Mausmodells kombinieren. Zusätzlich wurde zur Provokation von Nierenschäden eine Uninephrektomie durchgeführt, eine kochsalzreiche Diät angeboten und über mehrere Wochen der Aldosteron-Agonist DOCA (Deoxycorticosteronacetat) appliziert, was bei allen Tieren zu einem mäßigen arteriellen Hypertonus führte. Bei den Knockout-Mäusen kam es darüber hinaus zu einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate und einer massiven Proteinurie, was grundsätzlich eine direkte nephroprotektive Wirkung natriuretischer Peptide bestätigt (Staffel, et al., 2017). Dieses Schädigungsmodell bildet allerdings nur einen kleinen Teil klinisch relevanter Nierenerkrankungen ab. In den weitaus meisten Fällen liegt nicht eine isolierte Aldosteron-Erhöhung (mit entsprechender Suppression von Renin und Angiotensin II) vor, sondern es kommt zu einer übermäßigen Aktivierung des gesamten RAAS.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls mit dem lox/Cre-System ein spezifischer Knockout der Guanylatcyclase A im Podocyten generiert. Als Schädigungsmodell hingegen wurde die einseitige Nierenarterienstenose gewählt, die eine vollständige RAAS-Aktivierung zur Folge hat. Mittels eines Clips wird dabei eine Arteria renalis verengt, die kontralaterale Seite nativ belassen. Diese Prozedur provoziert eine erhöhte Sekretion von Renin in der stenosierten Niere, was zu einer Aktivierung des RAAS mit konsekutivem Bluthochdruck führt und schließlich in eine hypertensive Nephropathie mündet (Goldblatt, et al., 1934). Die Auswirkungen der Operation auf die Nierenfunktion und das Ausmaß der renalen Schädigung wurden zwischen Knockouts und Wildtypen verglichen. Weiterhin wurden Effekte auf den Elektrolyt- und Volumenhaushalt sowie die Kreislaufregulation untersucht. Aus den Unterschieden zwischen den Genotypen wurde auf einen Einfluss des ausgeschalteten NP-Rezeptors im Podocyten geschlossen. Damit soll diese Arbeit einen Beitrag zur genaueren Charakterisierung der Funktion der podocytären Guanylat-Cyclase A liefern und deren Wirkungen von jenen abgrenzen, die systemisch über die glatte Gefäßmuskulatur, das Endothel und die Nierentubuli vermittelt werden. Weiterhin soll diese Arbeit helfen, die Pathophysiologie chronischer Nierenschädigung besser zu verstehen. Insbesondere durch das verwendete Modell der einseitigen Nierenarterienstenose soll genauer charakterisiert werden, in welchem Maße natriuretische Peptide im Podocyten Schäden entgegenwirken können, die über Angiotensin II und arterielle Hypertonie vermittelt werden. Dadurch soll diese Arbeit dazu beitragen, Kompensationsmechanismen aufzudecken, aus welchen sich möglicherweise neue Therapieoptionen ableiten lassen.

II. THEORETISCHER HINTERGRUND

1. AUFBAU UND FUNKTION DER NIERE

Die Niere ist ein lebenswichtiges Organ, dessen Hauptfunktion die Filtration des Blutes zur Ausscheidung wasserlöslicher Stoffwechselendprodukte und Giftstoffe im Harn ist. Sie hat des Weiteren endokrine Funktionen; über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist sie beispielsweise maßgeblich an der Regulation des Blutdrucks sowie des Elektrolyt- und Wasserhaushalts beteiligt. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung eines nahezu konstanten pH-Wertes im Blut, sie synthetisiert das für den Calciumstoffwechsel nötige Vitamin D_3 sowie Erythropoietin für Blutbildung.

Einführend soll zunächst eine Übersicht über den Aufbau des gesamten Organs gegeben werden. Bei weiterführendem Interesse sei auf die entsprechenden Standardwerke der Histologie (Lüllmann-Rauch, 2009), Biochemie (Löffler, et al., 2007) und Physiologie (Klinke, et al., 2010) verwiesen, auf die sich, sofern nicht anders vermerkt, diese Einführung stützt. Anschließend wird vertiefend auf Details des glomerulären Filtrationsapparates mit den zugehörigen Podocyten eingegangen und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System näher erläutert.

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere stellt das Nephron dar (siehe Abbildung 1), das aus dem Glomerulum (vereinfachend mit dem Nierenkörperchen gleichgesetzt) und den zugehörigen Tubuli besteht. Ersteres ist ein Knäuel aus Kapillaren mit variablem Zu- und Abfluss und stellt eine Filtervorrichtung dar, die unter Druck Wasser und darin gelöste niedermolekulare Stoffe wie Glucose aus dem Blut abpresst, wogegen große Moleküle wie z.B. Immunglobuline zurückgehalten werden. Dieses Ultrafiltrat wird in einem Hohlraum, der Bowman-Kapsel, aufgefangen und läuft über das Tubulussytem ab, das aus verschiedenen Segmenten besteht, die hintereinander geschalteten sind. Dort finden sowohl eine Rückresorption abfiltrierter Stoffe als auch sekretorische Vorgänge sowie die Aufkonzentrierung des Endharns statt.

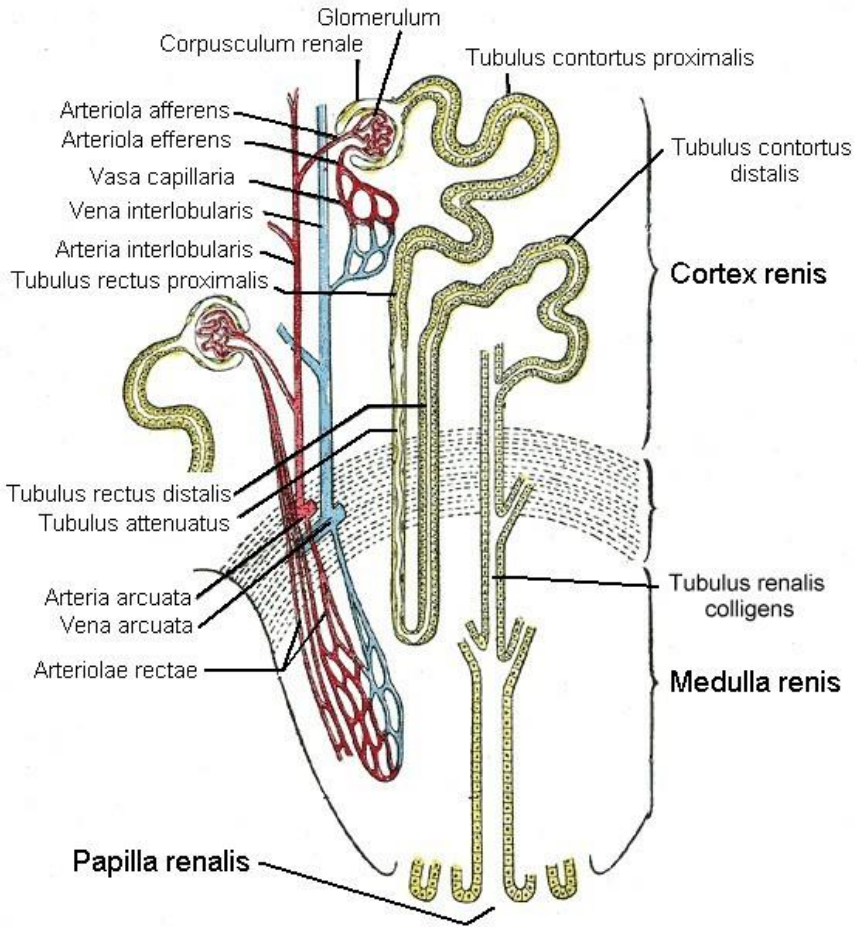

Abbildung 1: Nephron

Vereinfachte Übersicht über das funktionelle Kernstück der Niere. Die verzweigten Kapillaren des Glomerulum sind arteriell rot bzw. venös blau dargestellt, das Tubulussystem, welches den Primärharn führt und in seinen verschiedenen Abschnitten in den Endharn umwandelt, gelb [nach Carter (Carter, 1918)].

Das Glomerulum (siehe Abbildung 2) besteht aus einem Kapillarknäuel mit einem zu- und einem abführenden Schenkel. Umgeben wird es von der sogenannten Bowman-Kapsel, deren äußeres Blatt den Kapselraum gegenüber dem Interstitium abgrenzt und am Harnpol in den proximalen Tubulus übergeht. Das innere Blatt besteht aus einer Schicht hochspezialisierter Zellen, den Podocyten, die mit dem fenestrierten Endothel und der glomerulären Basalmembran den Filter zwischen Blut- und Harnkompartiment bilden. Sie besitzen verzweigte, mit benachbarten Podocyten ineinander greifende Fußfortsätze mit negativ geladener Glykokalix, die das Kernstück des Filterapparates ausmachen. Gehen Podocyten zugrunde oder werden sie funktionsuntüchtig, so resultiert eine vermehrte Ausscheidung großer Plasmaproteine, insbesondere von Albumin. Rückgrat des Nierenkörperchens ist das Mesangium, an dem die Kapillarschlingen aufgehängt sind.

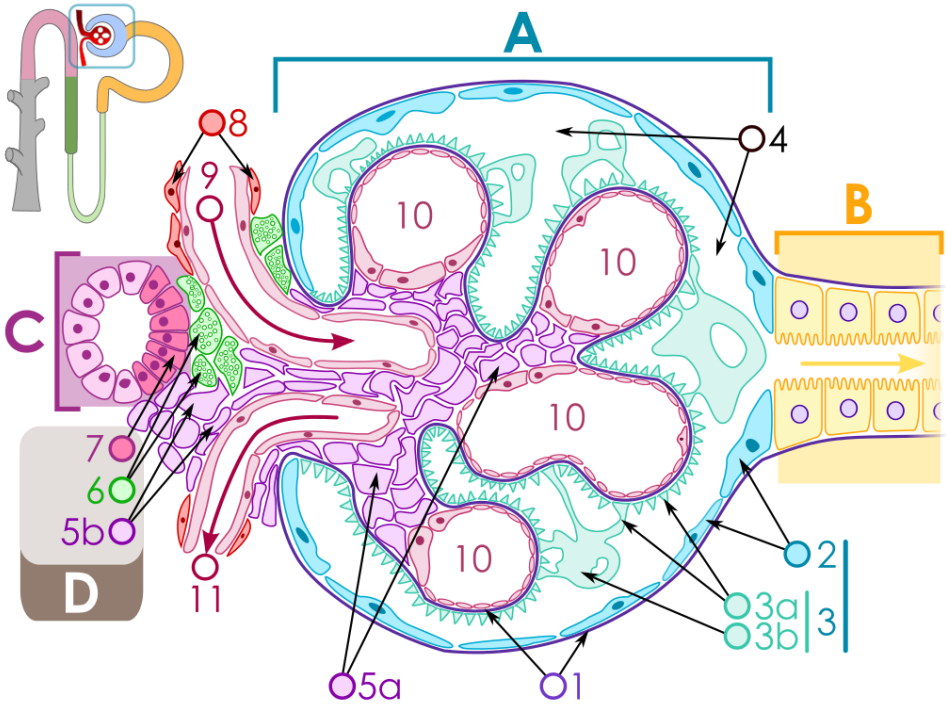

Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Glomerulum

A Nierenkörperchen. **B** Proximaler Tubulus. **C** Dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife. **D** Juxtaglomerulärer Apparat. **1** Basalmembran. **2/3** parietales bzw. viszerales Blatt der Bowman-Kapsel. **3a/b** Podocyt mit Fußfortsätzen. **4** Harnraum. **5a/b** intraglomeruläres bzw. extraglomeruläres Mesangium. **6** Juxtaglomeruläre Zellen. **7** Macula densa. **8** Muskelzellen der Arteriolenwand. **9** Arteriola afferens. **10** glomeruläre Kapillaren. **11** Arteriola efferens [nach Komorniczak (Komorniczak, 2009)].

Als Macula densa bezeichnet man Zellen des am Gefäßpol vorbeiziehenden zugehörigen distalen Tubulus, die zusammen mit extraglomerulären Mesangiumzellen den juxtaglomerulären Apparat bilden. Letztere reagieren auf erhöhte NaCl-Konzentration im distalen Tubulus mit einer Konstriktion des Vas afferens, wodurch der Blutfluss und die Filtrationsrate in diesem Nephron sinken. Dieser Mechanismus reguliert in jeder Filtrationseinheit individuell den Blutfluss und wird als tubuloglomeruläre Rückkopplung bezeichnet. Ein Abfall des renalen Blutdrucks dagegen stellt einen Stimulus zur Freisetzung von Renin dar. Die dadurch ausgelöste RAAS-Kaskade (siehe unten) hebt neben dem Blutdruck im gesamten Körper auch den intrarenalen Druck entsprechend wieder an.

Das Tubulussystem besteht aus mehreren Abschnitten, die hintereinander geschaltet sind. Zunächst gelangt der Primärharn, beim Gesunden immerhin etwa 180 Liter am Tag, in die proximalen Tubuli. Dort werden etwa zwei Drittel des Wassers wieder aufgenommen, wodurch mittels *solvent drag* auch Ionen mitgerissen werden. Hier findet das Gros der Reabsorption von Natrium im Symport mit Glucose oder Aminosäuren bzw. im Antiport mit

Protonen statt und auch filtrierte Proteine werden abhängig vom Cubilin/Megalin-Komplex endocytiert. Im Intermediärtubulus und im distalen Konvolut werden durch jeweils verschiedene Mechanismen weitere Ionen resorbiert, im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife beispielsweise Na^+, K^+ und Cl^- über den apikalen Kotransporter NKCC2 sowie basolaterale Chloridkanäle und KCl-Symporter. Die entstehende negative Überschussladung treibt dann wiederum Kationen wie Mg^{2+}, Ca^{2+} oder NH_4^+ in das Interstitium.

Durch die Aufnahme osmotisch wirksamer Teilchen in das Gewebe wird der Harn zunehmend hypoton. Da jedoch in den distalen Abschnitten das Epithel nahezu wasserdicht ist, kann sich die Flüssigkeit nicht frei verteilen. Die Diffusion erfolgt vielmehr abhängig vom Wasserbedarf des Körpers über den Einbau von Aquaporinen in die apikale Membran des Sammelrohrs, was durch Vasopressin vermittelt wird. Ebenfalls einen Einfluss hat das Mineralcorticoid Aldosteron, das über epitheliale Natriumkanäle die Aufnahme von Na^+-Ionen steigert (und gleichzeitig die Sekretion von K^+-Ionen verstärkt) und damit für eine erhöhte Wasserresorption sorgt. Die endgültige Konzentration des Harns kann beim Menschen dadurch Werte zwischen 50 und 1300 mosmol/l erreichen. Schließlich ist das Sammelrohr auch an der Säure-Base-Homöostase beteiligt, indem je nach Stoffwechsellage über die Schaltzellen mehr oder weniger Protonen ausgeschieden werden.

Neben dem Hormon Renin, das weiter unten ausführlich besprochen wird, produziert die Niere Erythropoietin, welches die Bildung roter Blutkörperchen im Knochenmark fördert. Eine weitere endokrine Funktion hat die Niere durch die Synthese von Calcitriol, der aktiven Form von Vitamin D_3, welches ein wesentliches regulatives Element des Calciumhaushalts und der Knochenmineralisierung darstellt.

2. GLOMERULÄRER FILTERAPPARAT UND PODOCYTEN

2.1. FILTRATIONSBARRIERE

Die glomeruläre Filtrationsbarriere, die in Abbildung 3 dargestellt ist, besteht aus drei Komponenten: dem Kapillarendothel, der Basalmembran und den Podocyten. Eine etwas ältere, jedoch sehr detaillierte Zusammenstellung bietet Deen (Deen, et al., 2001), einen aktuelleren Überblick gibt Lüllmann-Rauch (Lüllmann-Rauch, 2009).

Das Endothel ist auf der luminalen Seite von einer mehrere hundert Nanometer dicken Schicht aus einer membranständigen Glykokalix und einem über ionische Wechselwirkungen aufgelagerten Mantel aus Proteoglykanen bedeckt. Es wird von Fenstern ohne Diaphragma durchbrochen, die durch ihren geringen Durchmesser von etwa 60nm korpuskuläre Blutbestandteile wie Erythrozyten vom Durchtritt abhalten. Die dreischichtige glomeruläre Basalmembran (GBM) stellt die Verankerung sowohl der Endothelzellen als auch der Podocyten dar. Den Kern bildet die Lamina densa, die vor allem aus molekularen Netzen von Kollagen Typ IV sowie Laminin-11 und -521 gebildet wird (Haraldsson, et al., 2008; Pavenstädt, et al., 2003). Kollagen sorgt dabei für die mechanische Stabilität, Laminin dient der Zelladhäsion. Verbunden werden die beiden Netze über das Protein Nidogen und die Proteoglykane Agrin und Perlecan. Der Lamina densa liegen auf der Blutseite die Lamina rara interna und auf der Harnseite die Lamina rara externa an, in die jeweils Zelladhäsionsmoleküle des Endothels und der Podocyten einstrahlen und diese fixieren (Miner, 2012; Haraldsson, et al., 2008).

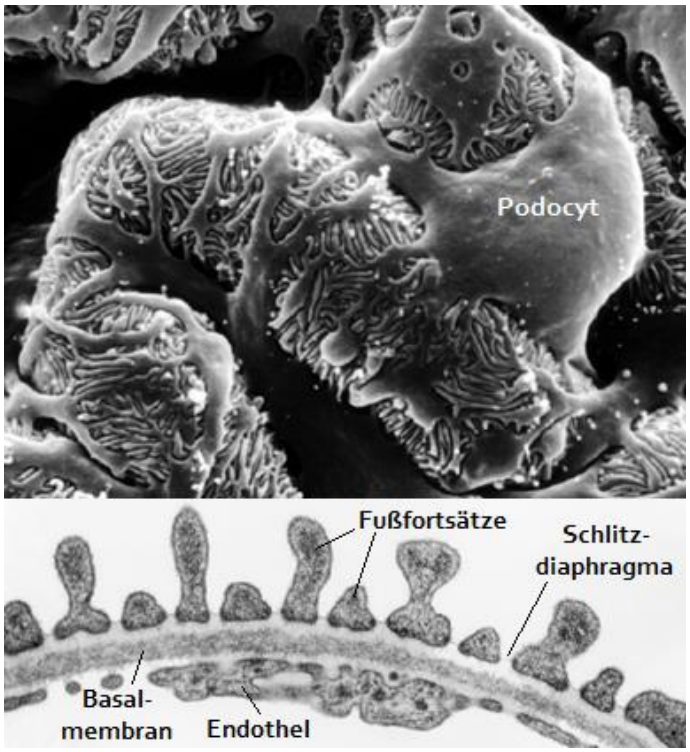

Abbildung 3: Glomeruläre Kapillaren und Blut-Harn-Schranke

Oben: Von einem Podocyten mit seinen Fußfortsätzen umschlungene glomeruläre Kapillaren. Ratte, 6000-fache Vergrößerung, Rasterelektronenmikroskop [nach Pavenstädt (Pavenstädt, et al., 2003)].

Unten: Filtrationsbarriere aus fenestriertem Endothel ohne Diaphragma, glomerulärer Basalmembran und Fußfortsätzen mit dazwischenliegendem Schlitzdiaphragma. Ratte, 48000-fache Vergrößerung, transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme [nach Pavenstädt (Pavenstädt, et al., 2003)].

Die letzte Komponente der Barriere stellen die Podocyten dar. Sie sind polare Zellen mit einer apikalen (auf der Harnseite gelegenen) und einer basalen Zelldomäne. Letztere ist über die Fußfortsätze an der Basalmembran verankert. Das Schlitzdiaphragma und die apikale Membran sind mit einem Mantel aus Sialoglykoproteinen wie beispielsweise Podocalyxin bedeckt, wodurch sich eine negative Oberflächenladung ergibt (Kerjaschki, et al., 1984). Die Öffnungen zwischen den Podocytenfortsätzen, die das Schlitzdiaphragma überspannt, messen nur um die 40nm (Wartiovaara, et al., 2004). Dort sind die anionischen Glykoproteine Nephrin und Podocin verankert, wodurch ebenfalls negativ geladene Plasmaproteine wie z.B. Albumin zusätzlich zurückgehalten werden. Bei einer Mutation der entsprechenden Gene kommt es zu einem intrauterinen bzw. postnatalen nephrotischen Syndrom. Dieser äußerst eindrückliche Symptomkomplex führte um die Jahrtausendwende zur Entdeckung dieser Moleküle (Kestila, 1998; Boute, et al., 2000). Eine Übersicht über die Vielzahl der weiteren Bestandteile der Filtrationsbarriere bietet Abbildung 4.

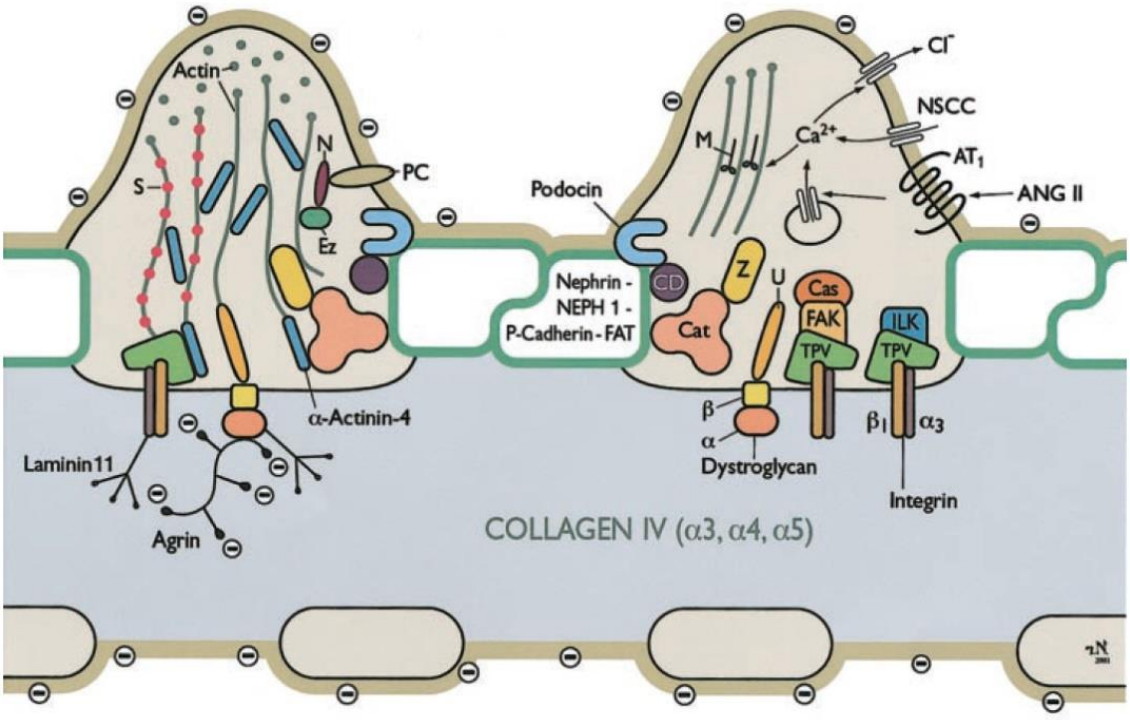

Abbildung 4: Schema der glomerulären Filtrationsbarriere

Dargestellt sind das fenestrierte Kapillarendothel am unteren Bildrand, grau unterlegt die glomeruläre Basalmembran in der Mitte und am oberen Bildrand in zwei schematisierten Anschnitten ein Großteil der molekularen Ausstattung der Podocytenfortsätze und der Schlitzdiaphragmen. Minuszeichen stehen für negative Ladungen an Moleküloberflächen. **ANG II** Angiotensin II. **AT_1** Angiotensin-Rezeptor 1. **Cas** p130Cas. **Cat** Catenin. **CD** CD2-associated protein. **Ez** Ezrin. **FAK** focal adhesion kinase. **ILK** integrin-linked kinase. **M** Myosin. **N** NHERF2. **NSCC** nicht-selektiver Kationenkanal. **PC** Podocalyxin. **S** Synaptopodin. **TPV** Talin, Paxillin, Vinculin. **U** Utrophin. **z** ZO-1 [nach Pavenstädt (Pavenstädt, et al., 2003), dort modifiziert nach Endlich (Endlich, et al., 2001)].

2.2. PODOCYTEN

Grundsätzlich sind Podocyten aus einem Zellkörper und größeren Primärfortsätzen, die sich in viele kleine Fußfortsätze aufzweigen, aufgebaut. Für tiefergehende Einblicke in Entwicklung und Struktur sei auf die ausführlichen Übersichtsarbeiten von beispielsweise Pavenstädt (Pavenstädt, et al., 2003) oder Greka (Greka, et al., 2012) hingewiesen. Interessanterweise entstehen Podocyten während der Nephrogenese aus epithelialen Vorläufern, die dann allerdings zu mesenchym-ähnlichen Zellen heranreifen, die Gemeinsamkeiten mit glatter Muskulatur aufweisen. Wie in Abbildung 5 zu sehen läuft die Entwicklung des Glomerulum in mehreren Stadien ab und beginnt mit der Induktion und Kondensation der Ureterknospe. Diese induziert nun selbst mittels verschiedener parakriner Botenstoffe die Einstülpung der Kapillarschlingen über ein zunächst Komma-, dann S-förmiges Stadium und somit die Formierung des reifen Nierenkörperchens (Saxén, et al., 1987).

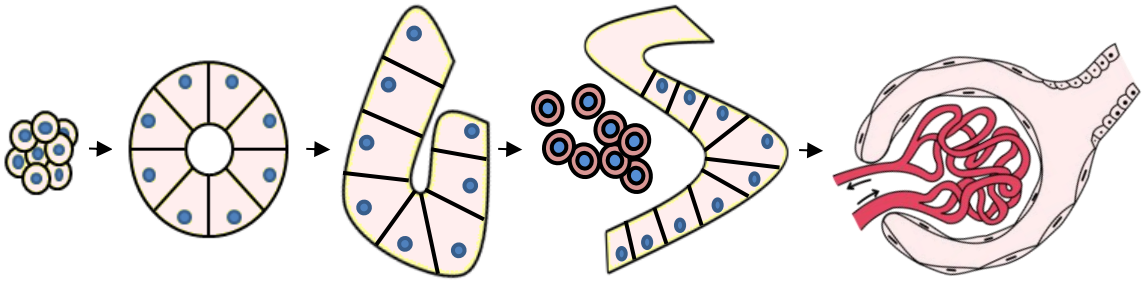

Abbildung 5: Nephrogenese

Stark vereinfachte Darstellung der Nierenentwicklung. Vorläuferzellen kondensieren zunächst zur Ureterknospe. Diese bildet über das Komma- und S-förmige Stadium eine Einstülpung. In diese sprossen Angioblasten ein, die sich zu den Kapillaren des reifen Glomerulum formieren [nach Gray und Davidson (Gray, 1918; Davidson, 2009)].

Während des Übergangs vom S-förmigen Stadium zur Kapillarschlinge setzt die Differenzierung der Podocyten ein. Aus einem bis dahin bestehenden Verband aus undifferenzierten Epithelzellen bilden sich die unreifen podocytären Vorläufer, die mit der Expression von Podocalyxin und ZO-1 beginnen (Mundel, et al., 1991; Schnabel, et al., 1990). In der Kapillarschlingen-Phase beenden sie ihre mitotische Aktivität und beginnen damit, die typische Zellarchitektur mit Fußfortsätzen zu errichten. Die apikalen Zellkontakte wandern nach basolateral und wandeln sich in Schlitzdiaphragmen um (Schnabel, et al., 1990), die auch als eine Art modifizierter Adhärenskontakt gesehen werden können (Reiser,

et al., 2000). Erstaunlicherweise bilden diese nach wie vor polaren Zellen nun das Intermediärfilament Vimentin, das eigentlich als Marker für mesenchymale Zellen wie glatte Muskulatur oder Fibroblasten gilt (Fujimoto, et al., 1987). Eine vollständige Aufzählung und Erläuterung aller bekannten Entwicklungsfaktoren in der Nephrogenese würde in diesem Rahmen zu weit führen, daher sei bei Interesse für weitere Details auf Tabelle 1 sowie die oben genannten Übersichtsarbeiten verwiesen.

Name	Vermutete Zielstruktur
Wilm's tumor protein 1(WT1)	Podxl (Podocalyxin), Nphs1 (Nephrin)
LMX1B	α3- und α4-Kollagene, Nphs2 (Podocin)
FOXC2 (Mfh2)	Nphs2, α3- und α4-Kollagene, MafB
Kreisler (MafB)	Nphs1, Nphs2, CD2AP
Pax2	WT1?
ZHX1/ZHX2	WT1?
Pod1 (Epicardin)	Nphs2, α3-Kollagen, MafB?
ZEB2	P-/E-Cadherine
HIFα	CXCR4
Rbpj (Notch-Signalweg)	?
NFAT	TRCP6
β-Catenin	?

Tabelle 1: Podocyten-beeinflussende Transkriptionsfaktoren

Auswahl von Transkriptionsfaktoren, die an der Entwicklung, der Physiologie und der Pathologie des Podocyten beteiligt sind. Der hohe Aufwand, der zur Ausdifferenzierung nötig ist, spiegelt sich in der komplexen Regulation vor allem der beteiligten Strukturproteine wider (Greka, et al., 2012).

Fehlbildungen noch während der Nephrogenese sind äußerst schwerwiegend und meist bereits intrauterin letal. Von größerer klinischer Bedeutung sind daher nicht die vielen möglichen Mutationen in der Entwicklung der Niere, sondern der physiologische Verlust der Proliferationsfähigkeit des bereits ausgereiften Organs (Pabst, et al., 1983). Dadurch wird die Regeneration erworbener Nierenschäden erheblich einschränkt. Ursächlich hierfür ist der hohe Differenzierungsgrad, der sich auch im Transkriptom des Podocyten widerspiegelt. So werden beispielsweise Gene, die mit Zellmorphogenese oder Proteintransport in Verbindung gebracht werden, vermehrt exprimiert, wogegen solche für Gefäßneubildung und Mitoseaktivität nach unten reguliert sind (Boerries, et al., 2013).

Im ausgereiften Podocyten stellt das Zytoskelett das strukturelle, aber auch funktionelle Rückgrat der Zelle dar. Es strahlt einerseits in die GBM ein und sorgt somit für eine stabile Verankerung im Glomerulum, andererseits ist auch das Schlitzdiaphragma daran fixiert, wie in Abbildung 4 vereinfacht dargestellt ist. Während das Zytoskelett der Primärfortsätze vorwiegend aus Mikrotubuli und Intermediärfilamenten aufgebaut ist (Vasmant, et al., 1984), bestehen die Fußfortsätze hauptsächlich aus Aktinfilamenten (Lachapelle, et al., 1991). Darüber hinaus zeigen sich Ähnlichkeiten zu mesenchymalen glatten Muskelzellen: Über Elektronenmikroskopie bzw. Immunfluoreszenz lassen sich in beiden Zelltypen beispielsweise kontraktile Proteine wie schweres Meromyosin (Trenchev, et al., 1976), Smoothelin und Calponin (Saleem, et al., 2008) oder Myosin und α-Aktinin (Drenckhahn, et al., 1988) nachweisen. Das Zusammenspiel dieser Moleküle ist in seiner Gesamtheit noch nicht komplett erforscht, hat jedoch immense Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Filterfunktion des Podocyten. Einzelne Elemente sind bereits näher charakterisiert und sollen hier exemplarisch erläutert werden, weiterführende Informationen liefern Faul (Faul, et al., 2007) oder Greka (Greka, et al., 2012).

Aufgrund der Ähnlichkeit von Podocyten mit glatter Muskulatur liegt die Vermutung nahe, dass auch gleiche Signalwege von diesen Zelltypen verwendet werden. So ist nicht nur die Kontraktilität in glatten Muskelzellen Ca^{++}-abhängig, sondern auch Podocyten nutzen diesen Signalweg über die erst vor einigen Jahren genauer beschriebenen Ionen-Kanäle TRPC5 und TRPC6. Diese beiden Kanäle öffnen sich AT_1-Rezeptor-vermittelt und führen zu einem lokalen Einstrom von Calcium und einer Aktivierung von antagonistischen Rho-GTPasen. TRPC5 stimuliert Rac1, das in Zellkultur einen eher motilen Phänotyp erzeugt. Das Gegenteil bewirkt TRPC6 über RhoA, wodurch sich die Anzahl an Stressfasern erhöht (Tian, et al., 2010). Bleibt durch längere Exposition mit Angiotensin II der Stimulus bestehen, so dominiert Rac1, es bildet sich also der beweglichere Phänotyp aus. Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Phosphorylierung von Ezrin/Radixin/Moesin, was den Umbau des F-Aktin-Skeletts verstärkt, und zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt (Hsu, et al., 2008). Eine erst kürzlich entwickelte, verbesserte Methode zum Calcium-Imaging *in vivo*, die auf Multiphoton-Mikroskopie beruht, liefert möglicherweise bald weitere Einblicke in dieses Feld (Burford, et al., 2014). Ein weiterer Signalweg, der auch in glatter Gefäßmuskulatur an der Kontraktilität beteiligt ist, läuft über cyclisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) ab. Dieser Botenstoff kommt ebenfalls im Podocyten vor und wird dort durch lösliche und membranständige Guanylatcyclasen (sGC bzw. pGC) über Stickstoffmonoxid bzw.

natriuretische Peptide reguliert (Lewko, et al., 2002). Erstere spielen dort wohl eine eher untergeordnete Rolle (Pavenstädt, et al., 2003), mit den bedeutenderen membranständigen Guanylatcyclasen setzt sich weiter unten der Abschnitt zu natriuretischen Peptiden ausführlicher auseinander. Darüber hinaus sind auch Zelladhäsionsmoleküle wie Integrine an der Kontraktilität von Podocyten beteiligt. Diese können unter anderem über die sogenannte integrin-linked kinase (ILK) ebenfalls grundlegend auf die Struktur des Zytoskeletts einwirken und für eine Aufrechterhaltung der Filterfunktion sorgen. Im Komplex mit unter anderem PINCH1 und α-Parvin (Yang, et al., 2005) verursacht sie über eine Translokation von β-Catenin in den Nucleus eine Aktivierung von LEF-1 und somit des Wnt-Signalweges. Bei einer Stimulation mit dem ILK-Agonisten Puromycin kommt es in Zellkultur zur Repression von P-Cadherin und CD2AP, zur Proliferation und zum Ablösen der Podocyten von der Oberfläche (Teixeira, Vicente de Paulo Castro, et al., 2005). Ein spezifischer Knock-out der ILK im Mausmodell hingegen wirkt sich ebenfalls negativ aus: Auf eine Verdickung der glomerulären Basalmembran hin entwickelt sich in der Folge eine progressive fokal-segmentale Glomerulosklerose mit Albuminurie (El-Aouni, et al., 2006). Weitere Akteure in der hochkomplexen Regulation des Zytoskeletts stellen unter vielen anderen die in den Energiestoffwechsel eingebundene Kinase mTOR oder das Gerüstprotein Synpo dar. Bei tiefergehendem Interesse sei hier nochmals auf die oben erwähnten Übersichtsarbeiten verwiesen.

3. DAS RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM

In Abbildung 6 ist das RAAS dargestellt. Es besteht aus einer Kaskade mehrerer Proteasen und Hormonen und ist maßgeblich an der Blutdruckregulation sowie dem Salz- und Wasserhaushalt beteiligt. Seine Wirkungen sind z.B. in einem Review von Roscioni (Roscioni, et al., 2014) oder in den Standardwerken der Physiologie (Klinke, et al., 2010) zusammengefasst. Hier soll nur ein kurzer Überblick gegeben werden.

Angestoßen wird die RAAS-Kaskade durch eine vermehrte Ausschüttung von Renin aus Zellen des juxtaglomerulären Apparates (siehe Abbildung 2). Diese werden unter anderem durch das sympathische Nervensystem über β1-Adrenozeptoren aktiviert. Der gleiche Effekt zeigt sich bei einem Abfall des renalen Blutdrucks, wie er beispielsweise von einer

Nierenarterienstenose verursacht wird. Die Protease Renin spaltet vom inaktiven Angiotensinogen, das hepatisch gebildet wird, das Dekapeptid Angiotensin I ab.

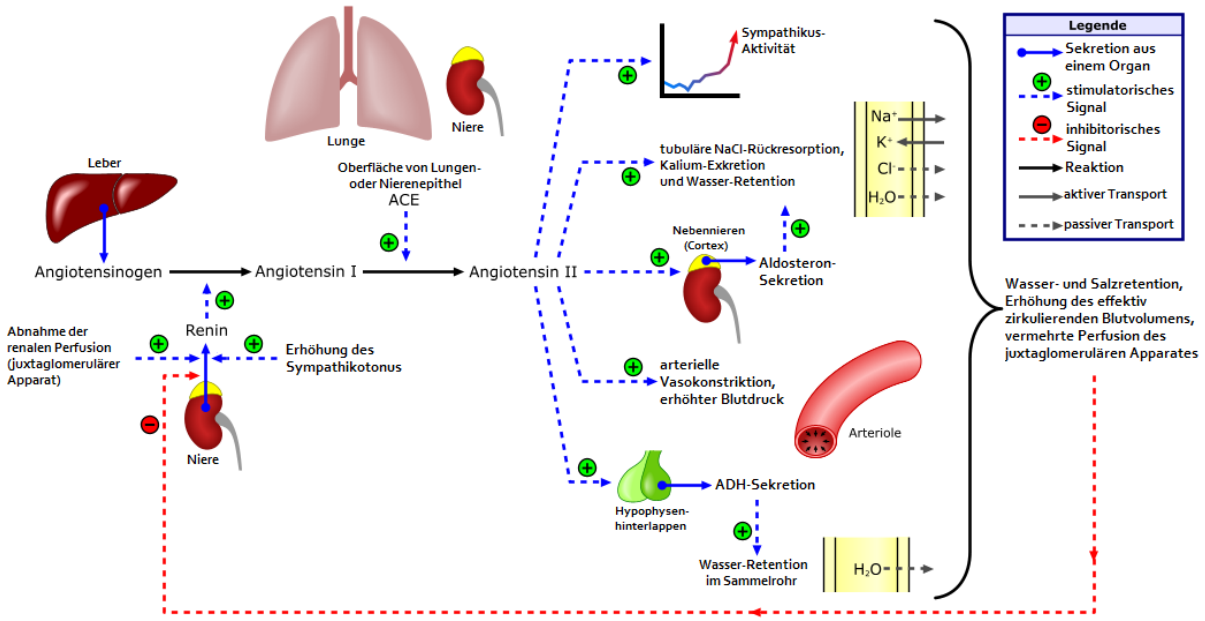

Abbildung 6: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das RAAS übt vor allem auf den arteriellen Blutdruck und den Elektrolythaushalt entscheidenden Einfluss aus. Hauptsächlich wirksam sind hierbei Angiotensin II durch eine Erhöhung des peripheren Widerstandes und Aldosteron über verstärkte Natriumresorption im Sammelrohr [nach Rad (Rad, 2006)].

Dieses wiederum wird durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) aus der Lunge zu Angiotensin II hydrolysiert, das einen der beiden Haupteffektoren des RAAS darstellt. Angiotensin II steigert den Blutdruck einerseits direkt durch AT_1-Rezeptor-vermittelte Konstriktion peripherer Gefäße, andererseits auch durch eine Sympathikus-Aktivierung. Zusätzlich wird mehr Antidiuretisches Hormon (ADH) in der Hypophyse ausgeschüttet, wodurch Wasser im Sammelrohr zurückgehalten wird. Angiotensin II fördert weiterhin die Bildung von Aldosteron, dem zweiten Hauptakteur der Kaskade, in der Nebennierenrinde. Dadurch wird renal vermehrt Natrium retiniert, was wiederum Wasser aus dem Interstitium in den Intravasalraum zieht und den Blutdruck so mittelfristig ebenfalls erhöht.

Unter physiologischen Bedingungen ist die RAAS-Aktivierung negativ rückgekoppelt, d.h. bei ausreichender glomerulärer Perfusion sinkt die Sekretion von Renin wieder auf das reguläre Maß ab. Entsprechend normalisieren sich auch die Bildung von Angiotensin II und die Ausschüttung von Aldosteron. Wie sich Störungen dieses Regelkreises im Rahmen

krankhafter Prozesse auswirken, wird weiter unten bei der Ätiologie und Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz näher beschrieben.

4. CHRONISCHE NIERENINSUFFIZIENZ

4.1. NIERENERSATZTHERAPIE

Das in der Öffentlichkeit wohl bekannteste renale Krankheitsbild dürfte das dialysepflichtige Terminalstadium der chronischen Niereninsuffizienz sein. Allein in Deutschland wurden im Jahr 2006 laut Jahresbericht der Qualitätssicherung-Niere etwa 66.000 Patienten mit Dialyseverfahren versorgt. Dies entspricht einer Prävalenz von 808 Dialysepatienten pro 1.000.000 Einwohner. Neu in die Nierenersatztherapie aufgenommen wurden etwa 17.500 Patienten. Im Berichtsjahr wurden zudem fast 3.000 Nieren transplantiert, davon jede fünfte von einem Lebendspender. Insgesamt befanden sich rund 25.000 Patienten in der Nachsorge nach Nierentransplantation (Frei, et al., 2008). Dem stehen 8.000 Patienten gegenüber, die sich laut der Deutschen Stiftung Organspende derzeit auf der Warteliste für eine Transplantation befinden (www.dso.de, Daten von 2013). Eine aktuellere Schätzung der Prävalenz in Deutschland geht für das Jahr 2013 von etwa 80.000 dialysepflichtigen Patienten und einem weiteren Anstieg der terminalen Niereninsuffizienz auf über 100.000 Betroffene im Jahre 2020 aus (Klein, Silvia et al., 2013). Vergleichbare Zahlen liegen auch für andere westliche Staaten vor, die Bundesrepublik nimmt somit keine Sonderstellung bei der Nierenersatztherapie ein (Frei, et al., 2008). Die Mortalität der chronischen Niereninsuffizienz wird maßgeblich durch vergesellschaftete Komorbiditäten erhöht, die meisten Patienten versterben aufgrund kardiovaskulärer Ursachen (Frei, et al., 2008).

4.2. DEFINITION UND ABSTUFUNG DER CKD

Die Dialysepflicht stellt das Endstadium der chronischen Niereninsuffizienz dar, welche nach ICD-10 der WHO in fünf Stufen (N18.1-5) eingeteilt wird. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, ist die Filtrationsleistung der entscheidende Parameter bei dieser Einteilung in die einzelnen

Schweregrade. Erst eine GFR von unter 15ml/min entspricht somit Stadium 5 bzw. einem terminalen Nierenversagen (ICD-10, 2016).

Stadium	Glomeruläre Filtrationsrate
1	> 90ml/min
2	60-89ml/min
3	30-59ml/min
4	15-29ml/min
5	< 15ml/min (terminales Nierenversagen)

Tabelle 2: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz

Einteilung nach ICD-10. Eine GFR von über 90ml/min in diesem Zusammenhang erst dann als pathologisch, wenn laborchemisch, radiologisch oder histologisch gesichert länger als drei Monate ein Nierenschaden besteht.

Entsprechend differenzierte epidemiologische Daten liegen nur für die USA vor. Im Rahmen der NHANES-Studien (National Health and Nutrition Examination Survey, http://www.cdc.gov/nchs/nhanes.htm) wurden im Gegensatz zu den deutschen Erhebungen auch die niedrigeren Stufen der chronischen Niereninsuffizienz in einer repräsentativen Stichprobe erfasst. Verschiedene Auswertungen der Datensätze der Jahre 1988-2006 ergaben Prävalenzen von Stadium 1 zwischen 2-4% und von Stadium 2 um die 3%. In Stadium 3 befanden sich mit 5-8% deutlich mehr Personen, in Stadium 4 hingegen nur um die 0,2-0,4%. Stadium 5 wurde nicht einbezogen. Insgesamt zeigte sich ein moderater Anstieg der Prävalenz im beobachteten Zeitraum, der auf das vermehrte Vorkommen von Bluthochdruck und Diabetes als wichtigste ursächliche Faktoren zurückgeführt wurde (Coresh, et al., 2007; Levey, et al., 2011; KDIGO-CKD-1, 2013). Aktuellere Daten von 2005-2010 aus einem engeren Kollektiv von Patienten über 80 Jahren deuten auf eine Fortführung dieses Trends hin (Bowling, et al., 2013).

4.3. PROGNOSE

Was sagen nun diese unterschiedlichen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz für den Patienten aus? Eine höhere Stufe bedeutet zunächst einmal im Allgemeinen eine schlechtere Prognose. Dabei stellt neben der GFR die Albuminausscheidung im Urin den wichtigsten

unabhängigen Risikofaktor dar. Von Mikroalbuminurie spricht man bei mehr als 30mg Albumin im 24h-Sammelurin oder einem Verhältnis von Albumin zu Kreatinin (ACR) im Spontanurin von über 30mg/g. Eine ACR >300mg/g bzw. ein positiver Streifentest gelten als Makroalbuminurie (KDIGO-CKD-1, 2013). Die Gesamt-Mortalität chronisch niereninsuffizienter Patienten steigt erst mit einer Reduktion der glomerulären Filtrationsrate auf unter 60ml/min/1,73m² an, dann allerdings exponentiell bis auf das Dreifache. Für die Albuminurie hingegen gilt ein linearer Zusammenhang. Speziell tödliche kardiovaskuläre Ereignisse wie Herzinfarkte oder Schlaganfälle nehmen stark zu, das relative Risiko kann sich hier mehr als verzehnfachen (Matsushita et al., The Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, 2010; Levey, et al., 2011; KDIGO-CKD-1, 2013). Darüber hinaus erhöhen sich sowohl das Risiko eines Progresses der chronischen Niereninsuffizienz als auch das des akuten Nierenversagens (Gansevoort, et al., 2011; Levey, et al., 2011; KDIGO-CKD-1, 2013). Dieser unbestrittene Nutzen der Albuminurie als prognostischer Marker für kardiovaskuläre Ereignisse (Weir, 2007; Agrawal, et al., 2009; Currie, et al., 2013) ist wohl größtenteils Ausdruck einer systemischen Endothelschädigung, wie von Deckert et al. (im Rahmen der diabetischen Nephropathie) in der sogenannten Steno-Hypothese postuliert (Deckert, T. et al., 1989).

4.4. ÄTIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE

Die Ätiologie der CKD ist vielfältig, wie Abbildung 7 näher ausführt. Neben Erkrankungen wie (hereditären) Zystennieren oder Glomerulonephritiden, die sich primär renal manifestieren, sind vor allem chronische, systemische Leiden wie Diabetes mellitus oder arterielle Hypertonie als Hauptursachen zu nennen (Frei, et al., 2008)]. Der auslösende Mechanismus ist jeweils ein anderer, doch kommt es stets zum Verlust von Nephronen (Keller, et al., 2003) und nach Ausschöpfung kompensatorischer Mechanismen im Verlauf zu einem unabhängig von der Genese sehr ähnlichen Progress. Eine Übersichtarbeit zu Gemeinsamkeiten in der Pathophysiologie hat López-Novoa zusammengestellt (López-Novoa, et al., 2010). Mennuni (Mennuni, et al., 2014) und Rosario (Rosario, et al., 2006) gehen genauer auf die hypertensive Nephropathie ein und Liu (Liu, 2011) sowie Grabias (Grabias, et al., 2014) beleuchten speziell die Aspekte der Fibrosierung und Sklerosierung bei der chronischen Nierenschädigung. Im Folgenden handelt es sich jeweils um vereinfachende Darstellungen. Zusätzliche Umweltfaktoren oder genetische Prädispositionen spielen hierbei

ebenfalls eine Rolle, sind jedoch im Einzelnen noch nicht genauer erforscht (Hughson, et al., 2014).

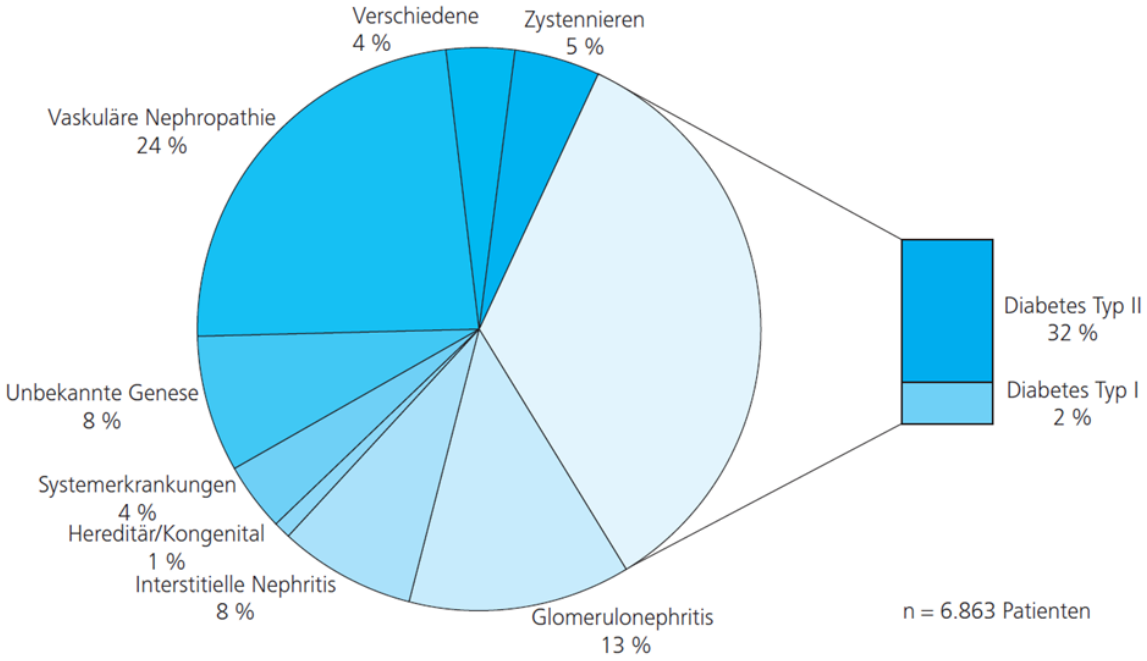

Abbildung 7: Diagnoseverteilung bei Beginn einer Nierenersatztherapie

Während die vergleichsweise seltenen primären Nierenerkrankungen nicht einmal ein Drittel aller chronischen Dialysebehandlungen verursachen, machen Störungen im Zuckerhaushalt zusammen mit Bluthochdruck aufgrund ihrer hohen Prävalenz über die Hälfte aller Fälle aus [nach Frei (Frei, et al., 2008)].

Der Zusammenhang zwischen Hypertonie und eingeschränkter Nierenfunktion ist bereits lange bekannt. So zeigen Biopsien von Patienten mit Bluthochdruck und persistierender Proteinurie beispielsweise eine Vergrößerung der Glomerula sowie eine segmentale Sklerosierung (Harvey, 1992). Nach López-Novoa (López-Novoa, et al., 2010) führt der arterielle Hypertonus zunächst zu atherosklerotischen und fibrotischen Veränderungen der präglomerulären Arterien und Arteriolen. Daraus resultieren ein verringerter Blutfluss, lokale Ischämien und folglich eine mikroangiopathische Schädigung der glomerulären Kapillaren. Die GFR ist durch einen erhöhten intraglomerulären Druck zunächst noch unbeeinflusst, nimmt aber im Verlauf durch den Verlust von Filtrationsfläche ab (López-Novoa, et al., 2010). Derartige renale Veränderungen können jedoch auch selbst Ursache eines Bluthochdrucks sein. Durch die Stenose einer Nierenarterie (Goldblatt, et al., 1934) oder eine heterogene Durchblutung von Nephronen kommt es zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Sealey, et al., 1988). Diese positive Rückkopplung erklärt unter anderem die Tatsache, dass in den Spätstadien der chronischen Niereninsuffizienz über

80% der Patienten einen arteriellen Hypertonus aufweisen (USRDS, 2009). Die schließlich auftretende Sklerosierung breitet sich entweder beginnend am Harnpol auf das komplette Glomerulum aus oder sie durchwandert die Bowman-Kapsel an der Grenze zum Interstitium und greift durch paratubuläre Filtration auf das anliegende Tubulussystem über (Kriz, et al., 1998). Bei erhöhtem Blutdruck kommt es zu mechanischen Belastungen des Endothels durch Scherkräfte. Diese führen in Zellkultur von Endothelzellen z.B. zu einer Hochregulation der endothelialen NO-Synthase und steigern dadurch die Gefäßpermeabilität (Bevan, et al., 2011). Weitere Auswirkungen auf das Endothel fasst Ballermann sehr prägnant zusammen, unter anderem die vermehrte Expression pro-inflammatorischer Proteine wie NF-κB oder COX2 (Ballermann, et al., 1998). Vermittelt über die p38-MAP-Kinase setzen mesangiale Zellen in Kultur als Reaktion auf Dehnung verstärkt Mediatoren wie TGF-β1 frei, außerdem verändert sich die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, Bestandteile wie Fibronektin oder Kollagen I häufen sich an (Gruden, et al., 2000; Liu, 2011).

Podocyten reagieren auf Scherkräfte mit Hypertrophie (Petermann, et al., 2005), einer lokalen Synthese von Zytokinen wie TGF-β1 und Angiotensin-II sowie einer Hochregulation des AT_1-Rezeptors (Durvasula, et al., 2004). Zusätzlich kommt es durch verringerte Nephrin-Expression zu einer erhöhten Permeabilität des glomerulären Filters (Miceli, et al., 2010). Generell führt eine Schädigung von Podocyten zu einer Retraktion und Vergröberung der Fußfortsätze (Farquhar, et al., 1957), die auf Abbildung 8 dargestellt ist und heutzutage als „foot process effacement“ (FPE) bezeichnet wird.

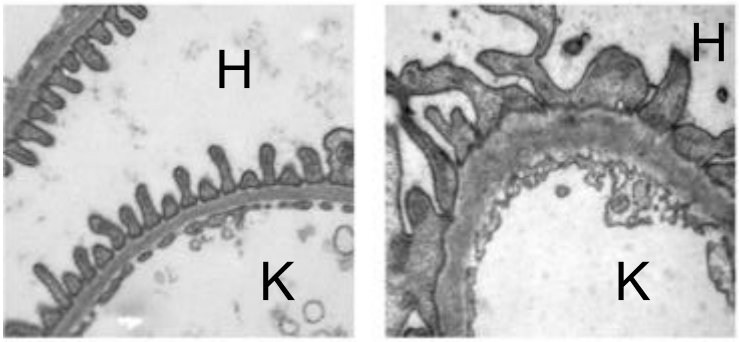

Abbildung 8: „Effacement“ der podocytären Fußfortsätze

H Harnraum. **K** Kapillarraum. Links: Intaktes Glomerulum mit abgrenzbarem Endothel auf der Kapillarseite, schmaler Basalmembran und filigranen Podocytenfortsätzen auf der Harnseite. Rechts: Erheblich geschädigtes Glomerulum. Man erkennt eine deutliche Vergröberung aller beteiligten Strukturen, insbesondere die verbreiterte Auflagefläche der Podocyten ist hervorzuheben [Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus Staffel (Staffel, et al., 2017)].

Dieser sehr auffällige Prozess wurde und wird sehr kontrovers diskutiert. Während weitgehende Einigkeit darüber besteht, dass bei einer lediglich vorübergehenden Schädigung FPE prinzipiell reversibel ist (Greka, et al., 2012; Kriz, et al., 2013), gibt es divergierende Meinungen bezüglich seiner Bedeutung im Progress von Nierenerkrankungen. Shankland fasst drei vorherrschende Ansichten zusammen, ohne sich auf eine als die einzig wahre festlegen zu wollen: (I) FPE selbst ist hinreichend, um eine Proteinurie zu verursachen; (II) FPE stellt einen gemeinsamen Punkt bei verschiedenen Schädigungen des oder Abnormitäten im Podocyten dar und kann somit als Marker für die eigentliche Ursache der Proteinurie gelten; (III) FPE und Proteinurie können völlig unabhängig voneinander auftreten (Shankland, 2006). Eine neuere Hypothese kann als Ergänzung zu (II) gesehen werden: Kriz et al. gehen davon aus, dass FPE durch die Verbreiterung der Auflagefläche den Versuch des Podocyten darstellt, sich vor einer Ablösung von der Basalmembran zu schützen und gleichzeitig freiliegende Stellen der GBM abzudecken und somit ein Fortschreiten der Proteinurie einzudämmen (Kriz, et al., 2013).

Nicht nur eine Schädigung von Podocyten, sondern auch anderer Bestandteile der glomerulären Filtrationsbarriere kann zu einem Verlust der Siebfunktion und folglich einer Albuminurie führen (Mundel, et al., 2010). Diese wiederum hat selbst schädigende Wirkung auf tubuläre Strukturen (Abbate, et al., 2006; Eddy, 2004). Es gibt Hinweise auf eine Aktivierung des NF-κB-Signalwegs durch Albumin (Drumm, et al., 2002; Mezzano, et al., 2001). Auch ein vermehrtes Einwandern von Makrophagen, vermittelt über Chemokine wie MCP-1/CCL2, spielt möglicherweise eine Rolle (Eddy, et al., 1995; Eardley, et al., 2006). Darüber hinaus werden auch eine Beteiligung des Komplement-Systems (Nangaku, et al., 1999) und eine Modifizierung der Extrazellulärmatrix postuliert (Wohlfarth, et al., 2003).

Eine weitere häufige Ursache chronischer Niereninsuffizienz ist ein Diabetes mellitus. In diesem Fall wird die Nephropathie durch die Hyperglykämie ausgelöst, die neben einer generellen Gefäßschädigung (Nathan, 1993) eine verstärkte präglomeruläre Expression von endothelialer NO-Synthase bewirkt. Dadurch kommt es zu einer präferentiellen Dilatation der Vasa afferentia und initial zu einer erhöhten GFR (Sugimoto, et al., 1998; Dellamea, et al., 2014). Langfristig führt jedoch der erhöhte intraglomeruläre Druck zusammen mit erhöhter Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (Lehmann, et al., 2000) zu den gleichen Schäden wie bei der arteriellen Hypertonie: Die hämodynamischen Veränderungen stören die Regulationsfähigkeit des Endothels, die glomeruläre Basalmembran und die Podocyten verlieren an Funktionalität, es kommt zur Albuminurie (Wolf, et al., 2007). In der Folge

proliferiert das Mesangium und es tritt auch bei der diabetischen Nephropathie eine Glomerulosklerose auf, die sich auf das Interstitium und das tubuläre System ausweitet (Kriz, et al., 1998).

Auch Glomerulonephritiden führen zu einer chronischen Nierenschädigung. Hier liegt jedoch der Auslöser wie beispielsweise bei der IgA-Nephropathie (Pillai, et al., 2014) oder der Lupus-Nephritis (Sterner, et al., 2014) in einem entzündlichen Geschehen, das den Ausgangspunkt für Sklerosierung, podocytäre Schädigung, Albuminurie, etc. darstellt. Abbildung 9 gibt einen schematischen Überblick zur Pathogenese der chronischen Niereninsuffizienz.

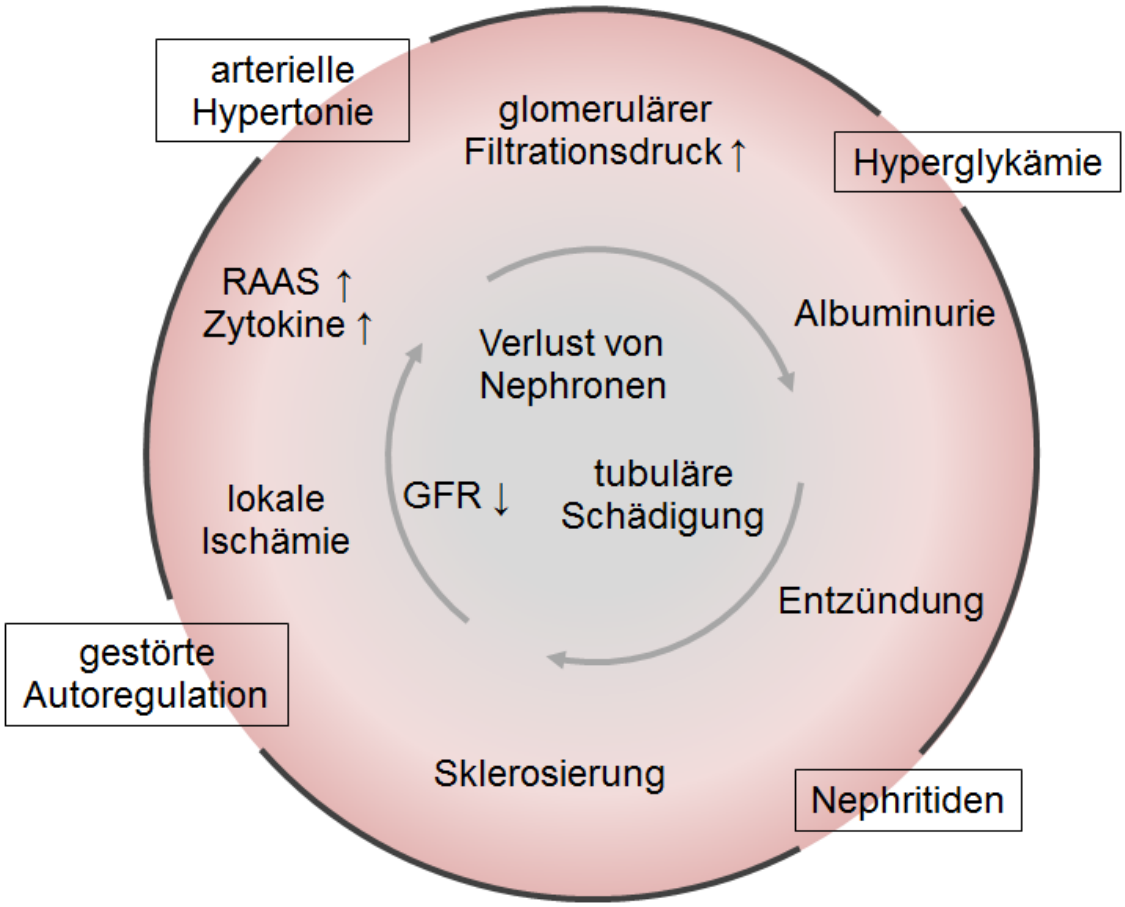

Abbildung 9: Pathophysiologie der CKD

In dieser schematischen Darstellung der Entstehung chronischer Niereninsuffizienz liegen an den Unterbrechungen des äußeren Kreises beispielhaft vier verschiedene Auslöser dieser Erkrankung. Im mittleren Ring sind die Bestandteile der gemeinsamen Pathophysiologie dargestellt, die sich im Sinne eines Circulus vitiosus untereinander verstärken und zum Teil gegenseitig bedingen. Im Zentrum schließlich steht der irreversible, klinisch fassbare Verlust der renalen Funktion. Für detailliertere Erläuterungen zu einzelnen Schädigungswegen sei auf den Fließtext verwiesen.

4.5. MEDIKAMENTÖSE THERAPIE

Obwohl die Folgen bereits stattgefundener, längerfristiger Schädigungen leider kaum bis nicht mehr reversibel sind, steht heutzutage dennoch eine ganze Reihe von Medikamenten zur Verfügung, um die entsprechenden Umbauprozesse aufzuhalten und ein Fortschreiten der Erkrankung sowie Komplikationen wie Herzinfarkte oder Schlaganfälle zu verringern. Dabei steht natürlich zunächst die Beseitigung des Auslösers der Erkrankung im Vordergrund, etwa eine Entzündungshemmung mit Steroiden bei Glomerulonephritiden (KDIGO-GN, 2012). Bei chronischen Leiden gilt es, den Patienten vom Nutzen einer Behandlung im Sinne einer Primär- bzw. Tertiärprävention zu überzeugen und zur Therapietreue zu motivieren, da sich bei Diabetes mellitus beispielsweise durch eine frühzeitige, konsequente Einstellung des Blutzuckers der größte Benefit zu erzielen lässt (Jun, et al., 2011). Bei arterieller Hypertonie gilt es entsprechend, den Blutdruck auf akzeptable Werte zu bringen. Neben Diät und Bewegung stellen den therapeutisch wichtigsten Baustein Blutdrucksenker dar. Eine Sonderstellung nehmen dabei diejenigen Medikamente ein, die das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System beeinflussen. Sie verbessern nicht nur bei hypertensiver Nephropathie, sondern auch bei chronischer Niereninsuffizienz anderer Genese den Krankheitsverlauf der Patienten und sind somit bei allen Formen der CKD von immenser Bedeutung (Weir, 2007; Currie, et al., 2013; Mennuni, et al., 2014). Obgleich sich aufgrund der kurzen Follow-Up-Zeiten der bisher durchgeführten Untersuchungen kein Einfluss auf die Gesamtmortalität zeigt, so ist dennoch der Nutzen von RAAS-Antagonisten bezüglich des Progresses einer chronischen Nierenerkrankung in Metaanalysen von kontrollierten, doppelblinden Studien belegt (Khan, et al., 2013). Den aktuellen Empfehlungen nach stellen AT_1-Rezeptor-Antagonisten (wie Losartan oder Candesartan) und gleichberechtigt ACE-Hemmer (z.B. Enalapril oder Lisinopril) Mittel der ersten Wahl dar (KDIGO-CKD-3, 2013). Diese Substanzen verringern nicht nur die systemische Wirkung von Angiotensin II auf den Gefäßtonus, sondern auch seine lokalen Effekte auf die Niere. Dort mindern sie dessen pro-fibrotische Wirkung und senken, wie in Abbildung 10 dargestellt, zusätzlich den intraglomerulären Druck durch eine präferentielle Dilatation des Vas efferens (Freissmuth, et al., 2012).

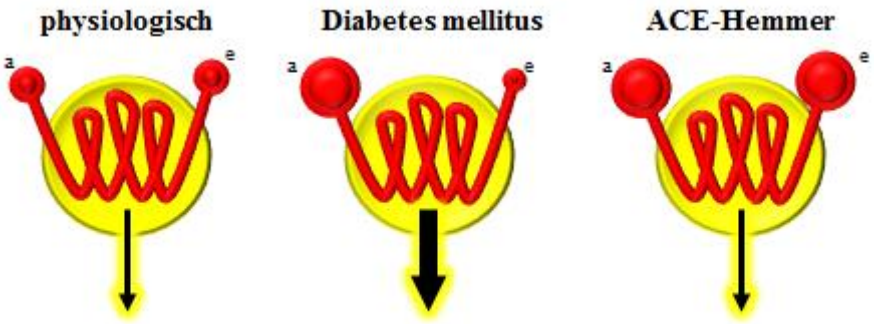

Abbildung 10: Wirkung von RAAS-Inhibitoren auf den glomerulären Druck

a Vas afferens. **e** Vas efferens. Die roten Spiralen stehen für die glomerulären Kapillarschlingen, die Kugeln an den Enden symbolisieren die Weite des jeweiligen Gefäßes. Die gelben Kreise mit den schwarzen Pfeilen stellen das Glomerulum mit dem Filtrationsdruck dar. Dabei gilt: je dicker der Pfeil, desto höher der Druck. Physiologisch wird die Durchblutung des Glomerulum so reguliert, dass eine ausreichende GFR gewährleistet ist. Im Rahmen krankhafter Prozesse (wie hier beispielsweise bei Diabetes mellitus) kann es zu einer Dilatation der zuführenden und überschießenden Konstriktion der abführenden Gefäße kommen. Dadurch wird zwar zunächst die Filtrationsrate aufrechterhalten, im Verlauf jedoch schädigt der höhere glomeruläre Druck die Niere. Hebt man nun die Angiotensin-vermittelte Konstriktion des Vas efferens mit ACE-Hemmern oder AT_1-Rezeptor-Blockern auf, so sinkt der Druck im Kapillarknäuel wieder auf ein tolerables Maß ab [nach Freissmuth (Freissmuth, et al., 2012)].

Daneben gibt es, wie in Abbildung 11 illustriert, noch weitere medikamentöse Angriffspunkte am Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Eine dieser Alternativen stellt Aliskiren dar, ein direkter Renin-Inhibitor. Es senkt den systemischen Blutdruck ähnlich effektiv und weist auch nephroprotektive Effekte auf, sollte jedoch mangels klinischer Erfahrung mit Vorsicht eingesetzt werden (Zaporowska-Stachowiak, et al., 2014; Roscioni, et al., 2014).

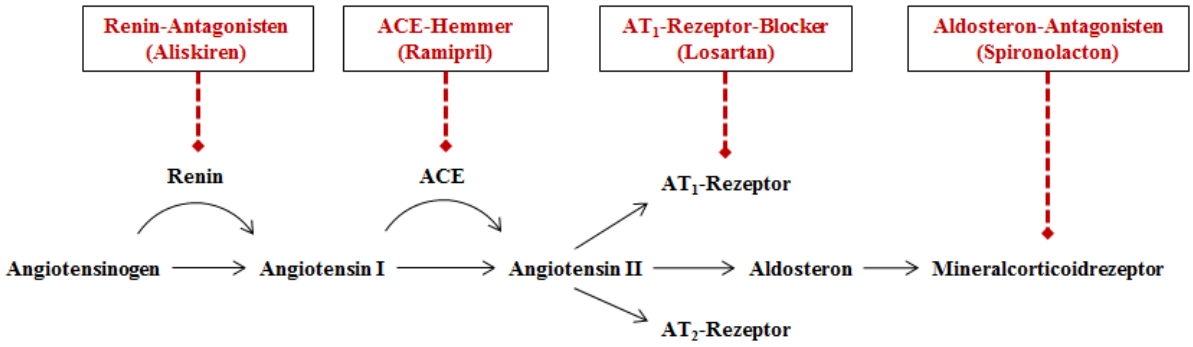

Abbildung 11: Medikamentöse Angriffspunkte am RAAS

Die schwarzen Pfeile stellen eine Umwandlung oder fördernde Effekte dar (direkt enzymatisch bzw. rezeptorvermittelt), die roten Rauten symbolisieren eine Hemmung. In Klammern werden Beispiele für einzelne Vertreter der jeweiligen Wirkstoffklasse genannt.

Grundsätzlich wird eine Kombinationstherapie aus mehreren Medikamenten, die das RAAS hemmen, aufgrund erhöhter Anfälligkeit für u.a. Hyperkaliämien, Schlaganfälle oder ein akutes Nierenversagen derzeit nicht empfohlen (ACEI, ARB, and Aliskiren Comparison; Harel, et al., 2012). Aliskiren ist als Add-On bei Diabetes mellitus und chronischer Niereninsuffizienz sonstiger Genese sogar kontraindiziert (Novartis, 2012; Novartis, 2012). Lediglich bei zusätzlichem Einsatz von Mineralcorticoid-Rezepter-Antagonisten (wie Spironolacton oder Eplerenon) gibt es Hinweise, dass sich diese (bei strikter Überwachung des Kaliumspiegels) positiv auf den Verlauf einer CKD auswirken könnten. Diese Vermutung muss allerdings noch durch prospektive klinische Studien überprüft werden (Jain, et al., 2009). Eine neuer Ansatz zur Therapie chronischer Niereninsuffizienz ist die Kombination aus verringertem Abbau von natriuretischen Peptiden und gleichzeitiger Blockade des AT_1-Rezeptors mit sogenannten ARNIs (Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitoren), die sich bei der Behandlung von Herzinsuffizienz einer Monotherapie mit ACE-Hemmern überlegen zeigten (McMurray, et al., 2014) und auch bei Hypertonikern bereits äußerst vielversprechende Ergebnisse vorweisen (Izzo, et al., 2014). Da die Kontrolle des Blutdrucks und die Regulation langfristiger Umbauprozesse Kernpunkte bei der Therapie der chronischen Niereninsuffizienz darstellen, gibt es guten Grund zur Annahme, dass sich diese Substanzklasse dort ebenfalls positiv auswirken könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese laufen aktuell klinische Studien, erste Ergebnisse werden in den nächsten Jahren erwartet (Judge, et al., 2014).

5. NATRIURETISCHE PEPTIDE

5.1. ALLGEMEINE WIRKUNGEN

Das Wirkprinzip von ARNIs besteht in einer Hemmung von Neprilysin, das den Abbau von natriuretischen Peptiden katalysiert. Diese fungieren als physiologische Antagonisten des RAAS. Sie werden in ANP, BNP und CNP (atrial/brain/C-type natriuretic peptide) unterteilt, wobei ANP größtenteils aus den Herzvorhöfen stammt, wo es bei übermäßiger atrialer Füllung (Lang, et al., 1985) ausgeschüttet wird. Es kommt jedoch auch in den Ventrikeln vor, dem Hauptsyntheseort von BNP. Dieses wird dort vor allem im Rahmen pathologischer Vorgänge wie der Herzinsuffizienz (Chun, et al., 2003; Weidemann, et al., 2008) vermehrt

synthetisiert. CNP schließlich wurde zunächst im zentralen Nervensystem beschrieben, kommt jedoch auch in vaskulärem Endothel vor (Suga, et al., 1992). NPs entfalten ihre Wirkung über spezielle Rezeptoren: den natriuretic peptide receptor (NPR) vom Typ A, B oder C. NPR-A bindet ANP und BNP, NPR-B bindet CNP. Die NP-Rezeptoren A und B sind membranständige Guanylatcyclasen (sie werden daher auch als GCA bzw. GCB bezeichnet), welche die intrazelluläre Konzentration des *second messengers* cGMP erhöhen und die nachfolgende Signalkaskade in Gang setzen; abgebaut wird cGMP durch Phosphodiesterasen (Anand-Srivastava, et al., 1993). Die Funktion von NPR-C ist noch nicht endgültig geklärt; er gilt primär als Clearance-Rezeptor, der bei Bindung NPs internalisiert (Kuhn, 2003). Für den Abbau der NPs ist zudem das bereits genannte Neprilysin (auch neutrale Endopeptidase genannt) verantwortlich (Sonnenberg, et al., 1988). Eine aktuelle Übersicht über natriuretische Peptide mit besonderem Blick auf kardiale und renale Erkrankungen hat Volpe zusammengestellt (Volpe, 2014). Abbildung 12 zeigt eine Zusammenschau physiologischer Effekte von NPs sowie Wechselwirkungen zwischen RAAS und dem sympathischen Nervensystem.

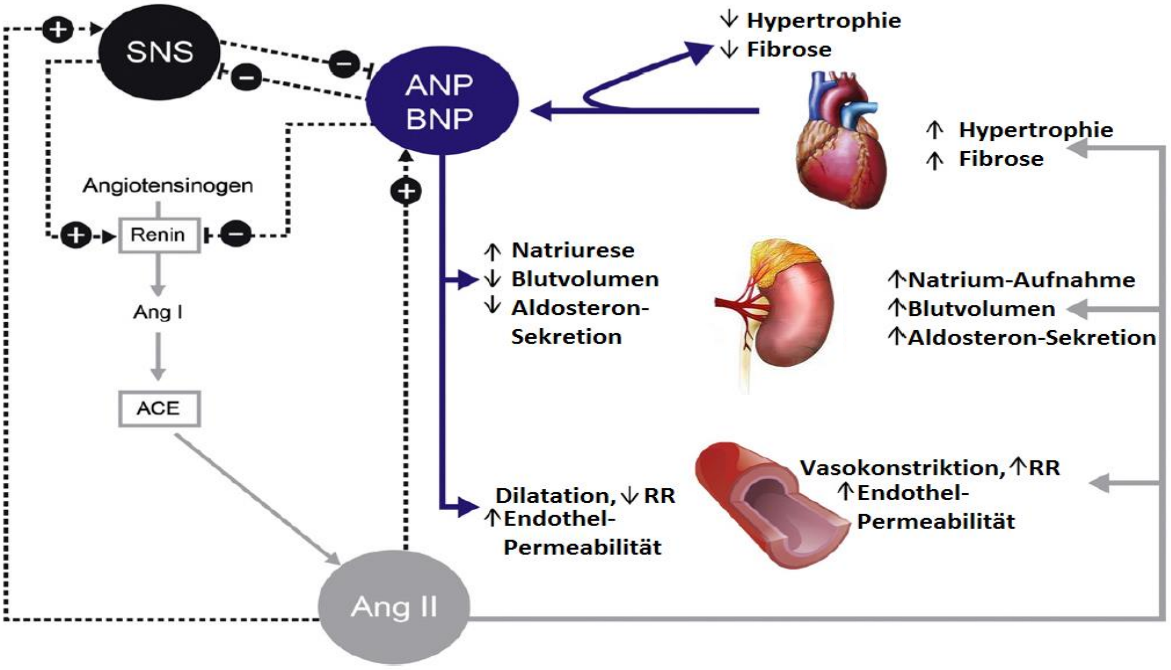

Abbildung 12: Wechselwirkungen zwischen NPs, RAAS und Sympathikus

SNS Sympathisches Nervensystem. **Ang** Angiotensin. **ANP/BNP** atrial/brain-type natriuretic peptide. **ACE** angiotensin-converting enzyme. **RAAS** Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. **RR** Blutdruck (von der Methode nach Riva-Rocci) [nach Volpe (Volpe, 2014)].

Die Hauptwirkungen der NPs wurden 1981, noch vor ihrer Isolation, beschrieben: de Bold et al. verabreichten in ihrem Experiment Ratten einen Extrakt, den sie aus Vorhöfen gewonnen hatten, und stellten dabei sowohl einen Blutdruckabfall als auch eine stark erhöhte Natriurese fest (Bold, et al., 1981). Inzwischen ist bekannt, dass das schnelle Absinken des Druckes auf eine periphere Vasodilatation zurückzuführen ist. Vermittelt über die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (PGK I) wird einerseits die Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum inhibiert und zugleich die Myosin-Phosphatase aktiviert, was beides zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt (Tang, et al., 2003). Die vermehrte Natrium-Ausscheidung liegt durch Weitstellung des Vas afferens primär an der insgesamt erhöhten GFR (Cogan, 1986), andererseits auch an einer Hemmung der Na^+-Aufnahme im medullären Sammelrohr (Rocha, et al., 1990) sowie einer Inhibition der Angiotensin-II-abhängigen Natriumresorption im proximalen Tubulus (Harris, et al., 1987). Natriuretische Peptide schwächen zudem eine renale Hypertension ab, allerdings nicht via Renin-Suppression (Demerath, et al., 2014). Vielmehr hat sich in Studien mit Zelltyp-spezifischen Knockout-Mäusen (siehe Tabelle 3) bestätigt, dass der bekannte akute Blutdruckabfall durch NPs über eine Dilatation der glatten Gefäßmuskulatur (Holtwick, et al., 2002) vermittelt wird.

Genotyp	**Arterieller Blutdruck**	**Blutdruckverhalten bei ANP-Gabe**	**Endothelpermeabilität nach ANP-Infusion**
Wildtyp	normoton	↓	↑
GCA-KO (total)	hyperton	-	-
SMC-GCA-KO	normoton	-	nicht durchgeführt
EC-GCA-KO	hyperton	↓	-

Tabelle 3: ANP-Antworten gewebespezifischer GCA-KO-Mäuse

GCA Guanylat-Cyclase A. **SMC** glatte Muskelzellen. **EC** Endothelzellen [nach Saito (Saito, 2010)].

Über Endothelzellen wird NP-abhängig durch eine Steigerung von Caveolin-abhängiger Transzytose (Chen, et al., 2011) die Gefäßpermeabilität erhöht und somit schnell aber nachhaltig das intravasale Volumen gesenkt (Sabrane, et al., 2005). Ebenfalls das Endothel nimmt mittels GCA-Signalweg positiven Einfluss auf Angiogenese und Revaskularisation nach Ischämie (Kuhn, et al., 2009). Über diese „klassischen“ Effekte hinaus werden

natriuretischen Peptide auch Wirkungen auf die Energie-Homöostase wie eine Modulation der Lipolyse oder der Insulin-Sekretion zugeschrieben (Moro, et al., 2013), sogar über einen positiven Einfluss bei Tumorerkrankungen wird teilweise spekuliert (Zhang, et al., 2014).

Diese breite Palette an positiven Wirkungen weckt nachvollziehbar Hoffnung auf eine mögliche therapeutische Nutzung der natriuretischen Peptide, speziell was Bluthochdruck, Herzinsuffizienz, Myokardinfarkte und Nierenerkrankungen betrifft (Saito, 2010). In der klinischen Praxis durchsetzen konnte sich bisher noch keiner dieser Ansätze, die oben erwähnte Kombination aus AT_1-Hemmern und Inhibitoren der neutralen Endopeptidase ist jedoch für die Behandlung der Herzinsuffizienz seit Kurzem zugelassen (McMurray, et al., 2014). Des Weiteren stellt BNP (bzw. NT-proBNP) nach der aktuellen Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Kardiologie einen der zentralen Laborwerte in der Diagnostik der Herzinsuffizienz dar.

5.2. SPEZIELLE EFFEKTE AUF DEN PODOCYTEN

Auch Podocyten verfügen über Rezeptoren für natriuretische Peptide (Chansel, et al., 1990). Wie bereits im Abschnitt zum Feinbau der glomerulären Filtrationsbarriere kurz erwähnt, verursacht ANP einen deutlichen Anstieg der cGMP-Spiegel im Podocyten (Chevalier, et al., 1992), dessen funktionelle Auswirkungen bisher allerdings kaum erforscht sind. Eine recht spekulative Übersicht, da größtenteils auf *in vitro*-Daten glattmuskulärer Zelllinien beruhend, bietet Lewko (Lewko, et al., 2002). Dort werden mögliche Einflüsse auf die Adhäsion an der GBM, die Regulation der cAMP-Konzentration oder die Apoptose diskutiert. Eher zurückhaltend mit Aussagen zu Funktionen ist Pavenstädt (Pavenstädt, et al., 2003). Beide stimmen jedoch in ihren Interpretationen überein, dass eine in Kultur hervorgerufene Disaggregation von Aktinfilamenten einer Erschlaffung des Podocyten im Sinne einer veränderten Durchlässigkeit des Schlitzdiaphragmas *in vivo* entsprechen könnte (Sharma, et al., 1992). Ein weiterer Effekt spielt sich möglicherweise weiter distal im Nephron ab: Durch Sekretion von cGMP könnten tubuläre Ionenkanäle und somit die Resorption beeinflusst werden (Ardaillou, et al., 1993; Hirsch, et al., 1999; McCoy, et al., 1995).

Etwas besser charakterisiert als die möglichen funktionellen Effekte ist die Regulation von cGMP im Podocyten. Der NP- und NO-Signalweg scheinen sich hierbei wechselseitig zu kontrollieren (Stepinski, et al., 2000; Lewko, et al., 2006). Zusätzlichen Einfluss nimmt

mechanischer Stress, der die cGMP-Antwort kultivierter Podocyten senkt; Glucose hingegen wirkt permissiv für dessen Bildung (Lewko, et al., 2004). Dadurch wird folgerichtig die PKG I aktiviert, was in diesem Fall jedoch erstaunlicherweise die Permeabilität für Albumin *in vitro* steigert (Piwkowska, et al., 2014). Den gleichen Effekt erzielt man in Zellkultur durch Zugabe von H_2O_2 (Piwkowska, et al., 2012). Auch ist die PKG I möglicherweise an der Insulin-vermittelten Glucoseaufnahme in den Podocyten beteiligt (Piwkowska, et al., 2014). Darüber hinaus wird der oben erwähnte Ionenkanal TRPC6 durch erhöhtes cGMP blockiert (Takahashi, et al., 2008). Hemmt man den cGMP-Abbau durch PDE-5-Inhibitoren, lässt sich in Zellkultur eine Angiotensin II-vermittelte TRPC6-Dephosphorylierung (und damit Aktivierung) antagonisieren und die Ausbildung eines motileren Phänotyps verhindern, der mit Proteinurie in Verbindung gebracht wird (Hall, et al., 2014). Auch im Rattenmodell der diabetischen Nephropathie verursachen PDE-5-Hemmer vor allem im Podocyten einen cGMP-Anstieg und zeigen, unabhängig vom Blutdruck, einen positiven Einfluss auf Fibrosierung und Remodeling des Glomerulum (Fang, et al., 2013). Welchen Anteil bei der Regulation der Podocytenmotilität und der Abschwächung fibrotischer Prozesse die lösliche bzw. die membranständige Guanylat-Cyclase haben und in welchem Maße sie die Funktion der anderen ersetzen können, ist nicht abschließend geklärt. Ein Unterschied besteht jedoch in ihrem Verhalten bei Stimulation durch Angiotensin II: Dieses verringert über AT_1-Rezeptoren und die Proteinkinase C die ANP-abhängige cGMP-Antwort im kultivierten Podocyten, der NO-Signalweg hingegen scheint durch AT_2-Rezeptoren kontrolliert zu werden (Golos, et al., 2002; Lewko, et al., 2006). Einen vereinfachten Überblick zu den ANP- und BNP-Wirkungen im Podocyten bietet die nebenstehende Abbildung 13.

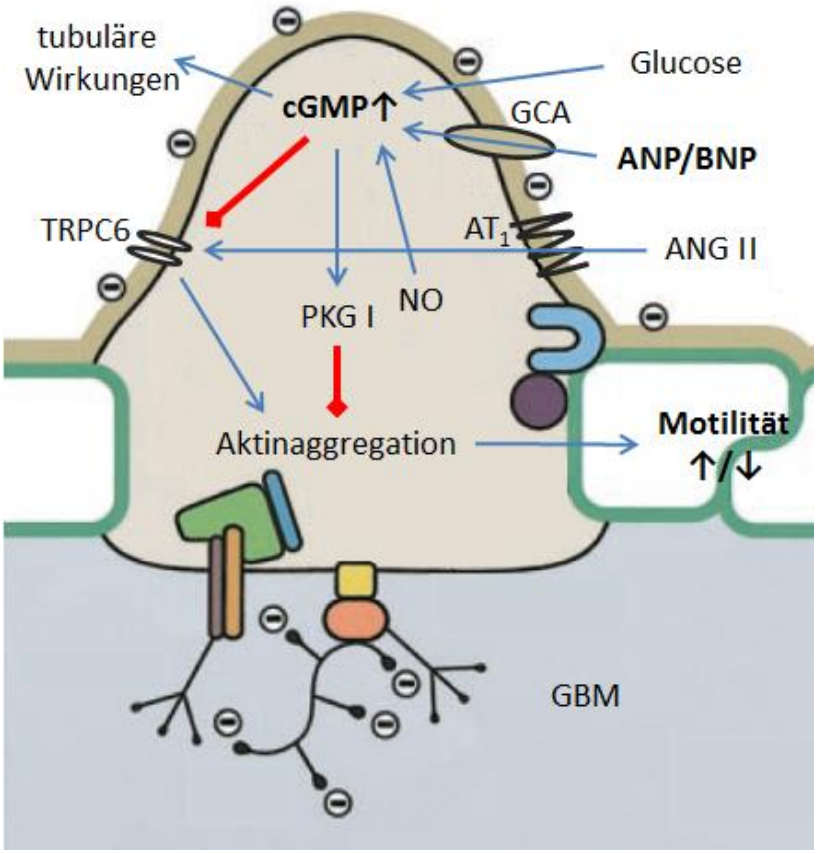

Abbildung 13: Podocyten-spezifische Wirkungen von ANP und BNP

Blaue Pfeile Aktivierung. **Rote Pfeile** Hemmung. **Minuszeichen** negative Ladung. **GBM** glomeruläre Basalmembran. **ANG II** Angiotensin II. **AT_1** Angiotensin-Rezeptor 1. **PKG I** Proteinkinase G I. **TRPC6** transient receptor potential channel 6. **NO** Stickstoffmonoxid. **cGMP** cyclisches Guanosinmonophosphat. **GCA** Guanylatcyclase A. **ANP/BNP** atrial/brain natriuretic peptide [Graphik ursprünglich von Pavenstädt übernommen (Pavenstädt, et al., 2003), Zusammenhänge sind entsprechend der im Fließtext angegebenen Literatur selbst eingefügt].

Natriuretische Peptide haben multiple Effekte auf den Organismus. Vor allem ihr positiver Einfluss auf Vorgänge wie die Blutdruckregulation, den Salz-Wasser-Haushalt und fibrotische Umbauprozesse ist zu nennen. Diese Faktoren spielen allesamt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung chronischer Niereninsuffizienz. Führt man sich die komplexe Regulation von cGMP als *second messenger* natriuretischer Peptide im Podocyten und dessen Einfluss auf die podocytäre Motilität vor Augen, so liegt die Vermutung nahe, dass natriuretische Peptide auch über den Podocyten nephroprotektive Wirkung entfalten könnten. Es gibt bereits einige Studien, die ebenfalls zu diesem Schluss kommen. Die dort durchgeführten Experimente am Tiermodell (Ogawa, et al., 2012; Fang, et al., 2013) legen zwar eine positive Wirkung der podocytären GCA und des zugehörigen Signalwegs im Rahmen von

Nephropathien nahe, allerdings ist der beobachtete Effekt nicht sicher von Störgrößen wie etwa dem Blutdruck oder dem Einfluss von lokaler NO-Synthese abgrenzbar. Auf der anderen Seite lassen sich Beobachtungen an kultivierten Zellen (Golos, et al., 2002; Lewko, et al., 2006) natürlich nicht eins zu eins auf die Situation *in vivo* übertragen. Bisher liegt lediglich eine Studie von Staffel et al. vor, bei der über einen Podocyten-spezifischen Knockout der Guanylatcyclase A die Vorteile beider Herangehensweisen kombiniert wurde. Die These von der nephroprotektiven Wirkung natriuretischer Peptiden direkt am Podocyten wurde dort grundsätzlich bestätigt (Staffel, et al., 2017). Allerdings ist das dort verwendete Schädigungsmodell mit isoliert hohem Aldosteron (und damit supprimiertem Renin und Angiotensin II) nur eingeschränkt auf den klinischen Alltag übertragbar. Sehr viel häufiger liegt eine übermäßige Aktivierung des gesamten RAAS mit deutlicher Hypertension vor. Diese Konstellation findet sich unter anderem bei der einseitigen Nierenarterienstenose, weshalb dieses Modell für die vorliegende Arbeit verwendet wurde. Dabei kommt es zu einer erhöhten Sekretion von Renin in der stenosierten Niere, was eine Aktivierung des RAAS zu Folge hat. Dies führt zu arteriellem Bluthochdruck und schließlich zu einer hypertensiven Nephropathie (Goldblatt, et al., 1934). Damit soll diese Arbeit die Funktion der podocytären Guanylat-Cyclase A genauer charakterisieren und deren lokale Wirkungen von jenen abgrenzen, die über die glatte Gefäßmuskulatur, die Nierentubuli und das Endothel vermittelt werden. Weiterhin soll sie dazu beitragen, das Verständnis der Pathophysiologie chronischer Nierenschädigung zu vertiefen. Durch das verwendete Modell der Nierenarterienstenose soll insbesondere genauer charakterisiert werden, inwiefern über natriuretische Peptide im Podocyten Schäden entgegengewirkt werden kann, die durch Angiotensin II und arterielle Hypertonie vermittelt werden. Möglicherweise lassen sich so bisher unbekannte Kompensationsmechanismen aufdecken, die zu neuen Therapieoptionen bei der Behandlung chronischer Niereninsuffizienz führen.

III. METHODEN

1. VERSUCHSTIERE UND HALTUNG

Wie oben beschrieben stellt die Abgrenzung systemischer und lokaler Effekte ein Kernproblem bei der Charakterisierung der natriuretischen Peptide dar. Diese Problematik wurde durch Verwendung eines Stammes genetisch veränderter Mäuse (*Mus musculus*) umgangen, die einen Podocyten-spezifischen Knockout der Guanylat-Cyclase A aufweisen.

Für diesen organspezifischen Knockout wurde das lox/Cre-System nach Sauer verwendet (Sauer, et al., 1988). Bei dieser Technik lassen sich mit der ursprünglich aus einem Bakteriophagen stammenden Cre-Rekombinase zielgerichtet Genfragmente ausschneiden, die über bestimmte Sequenzen (loxP-sites) markiert wurden. Mäuse, deren GCA über homologe Rekombination mit loxP-sites versehen worden war, wurden durch das Labor von Prof. Dr. Michaela Kuhn (Universität Würzburg, Institut für Physiologie) zur Verfügung gestellt. Homozygot gefloxte Tiere (GCA $flox^{+/+}$) wurden mit Mäusen gekreuzt, welche heterozygot die Cre-Rekombinase abhängig vom Podocyten-spezifischen Gen Podocin (Podo-Cre^{tg}) exprimieren. Mit den erzeugten doppelt heterozygoten Tieren wurde eine Zuchtlinie etabliert. Der genetische Hintergrund der Mäuse war gemischt (SV129 und C57BL/6).

Der Genotyp GCA $flox^{+/+}$ / Podocin Cre^{tg} weist also in allen Geweben die Markierung der GCA über die loxP-sites auf, jedoch wird die Cre-Rekombinase ausschließlich im Podocyten exprimiert und kann somit nur dort einen Knockout der GCA bewirken, wie in Abbildung 14 dargestellt. Die im Folgenden verwendete Abkürzung KO bezieht sich auf genau diesen Genotyp, WT bezeichnet neben Wildtypen im engeren Sinne auch Tiere mit heterozygoter bzw. nicht gefloxter GCA oder fehlender Expression von Cre-Rekombinase. Unter Standardbedingungen zeigen die so erzeugten Knockouts nach bisherigem Stand der Kenntnis keinen besonderen Phänotyp (Staffel, et al., 2017). Bei tiefergehendem Interesse an dieser Methode sei auf eine Übersichtsarbeit von Nagy verwiesen, in der noch weitere Anwendungsmöglichkeiten beschrieben werden (Nagy, 2000).

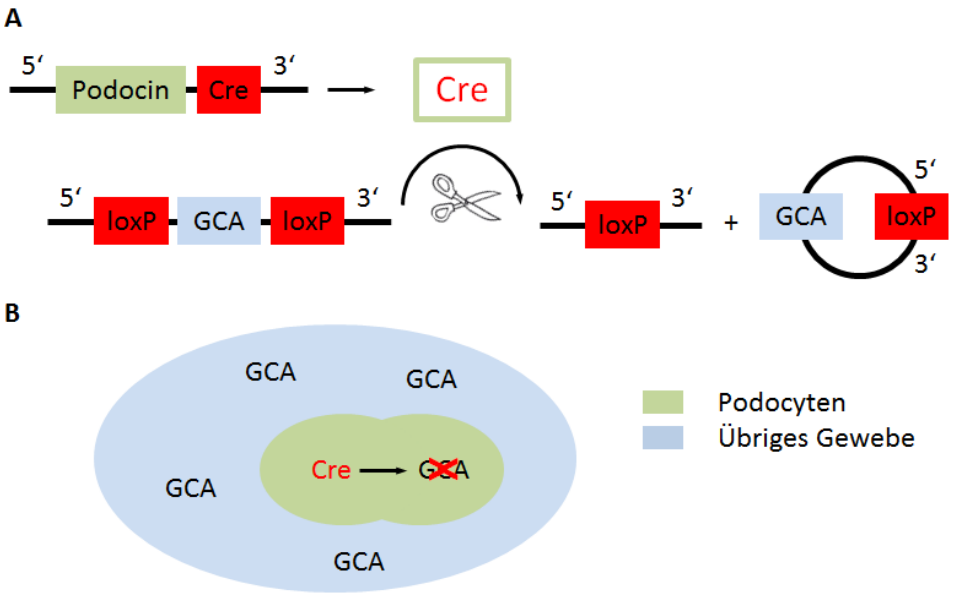

Abbildung 14: lox/Cre-System

A Die Cre-Rekombinase wird Podocin-abhängig exprimiert. Sie katalysiert die Exzision der mit loxP-sites flankierten Guanylat-Cyclase A. **B** Dadurch kommt es nur im Podocyten, nicht aber im restlichen Organismus zu einem Knockout des ANP-Rezeptors.

Die verwendeten Mäuse hatten ein Alter von 25-32 Wochen bei Versuchsende und waren alle weiblich. Insgesamt kamen 14 Knockouts zum Einsatz, von denen 11 einer operativen Nierenarterienstenose unterzogen wurden, sowie 19 Wildtypen, von denen 10 operiert wurden. Die Tiere wurden über die gesamte Versuchsdauer in einem konventionellen Tierlabor in Käfigen mit freiem Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter gehalten. Das Hell-Dunkel-Intervall betrug zwölf Stunden, die Raumtemperatur etwa 23°C und die relative Luftfeuchte um 55%. Grundsätzlich wurden die Versuchstiere nach den jeweils gültigen Vorschriften und ethischen Standards behandelt.

2. ÜBERSICHT ÜBER DEN VERSUCHSABLAUF

In Abbildung 15 ist der zeitliche Ablauf der durchgeführten Experimente dargestellt. Die Dauer erstreckte sich über zwei Durchführungsrunden von je 3,5 Monaten. Die erste Woche diente zur Gewöhnung an die unten näher erläuterte Tail-Cuff-Methode. Ab Woche 2 wurden die erhobenen Werte festgehalten und jeweils nach der Messung Spontanurin gesammelt und das Körpergewicht bestimmt. Im Verlauf der vierten Woche kamen die Versuchstiere zum ersten Mal in den metabolischen Käfig. In Woche 5 wurde die GFR gemessen, in Woche 6

die unilaterale Nierenstenose durchgeführt. Bis zum Ende des dritten Monats wurden wieder Blutdruck, Herzfrequenz und Körpergewicht gemessen sowie Spontanurin gesammelt. In Woche 13 folgte erneut der Stoffwechselkäfig, in der letzten Woche die zweite GFR-Messung sowie die Organentnahme.

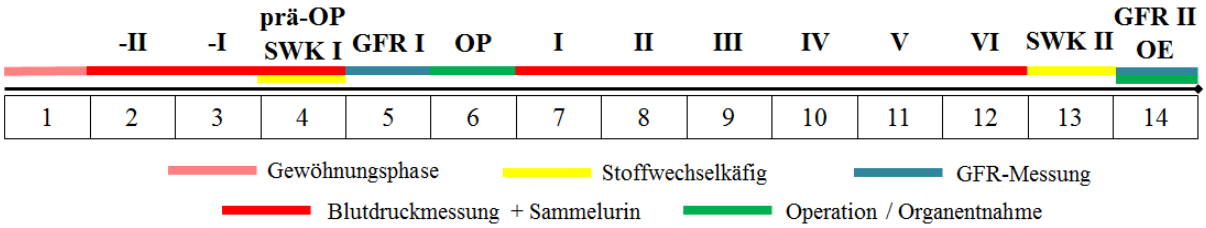

Abbildung 15: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

Die arabische Zahlenfolge steht für die absolut verstrichenen Wochen ab Versuchsbeginn. Die Blutdruckmessungen und das Sammeln von Spontanurin sind zudem mit römischen Ziffern gekennzeichnet. Diese stellen eine Zeitangabe relativ zur OP dar, auf welche in der Folge der besseren Übersichtlichkeit halber Bezug genommen wird. Nähere Erläuterungen zu den einzelnen Methoden finden sich an entsprechender Stelle im Fließtext.

3. EINSEITIGE NIERENARTERIENSTENOSE

Zur Erzeugung eines arteriellen Bluthochdrucks wurde von Prof. Dr. med. Frank Schweda (Universität Regensburg, Lehrstuhl für Physiologie) operativ eine unilaterale Nierenarterienstenose nach Goldblatt (NAS, 2K1C) durchgeführt (Goldblatt, et al., 1934), die beim Menschen eine der häufigsten Ursache einer sekundären Hypertonie darstellt. Dazu wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert und auf einem beheizten Operationstisch fixiert. Nach großflächiger Desinfektion des Operationsgebietes wurde mit sterilem Operationsbesteck über einen etwa 0,5cm langen Hautschnitt an der linken Flanke der Zugang in das Retroperitoneum freipräpariert. Unter zehnfacher lichtmikroskopischer Vergrößerung erfolgte die Darstellung der Arteria renalis sinistra, deren Lumen mit einem sterilen Clip auf 0,1mm Durchmesser verengt wurde. Das Operationsgebiet wurde mittels Muskelnaht sowie Hautklammern verschlossen. Die OP-Dauer betrug etwa 15 Minuten. Es traten bei keinem der Tiere Komplikationen auf, insbesondere Wundinfektionen oder Abszesse entwickelten sich in der Folge nicht. An den Kontrolltieren wurden keine chirurgischen Maßnahmen durchgeführt, um nicht durch mögliche Vernarbungen im Bereich der Nierenarterie ebenfalls eine Stenose zu erzeugen.

4. MESSUNG PHYSIOLOGISCHER PARAMETER

4.1. BLUTDRUCK UND HERZFREQUENZ

Um einerseits die Einstellung eines arteriellen Hypertonus, also des Operationserfolges, zu überprüfen und andererseits mögliche Unterschiede aufgrund des Genotyps zu ermitteln, wurden der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz gemessen. Benutzt wurde dazu die nicht-invasive Tail-Cuff-Methode (Alexander, 1957), zur Anwendung kam ein entsprechendes Messgerät der Firma TSE Deutschland.

Bei dieser Methode werden den Versuchstieren in speziellen beheizten Kammern am Schwanz eine Blutdruckmanschette stammnah sowie distal davon ein Sensor angelegt. Dieser registriert ankommende Pulswellen und visualisiert sie über die zugehörige Software an einem angeschlossenen Rechner. Erhöht man gleichmäßig den Druck in der Manschette, so nehmen die Ausschläge der Wellen kontinuierlich ab. Ist der systolische Blutdruck erreicht oder überschritten, so wird die Amplitude Null, da die Manschette den Blutfluss abdrückt und der Sensor keinen Puls mehr erfassen kann. Um stressbedingte Schwankungen zu minimieren, wurde das arithmetische Mittel von jeweils acht aufeinanderfolgenden Messungen als tatsächlicher Druck angenommen. Die Herzfrequenz wurde aus der Abfolge der Pulswellen automatisch von der zugehörigen Software ausgezählt, auch hierbei wurde der Mittelwert aus acht Messungen verwendet. Die Tiere wurden zu Beginn des Versuchs eine Woche lang an die Methode gewöhnt. Im weiteren Verlauf wurden Blutdruck und Herzfrequenz an mindestens vier Tagen pro Woche zu vergleichbarer Tageszeit gemessen und die Werte jeweils einer Messwoche zusammengefasst.

4.2. PLASMARENIN

Bei der Organentnahme wurden über Punktion der Vena facialis Blutproben entnommen. In diesen wurde die Plasmakonzentration von Renin bestimmt, die durch eine Aktivierung des RAAS in Folge der NAS anteigen sollte. Die Messung wurde von Katharina Ehm (Universität Regensburg, Lehrstuhl für Physiologie) mittels eines Radioimmunassay (Dia Sorin) durchgeführt.

4.3. HÄMATOKRIT UND KÖRPERGEWICHT

Zur Einschätzung des Volumenstatus durch mögliche Wassereinlagerungen im Rahmen eines Eiweißverlustes oder Volumenretention bei akutem Nierenversagen wurden die Tiere einerseits täglich gewogen und andererseits der Hämatokrit direkt vor der OP sowie acht Wochen danach aus den für die Reninbestimmung gewonnenen Blutproben bestimmt. Die dafür verwendeten Glaskapillare wurden mit 8000rpm für 5 Minuten zentrifugiert (Hettich Zentrifugen Haematokrit 210) und der Hämatokrit manuell abgemessen. Das Blutplasma wurde bei -20°C eingefroren, die korpuskulären Bestandteile wurden verworfen.

4.4. GLOMERULÄRE FILTRATIONSRATE

Bei der Stadieneinteilung einer chronischen Niereninsuffizienz stellt das Hauptkriterium die glomeruläre Filtrationsrate dar. Diese wurde von Janina Staffel (Universität Regensburg, Institut für Physiologie) bestimmt. Die zweite Messung der zweiten Runde wurde ersatzweise von Dr. med. vet. Katharina Mederle (ebenfalls Universität Regensburg, Institut für Physiologie) durchgeführt. Zur Anwendung kam die Single-Shot-Clearence-Methode wie beschrieben in einer Arbeit von Qi (Qi, et al., 2004). Vereinfacht wurde den Tieren dazu fluoreszenzmarkiertes Sinistrin (Mannheim Pharma & Diagnostics) injiziert und dessen Konzentration im Blut in bestimmten Zeitabständen gemessen. Das Sinistrin verteilt sich zunächst rasch in den Extrazellulärraum und wird anschließend renal ausgeschieden. Da es glomerulär frei filtriert und tubulär weder sezerniert noch resorbiert wird, lässt sich aus der Eliminationskurve die GFR abschätzen.

5. URINANALYSE

5.1. SPONTAN- UND SAMMELURIN

Um mögliche Veränderungen im Salz-Wasser-Haushalt durch Aktivierung des RAAS und Schädigungen der tubulären Funktion zu erfassen, wurde zunächst täglich Spontanurin gesammelt. Die Proben jeweils einer Maus wurden wochenweise gepoolt. Zusätzlich wurde sowohl vor der Operation als auch sechs Wochen postoperativ in einem metabolischen Käfig (Hatteras Instruments, MMC100) über drei Tage hinweg Sammelurin bei Wasser- und Nahrungsversorgung *ad libitum* gewonnen. Die Proben wurden durch Zentrifugation

aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Das Volumen wurde unter Annahme einer Dichte von annähernd 1g/ml abgewogen.

5.2. BESTIMMUNG VON ELEKTROLYTEN UND OSMOLARITÄT

Der Elektrolytgehalt des Urins wurde mit einem Flammenphotometer (Jenway Ltd.) gemessen. Für Na^+ erfolgte dazu eine Verdünnung von 1:5000, für K^+ von 1:10000. Um mögliche systematische Fehler durch Verschleppung zu minimieren, wurden je vier Proben zweimal in entgegengesetzter Reihenfolge vermessen. Davor, danach und bei Richtungswechsel erfolgte eine Eichung mit ionenfreiem Wasser und einer Standardlösung des jeweiligen Ions.

Die Urin-Osmolalität wurde mit einem Osmometer (Gonotec) über Gefrierpunktbestimmung gemessen. Dazu wurden je 50µl der abzentrifugierten Proben bis zur Kristallisation abgekühlt. Aus dem Gefrierpunkt wurde durch das Gerät automatisch die Osmolalität errechnet. Unter Annahme einer Dichte von 1g/ml entspricht diese in der Osmolarität der Proben, welche im Folgenden verwendet wird.

5.3. ALBUMIN- UND KREATININ-MESSUNG

Zur Bestimmung von Albumin wurde ein ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, Firma ICL) verwendet. Wie von Engvall beschrieben (Engvall, et al., 1971) beruht diese Methode auf der spezifischen Bindung primärer Antikörper an das zu untersuchende Molekül. An sekundäre Antikörper gekoppelte Enzyme katalysieren anschließend eine Farbreaktion, deren Ausmaß photometrisch gemessen werden kann und mit der Menge an Antigen korreliert. Die Proben wurden nach Herstellerprotokoll behandelt. Die Kreatinin-Konzentration wurde mit dem „QuantiChrom Creatinine Assay Kit“ von BioAssay Systems, ebenfalls nach Herstellerprotokoll, über Photometrie indirekt gemessen. Aus den beiden erhobenen Parametern wurde die ACR (albumin-creatinine-ratio bzw. Albumin-/Kreatinin-Ratio) bestimmt, um intra- und interindividuelle Schwankungen in der Konzentration des Spontanurins zu auszugleichen.

6. UNTERSUCHUNG DER ENTNOMMENEN ORGANE

6.1. ORGANENTNAHME

Nach Ende des Experiments wurden die Mäuse getötet. Folgende Organe wurden entnommen, gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren: Herz, Gehirn, Milz, Leber, Nieren und Nebennieren. Die Nieren wurden zusätzlich noch halbiert, um daraus sowohl Protein als auch RNA isolieren zu können. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Organe bei -80°C gelagert.

6.2. ISOLIERUNG VON RNA

Renale RNA wurde über verschiedene Fällungsreaktionen mit TRIZOL (Invitrogen), Chloroform und Isopropanol isoliert. Die Qualität der RNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese (Peacock, et al., 1968) überprüft.

6.3. REVERSE TRANSKRIPTION UND QUANTITATIVE REAL TIME PCR

Aus der gewonnenen RNA wurde mittels reverser Transkription cDNA gewonnen (Spiegelman, et al., 1971). Dazu wurden oligo-dT-Primer benutzt, um möglichst nur messenger RNA umzuschreiben. Die Transkriptionsrate bestimmter mRNAs wurde durch eine real time PCR quantifiziert (Simpson, et al., 2000). Die Markierung der erzeugten doppelsträngigen DNA erfolgte mit SYBRgreen (Firma Roche), die Fluoreszenz wurde jeweils am Ende eines Zyklus gemessen. Durchgeführt wurde die Reaktion mit dem LightCycler 480 (ebenfalls Roche), eine Wasserprobe diente als Negativkontrolle. Die Messung wurde für Renin und Aktin von Katharina Ehm (Universität Regensburg, Lehrstuhl für Physiologie) wiederholt. Aus der Zunahme der Intensität und dem Vergleich mit einer Verdünnungsreihe wurde die relative Expression berechnet und jeweils auf Aktin normiert, das als *housekeeping gene* konstitutiv exprimiert wird.

IV. ERGEBNISSE

Die folgenden Graphiken wurden mit GraphPad Prism erstellt, die zu Grunde liegenden Daten wurden mit Microsoft Excel und GraphPad Prism verarbeitet. Als theoretische Grundlage für die statistischen Berechnungen sei auf Weiß, insbesondere Kapitel 10.2.3, verwiesen (Weiß, 2013). Es sind jeweils Mediane mit den zugehörigen Interquartilsabständen abgebildet, da die meisten Messgrößen eine ausgeprägte Schiefe mit zum Teil deutlichen Ausreißern zeigten. Dadurch wurde eine Verzerrung durch Extremwerte vermieden, von einer Normalverteilung der gemessenen Werte konnte entsprechend nicht ausgegangen werden. Zahlenangaben im Fließtext sind in folgendem Muster gehalten: [Median] [(75. Perzentile – 25. Perzentile)] [Maßeinheit]. So betrug beispielsweise das Alter der Versuchstiere bei Versuchsende 28 (3) Wochen, d.h. der Median war 28 Wochen, wobei 50% der Tiere in einem Bereich von drei Wochen um diesen Median enthalten sind. Dieser Bereich muss dabei nicht notwendigerweise symmetrisch sein.

Da die Auswirkungen der akuten Nierenarterienstenose auf das kardiovaskuläre System, den Elektrolyt- und Wasserhaushalt sowie Nierenschäden bereits hinreichend beschrieben und belegt sind, erfolgte bezüglich des Vergleichs operierter und nicht-operierter Tiere lediglich eine deskriptive Analyse der Daten. Hinsichtlich möglicher Unterschiede zwischen operierten Knockouts und Wildtypen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Da einerseits die grenzwertige Stichprobengröße keine verlässliche Testung auf Normalverteilung zuließ und dieser Test andererseits sehr robust gegenüber Ausreißern ist, wurde diesem der Vorzug gegenüber dem t-Test für unverbundene Stichproben gegeben. Die Nullhypothese H_0 geht jeweils von keinem Unterschied zwischen den beiden Gruppen aus. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Ist kein p-Wert angegeben, ist von einem nicht-signifikanten (n.s.) Unterschied auszugehen. Weitergehende Erläuterungen zu einzelnen Ergebnissen finden sich im Fließtext an entsprechender Stelle.

1. PHYSIOLOGISCHE PARAMETER

1.1. BLUTDRUCK UND HERZFREQUENZ

Natriuretische Peptide nehmen erheblichen Einfluss auf den Kreislauf, als dessen wichtigste Parameter Herzfrequenz und Blutdruck bestimmt wurden (siehe Abbildung 16).

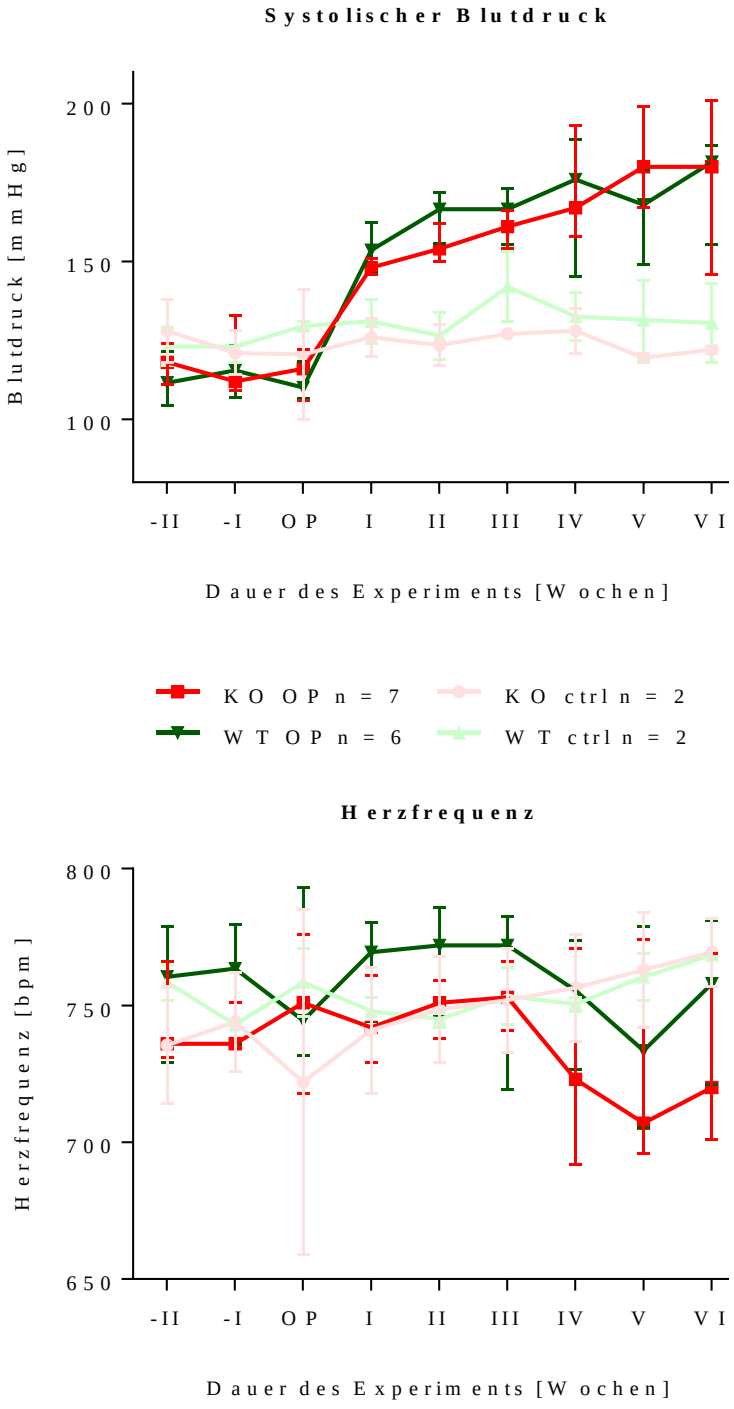

Abbildung 16: Kreislaufparameter

Der Blutdruck und die Herzfrequenz wurden neun Wochen lang täglich nicht-invasiv über die Tail-Cuff-Methode gemessen. Abgebildet ist der Median jeweils einer Woche mit den entsprechenden Interquartilsabständen. Oben abgebildet ist der systolische Blutdruck, unten die Herzfrequenz. Die Operation fand am Ende der auf der Zeitleiste mit „OP“ bezeichneten Woche statt, d.h. erst die Wochen „I“ bis „VI“ enthalten Informationen bezüglich möglicher Auswirkungen der einseitigen Nierenarterienstenose. In dunklen Farben dargestellt sind die operierten Tiere (dunkelrot für die Knockoutmäuse, dunkelgrün für die Wildtypen), in hellen Tönen die nicht-operierten Kontrollen (hellrot für Knockouts, hellgrün für Wildtypen). Die Farbgebung ist im Weiteren so beibehalten, auf Änderungen ist an entsprechender Stelle hingewiesen.

Der Blutdruck betrug zu Beginn des Versuchs bei allen Tieren 116 (16) mmHg systolisch. Bei den Mäusen mit NAS kam es nach der Operation zu einer deutlichen Blutdrucksteigerung. Mit Systolen von 162 (28) mmHg bzw. 167 (27) mmHg war der Druck zwischen den Knockouts und den Wildtypen nicht signifikant unterschiedlich. Auch im zeitlichen Verlauf zeigte sich der Blutdruckanstieg beider Genotypen vergleichbar. Die Kontrollen hingegen blieben auf dem Ausgangsniveau. Die Herzfrequenz bewegte sich zu Beginn in einer Größenordnung von 736 (27) Schlägen pro Minute (bpm) für die Knockouts und 753 (31) bpm für die Wildtypen. Bei beiden Genotypen sank die Frequenz vier Wochen nach der Operation etwas ab. Die Herzfrequenz der Wildtypen war mit 766 (54) bpm bei nahezu parallelem Kurvenverlauf postoperativ signifikant ($p = 0{,}0016$) höher als die der Knockouts mit 741 (39) bpm. Bei den Kontrollen traten keine wesentlichen Veränderungen auf.

1.2. RENIN

Die Konzentration von Renin als Bestandteil des RAAS wurde im Plasma der Tiere neun Wochen nach der Operation bestimmt und ist in Abbildung 17 zu sehen. Bei den Knockouts wurden postoperativ Werte von 183 (1832) ng/ml gemessen. Zu den Wildtypen mit 785 (508) ng/ml bestand, man beachte die große Streuung, kein signifikanter Unterschied. In beiden Gruppen wiesen einzelne Mäuse Werte auf, die mehr als zehnfach höher waren als die der Kontrolltiere. Ebenso fanden sich sowohl bei den operierten Knockouts als auch den operierten Wildtypen teilweise Konzentrationen, die auf einem vergleichbaren Niveau mit den nicht-operierten Tieren waren. Des Weiteren wurde die renale Renin-Expression mittels quantitativer real-time RT-PCR der mRNA bestimmt (siehe Abbildung 18). Damit sollten die RAAS-Antworten der stenosierten und der nativen Nieren gegenübergestellt werden. Die Kontrollen zeigten vergleichbare Expressionsraten in beiden Nieren, die geclippten Tiere hingegen hatten einen stark erhöhten Expressionsquotienten, d.h. der Eingriff verursachte wie beabsichtigt eine erhöhte Expression von Renin in der stenosierten Niere bzw. eine Suppression in der nativen Niere. Einzelne Mäuse wiesen eine über 100-fache Steigerung der Renin-Expression im operierten Organ auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen den operierten Knockouts und Wildtypen war nicht festzustellen, erstere hatten einen Expressionsquotienten von 21,88 (23,41), letztere einen von 25,81 (32,18).

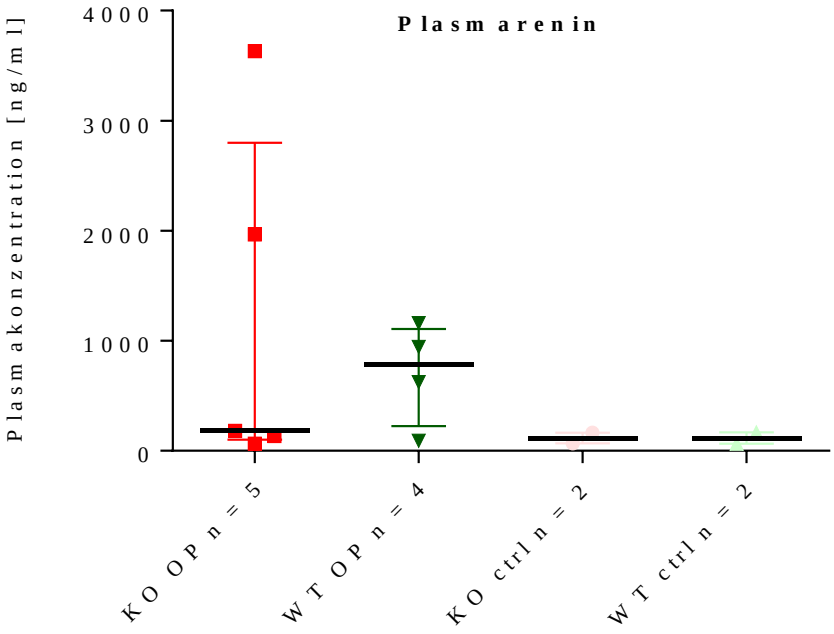

Abbildung 17: Reninkonzentration im Plasma

Die Konzentration von Renin wurde in den kurz vor Ende des Experiments für die Messung des Hämatokrit entnommenen Blutproben bestimmt.

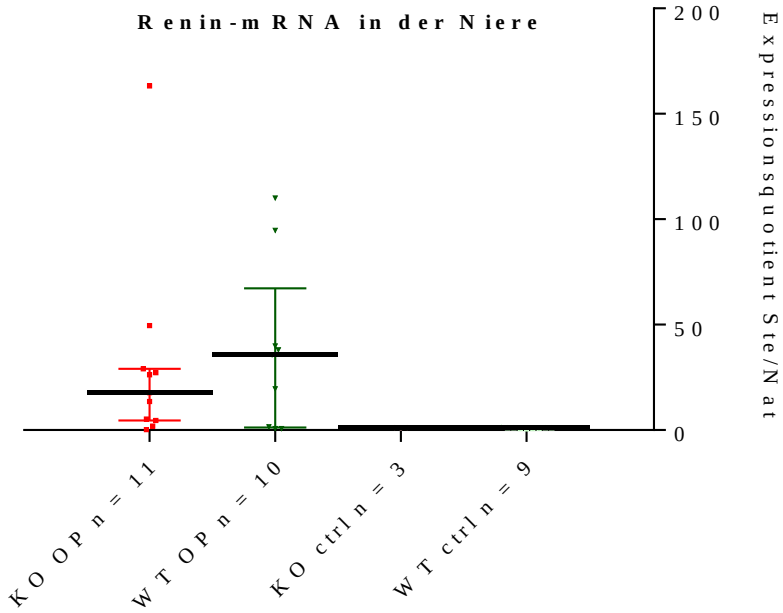

Abbildung 18: Relative renale Renin-Expression

Quotient aus der Expressionsrate der Protease Renin in der linken (stenosierten) Niere und der Expressionsrate in der kontralateralen rechten (nativen) Niere. Bei gleicher Höhe der Expression ergibt sich, wie bei den Kontrollen der Fall, ein Wert um 1, bei den operierten Tieren ist der Quotient deutlich in Richtung einer Expression in den geclippten Organen verschoben.

1.3. HÄMATOKRIT UND KÖRPERGEWICHT

Der Anteil korpuskulärer Blutbestandteile im Blut und das Körpergewicht sind beide in Abbildung 19 dargestellt. Der Hämatokrit wurde einmalig neun Wochen nach der Operation bestimmt, gewogen wurde jeden Tag. Beide Werte wurden zur Einschätzung des Volumenstatus der Tiere herangezogen. Vor allem das mögliche Auftreten von Wassereinlagerungen im Rahmen eines nephrotischen Syndroms oder eines akuten

Nierenversagens sollte damit kontrolliert werden. Das tägliche Wiegen diente zusätzlich zur Überwachung und möglichen Früherkennung postoperativer Infektionen mit entsprechendem Gewichtsverlust. Der Hämatokrit der Tiere mit NAS war mit 49 (6) % für die Knockouts nicht signifikant unterschiedlich von dem der Wildtypen mit 47 (1) % und auch gegenüber den Kontrollen unverändert.

Das Körpergewicht betrug 20,9 (1,4) g bzw. 21,1 (2,1) g für die operierten Knockouts bzw. Wildtypen und war damit nicht signifikant unterschiedlich. Da es jeden Tag gemessen wurde, konnte sein Verlauf über den gesamten Versuch beobachtet werden. Hierbei zeigte sich insbesondere direkt postoperativ bei keinem der Tiere eine Zu- oder Abnahme, das Anfangsgewicht wurde über das Experiment hinweg nahezu konstant gehalten.

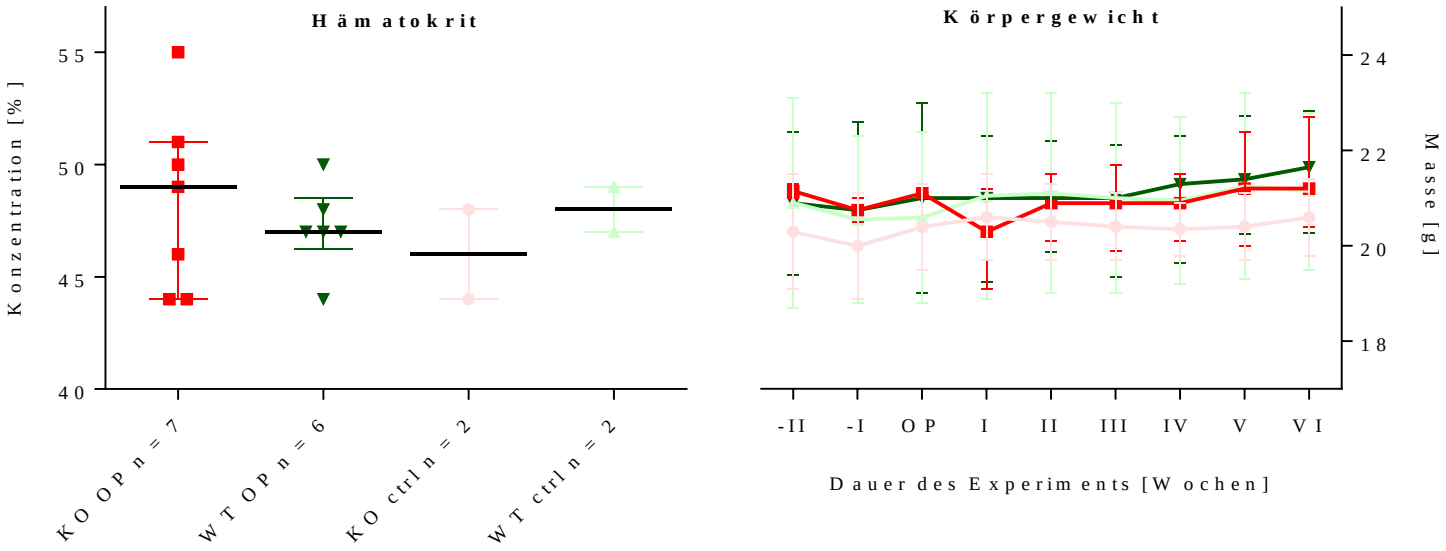

Abbildung 19: Hämatokrit und Körpergewicht

Der Hämatokrit wurde einmalig bei Organentnahme in der neunten postoperativen Woche bestimmt, das Körpergewicht hingegen jeden Tag im Verlauf des Experiments. Einzelne Werte im Graphen entsprechen dem Median jeweils einer Woche.

1.4. GLOMERULÄRE FILTRATIONSRATE

Die GFR als Hauptkriterium bei der Einteilung der chronischen Niereninsuffizienz wurde einmal vor der Operation und ein zweites Mal bei Ende des Experiments gemessen und ist in Abbildung 20 wiedergegeben. Auffällig ist, dass in allen Gruppen bei der Bestimmung gegen Ende des Versuchs die Filtrationsrate niedriger war als zu Beginn, insbesondere auch bei den

Kontrollen. Diese Feststellung ist am ehesten auf einen systematischen Fehler bei der Messung zurückzuführen, da diese von zwei verschiedenen Personen durchgeführt worden waren. Die einzelnen Messungen in sich sind von dieser systematischen Abweichung jedoch nicht betroffen. Die Werte der Knockouts und Wildtypen mit Nierenarterienstenose betrugen postoperativ 269 (64) µl/min bzw. 270 (41) µl/min, es bestand kein signifikanter Unterschied.

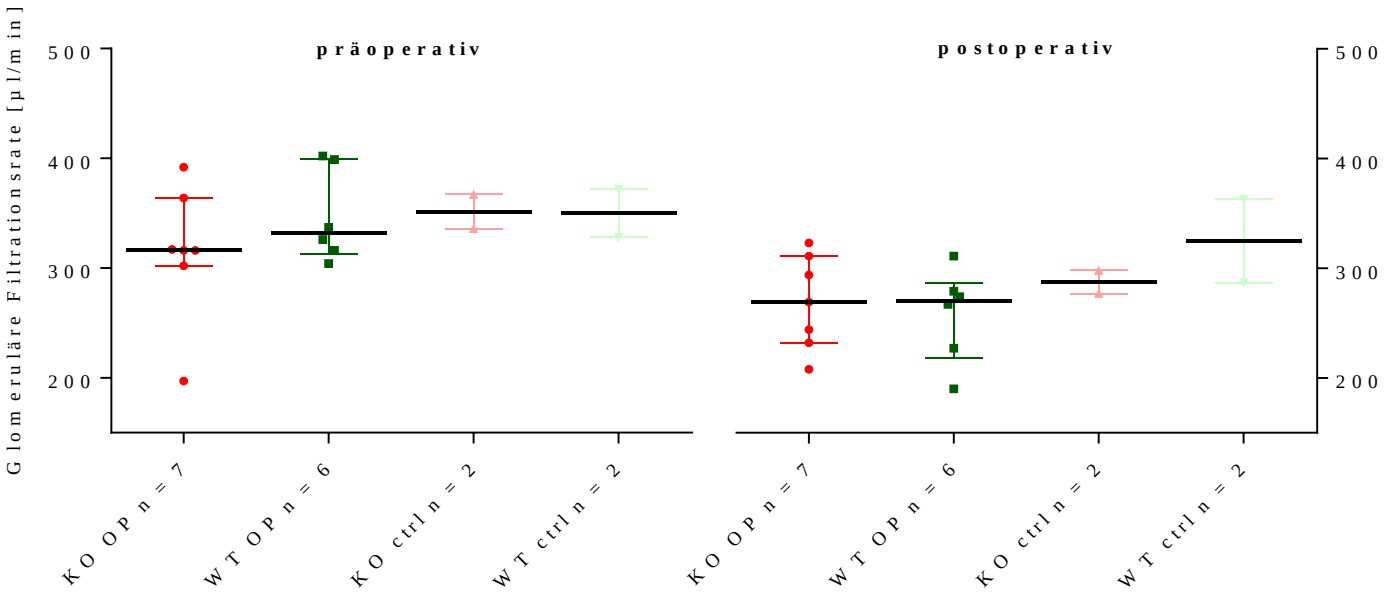

Abbildung 20: Glomeruläre Filtrationsrate

Die GFR wurde sowohl vor der Nierenarterienstenose als auch erneut bei Ende des Versuchs neun Wochen später bestimmt. Dargestellt ist jeweils die Filtrationsrate beider Nieren zusammen, eine Unterscheidung in stenosierte und native Niere ist mit der verwendeten Methode nicht möglich.

2. URINANALYSE

2.1. ELEKTROLYTGEHALT

Der im Stoffwechselkäfig gewonnene Sammelurin wurde hinsichtlich Menge und Gehalt an osmotisch wirksamen Teilchen, speziell Natrium und Kalium, analysiert (siehe Abbildung 21), um Hinweise auf mögliche Einflüsse auf den Elektrolythaushalt zu gewinnen.

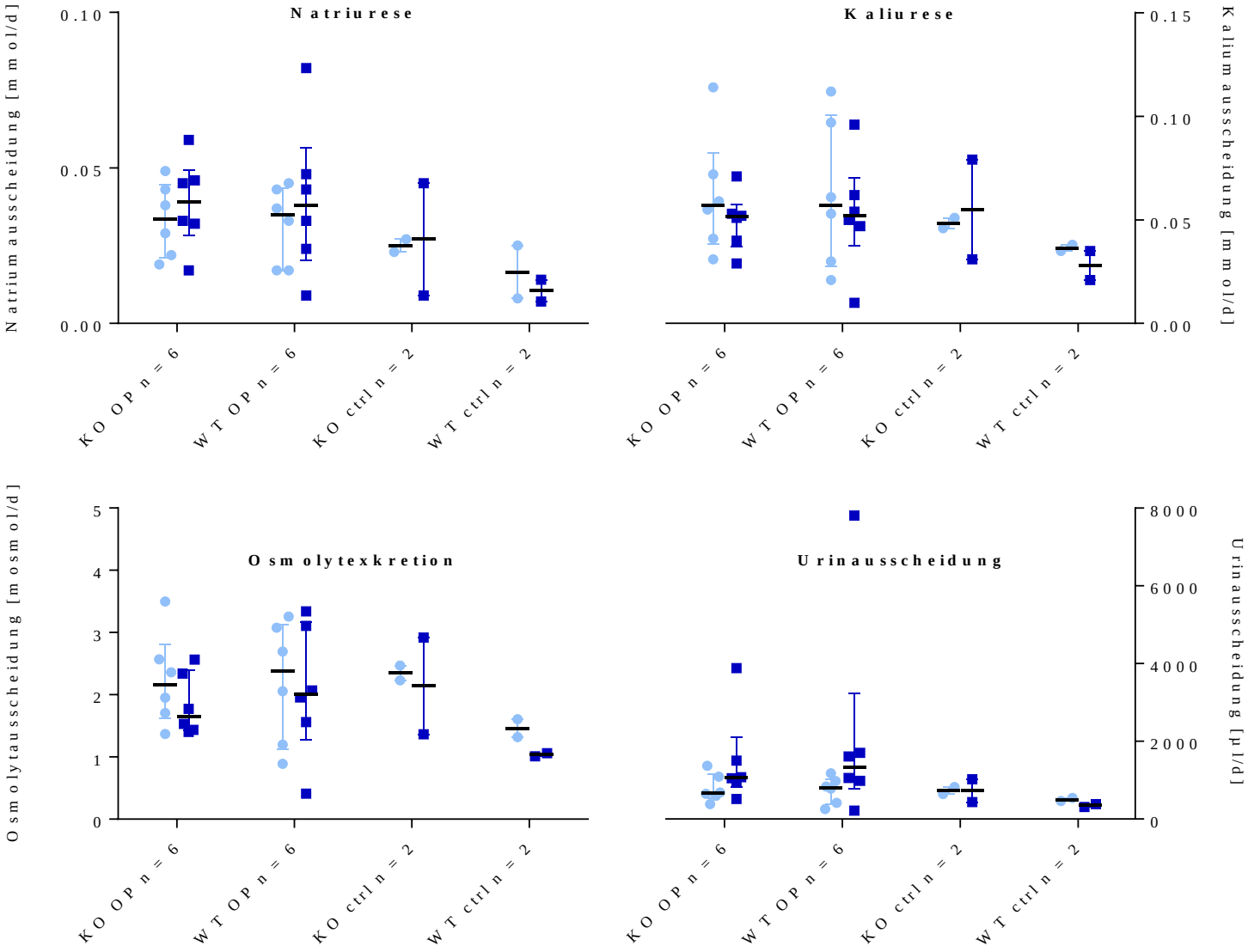

Abbildung 21: Metabolischer Käfig

Dargestellt ist der Median der täglichen Ausscheidung an Ionen (als Stoffmenge) und Urin. Die Daten wurden sowohl direkt prä- als auch sechs Wochen postoperativ jeweils über drei Tage im Stoffwechselkäfig erhoben und gemittelt. Die präoperativen Werte sind in Hellblau, die postoperativen in Dunkelblau abgebildet.

Die Tiere schieden prä- und postoperativ vergleichbare Mengen an Kalium und Natrium aus, auch die Exkretion osmotisch wirksamer Teilchen insgesamt zeigte sich unbeeinflusst durch die Operation. Lediglich die Urinproduktion der operierten Tiere war tendenziell höher als präoperativ bzw. als die Kontrollen, wobei jeweils ein extremer Ausreißer festzustellen war. Die operierten Knockouts unterschieden sich in keinem der untersuchten Parameter signifikant von den operierten Wildtypen. Im Einzelnen waren dies für die Exkretion von Natrium 0,04 (0,01) mmol/d bzw. 0,04 (0,02) mmol/d, für die von Kalium 0,05 (0,01) mmol/d bzw. 0,05 (0,01) mmol/d und für die Gesamtexkretion von Osmolyten 1,65 (0,74) mmol/d

bzw. 2,01 (1,19) mmol/d. Die durchschnittliche Wasserausscheidung betrug 1064 (435) µl/d bzw. 1336 (682) µl/d.

2.2. ALBUMINAUSSCHEIDUNG

Bei Versuchsbeginn betrug die Albumin-/Kreatinin-Ratio im Spontanurin (vgl. Abbildung 22) 79,3 (68,3) mg/g bei allen Tieren. Nach Anlage der Nierenarterienstenose stieg die ACR der Knockouts nahezu kontinuierlich an. Bei den operierten Knockouts betrug die mediane ACR postoperativ 132,1 (277,0) mg/g und war damit signifikant (p = 0,0159) höher als bei den geclippten Wildtypen mit 72,3 (57,7) mg/g. Diese blieben insgesamt, abgesehen von einzelnen Tieren mit Anstiegen, auf dem prä-operativen Niveau. Beim Vergleich der postoperativen Werte kommt dieser Unterschied vor allem im zeitlichen Verlauf deutlich zur Darstellung. Die übrigen Gruppen zeigten keine Änderungstendenzen.

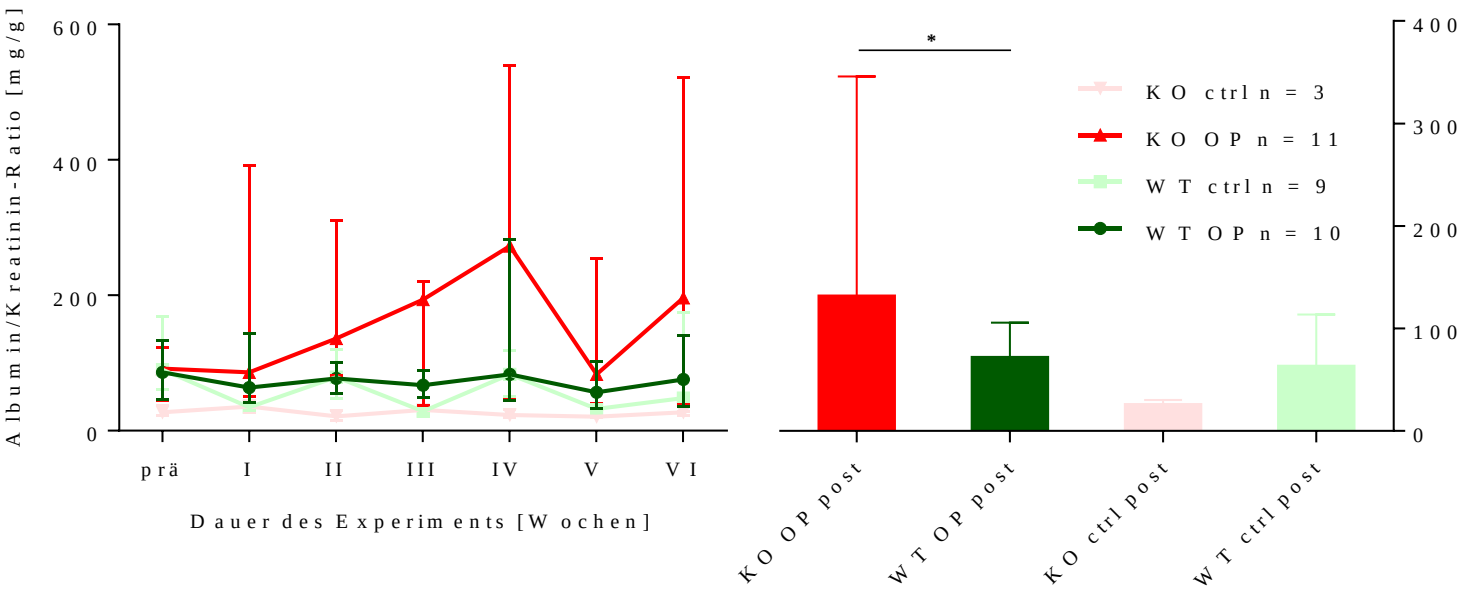

Abbildung 22: Albuminurie

Zur Bestimmung der Eiweißausscheidung wurde postoperativ möglichst täglich Spontanurin gesammelt, wobei jeweils eine Woche pro Tier gepoolt wurde. Der Albumin- und Kreatiningehalt im Spontanurin wurden gemessen und ins Verhältnis gesetzt. Auf der linken Seite ist der zeitliche Verlauf der Albumin-Kreatinin-Ratio mit dem wöchentlichen Median der vier Gruppen abgebildet, rechts der Median aller sechs postoperativen Wochen zusammen. Die Albuminurie der operierten Knockouts war signifikant höher als die der operierten Wildtypen.

3. UNTERSUCHUNG DER ENTNOMMENEN ORGANE

3.1. MAKROSKOPISCHER ASPEKT UND GEWICHT

Die entnommenen Gehirne, Lebern, Herzen, Milzen und Nebennieren zeigten keine makroskopisch sichtbaren Veränderungen wie farbliche Veränderungen, strukturelle Inhomogenität oder Größenunterschiede. Allerdings wiesen drei der geclippten Nieren (zwei Wildtypen, ein Knockout) großflächige Aufhellungen und Mazerationen im Sinne nekrotischer Veränderungen auf. Generell erschienen die stenosierten Nieren deutlich kleiner als die nativen Nieren bzw. die Kontrollnieren. Beim Wiegen bestätigte sich dieser Eindruck: die operierten Nieren waren mit 77 (27) mg leichter als die auf der kontralateralen Seite mit 109 (7) mg.

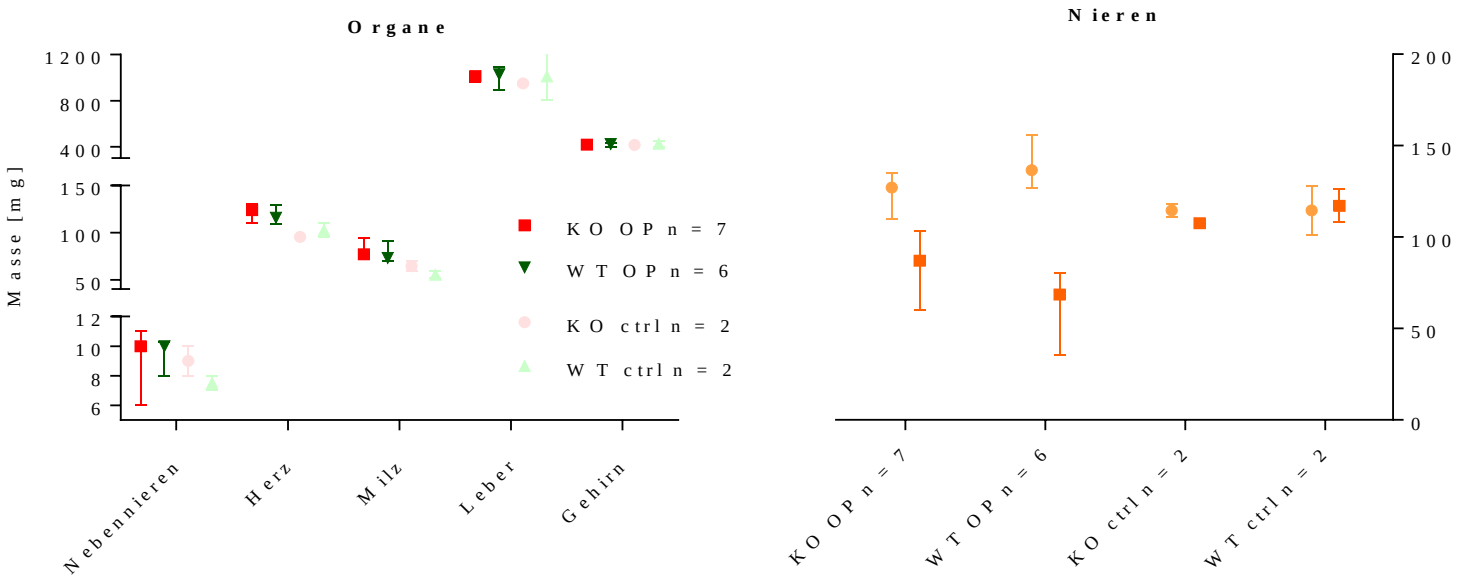

Abbildung 23: Organgewicht

Links abgebildet ist das Gewicht der entnommenen Organe. Aufgrund der großen Unterschiede z.B. zwischen Nebennieren und Leber ist die Skalierung zur besseren Übersicht geteilt. Die rechte Graphik stellt, gegliedert in die verschiedenen Subgruppen, das Gewicht der jeweils rechten/nativen Nieren (in Gelb) und linken/operierten Nieren (in Orange) gegenüber.

Keinen signifikanten Unterschied gab es bezüglich des Genotyps, die geclippten Nieren der Knockouts brachten 87 (30) mg auf die Waage, die der Wildtypen 69 (34) mg. Dasselbe galt für die nativen Nieren mit 127 (19) mg bzw. 137 (17) mg. Beim Gewicht der weiteren Organe traten keine Auffälligkeiten zu Tage, auch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen

operierten Knockouts bzw. Wildtypen. Im Einzelnen ergaben sich für diese zwei Gruppen folgende Werte: beide Nebennieren zusammen 10 (4) mg bzw. 10 (2) mg, Herz 124 (17) mg bzw. 116 (16) mg, Milz 77 (12) mg bzw. 73 (16) mg, Leber 1014 (58) mg bzw. 1029 (144) mg sowie Gehirn 418 (15) mg bzw. 423 (25) mg, vgl. auch Abbildung 23.

3.2. RNA-EXPRESSIONSRATEN

Die Expressionsraten mehrerer, an bestimmten Vorgängen wie Sklerosierungsprozessen oder renaler Filtrationsleistung beteiligter Gene wurde über real-time RT-PCR quantifiziert, um einen differenzierteren Einblick in die molekularen Auswirkungen des Knockouts und der Operation zu erhalten. Die gemessene Menge an mRNA wurde jeweils auf das *housekeeping gene* Aktin normiert. Hierbei wurden zunächst die für die ANP/BNP-Signaltransduktion verantwortliche Guanylatcyclase A, die ja nur im Podocyten, nicht aber im verbliebenen Nierengewebe ausgeschaltet worden war, und der Clearence-Rezeptor NPR-C betrachtet. Deren auf Aktin normierte Expressionsraten sind in Abbildung 24 zu sehen.

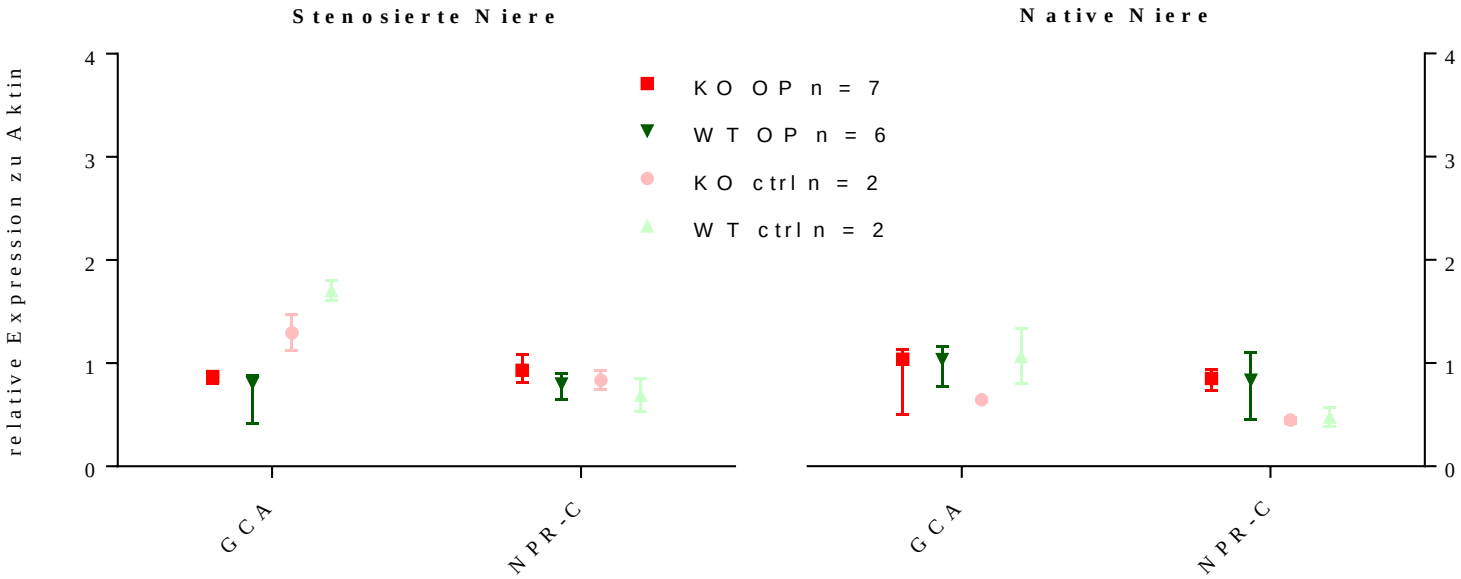

Abbildung 24: Expressionsmuster der NP-Rezeptoren

Dargestellt ist die auf Aktin normierte Expression ANP/BNP-Rezeptoren GCA und NPR-C. Die linke Graphik zeigt die linke (stenosierte) Niere, die rechte Graphik die rechte (native) Niere. Die einzelnen Spalten sind nach dem unterschiedlichen Genotyp (KO/WT) und nach Kontrolle bzw. durchgeführter Operation unterteilt. Es ist jeweils der Median und mit dem zugehörigen Interquartilsabstand abgebildet.

Bei diesen beiden Rezeptoren zeigte sich kein klarer Hinweis auf einen Einfluss der Stenose-Operation, auch der Genotyp machte keinen Unterschied. Die stenosierten (linken) Nieren der operierten Tiere wiesen für die GCA bei den Knockout-Mäusen Werte von 0,87 (0,06) und bei den Wildtypen von 0,81 (0,35) auf, beim NPR-C war die Expression mit 0,93 (0,20) bzw. 0,80 (0,08) ebenfalls auf einem vergleichbaren Level. Auch in den nativen (rechten) Nieren ergab sich kein Unterschied zwischen den Genotypen: Die GCA zeigte die gleiche Expressionsrate von 1,04 (0,49) bzw. 1,04 (0,29) für KO und WT, der NPR-C wies mit 0,85 (0,15) bzw. 0,84 (0,56) ebenso beinah identische Werte auf.

Podocin und Nephrin, die einen wichtigen Bestandteil des glomerulären Filters darstellen, wurden mit der Überlegung untersucht, dass sich die Expression im Sinne eines Reparaturprozesses steigern könnte. Wie in Abbildung 25 zu sehen, ist bei keinem der beiden Strukturproteine ein grundlegender Effekt durch die NAS erkennbar.

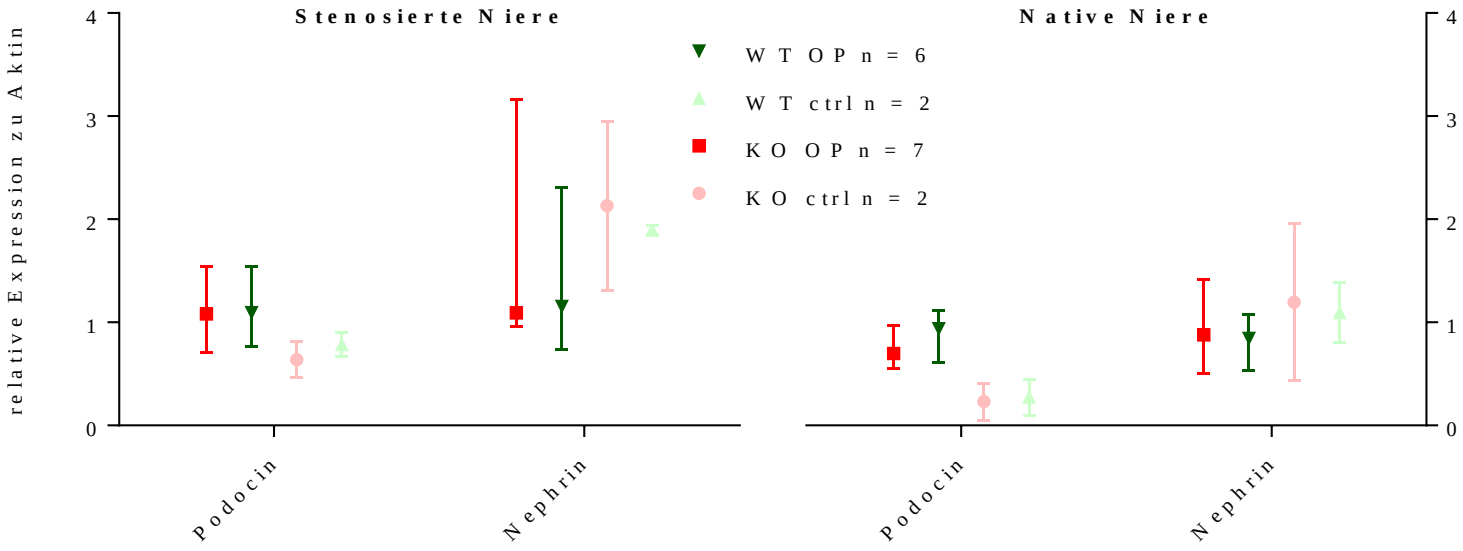

Abbildung 25: Strukturproteine des Schlitzdiaphragmas

Auf Aktin normierte Expression von zwei Hauptbestandteilen des Schlitzdiaphragmas, Podocin und Nephrin. Die linke Graphik zeigt die linke (stenosierte) Niere, die rechte Graphik die rechte (native) Niere. Die einzelnen Spalten sind nach dem unterschiedlichen Genotyp (KO/WT) und nach Kontrolle bzw. durchgeführter Operation unterteilt. Es ist jeweils der Median und mit dem zugehörigen Interquartilsabstand abgebildet.

Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ergaben sich zwischen den operierten Knockouts und Wildtypen, die linken (stenosierten) Nieren hatten Podocin-Expressionsraten von 1,08 (0,45) bzw. 1,09 (0,41) und Nephrin-Expressionsraten von 1,09 (1,21) bzw. 1,15 (1,00). Ebenso in den rechten (nativen) Nieren: Dort ergaben sich für Podocin Werte von 0,70 (0,23) bei den Knockouts und 0,94 (0,27) bei den Wildtypen; für Nephrin analog 0,88 (0,53) bzw. 0,85 (0,36). Zu erwähnen sind noch vier Ausreißer unter den operierten Tieren (zwei Knockouts, zwei Wildtypen), die eine deutliche Überexpression von Podocin und Nephrin in der stenosierten Niere zeigten.

Schließlich wurden die Transkriptionsraten von Collagen I, Fibronektin, α-SMA und TGF-β betrachtet, d.h. von Genen, die bei Inflammation und Fibrosierung üblicherweise hochreguliert werden (Liu, 2011). Vergleicht man die operierten und nicht-operierten Tiere, so lässt sich ein gewisser Einfluss der NAS konstatieren. Wie aus Abbildung 26 ersichtlich, ist bei den operierten Tieren tendenziell die Expression von Collagen I und Fibronektin, etwas geringer ausgeprägt auch von TGF-β und α-SMA gesteigert. Diese Steigerung in der Expressionsrate von Fibrosemarkern fand sowohl in den geclippten als auch den nativen Nieren der operierten Mäuse statt. Der Genotyp hatte hierbei offenbar keinen Einfluss, für operierte Knockouts und Wildtypen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede; die auf Aktin bezogene Expression betrug in der stenosierten Niere für Collagen I 1,24 (1,02) bzw. 1,70 (1,90), für Fibronektin 1,09 (0,75) bzw. 1,38 (0,59), für α-SMA 0,98 (0,11) bzw. 1,02 (0,31) und für TGF-β 1,67 (0,58) bzw. 1,64 (0,36). In der nativen Niere fanden sich für Collagen I 0,92 (0,42) bzw. 0,81 (0,67), für Fibronektin 0,84 (0,33) bzw. 0,88 (0,88), für α-SMA 0,91 (0,32) bzw. 0,89 (0,17) und für TGF-β 1,03 (0,25) bzw. 0,76 (0,57).

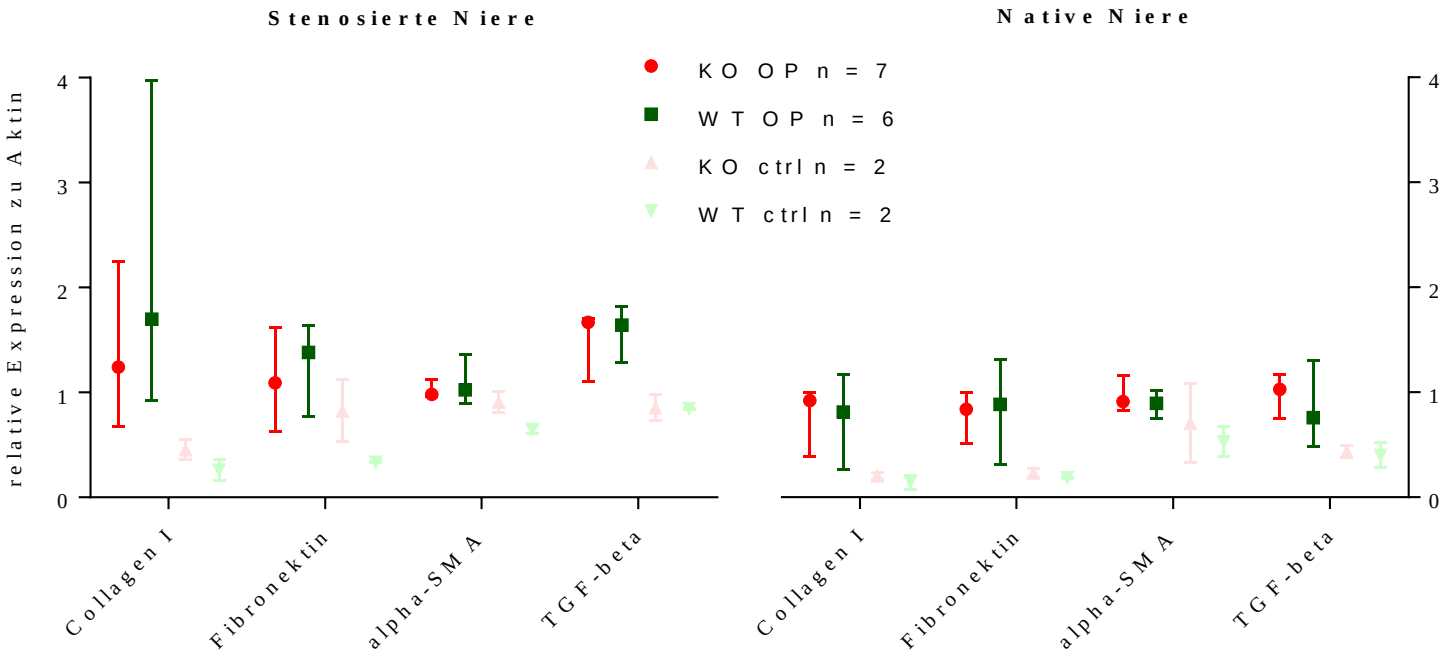

Abbildung 26: Renale Expression der Fibrosemarker

Dargestellt ist die auf Aktin normierte Expression von Collagen I, Fibronektin, α-SMA und TGF-β. Die linke Graphik zeigt die linke (stenosierte) Niere, die rechte Graphik die rechte (native) Niere. Die einzelnen Spalten sind nach dem unterschiedlichen Genotyp (KO/WT) und nach Kontrolle bzw. durchgeführter Operation unterteilt. Es ist jeweils der Median und mit dem zugehörigen Interquartilsabstand abgebildet. Das Wertepaar der geclippten Mäuse in dunkelrot (KO) bzw. dunkelgrün (WT) zeigt für beide Genotypen sowohl in der stenosierten als auch in der nativen Niere für alle Fibrosemarker eine tendenziell gesteigerte Expression.

V. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob die natriuretischen Peptide ANP und BNP im Rahmen einer Angiotensin-II-vermittelten Hypertonie eine direkte nephroprotektive Wirkung am Podocyten entfalten. Im Speziellen sollte untersucht werden, welche Eigenschaften der natriuretischen Peptide auf systemischen Wirkungen beruhen und welche auf podocytäre Effekte zurückzuführen sind. Neben der Nephroprotektion wurden auch Effekte auf das kardiovaskuläre System sowie den Elektrolyt- und Wasserhaushalt betrachtet. Dazu wurde in den Podocyten der Versuchstiere mittels lox/Cre-System ein Knockout des gemeinsamen ANP- und BNP-Rezeptors, der Guanylatcyclase A, erzeugt. Dadurch wurde ausschließlich in diesem Zelltyp die Wirkung natriuretischer Peptide blockiert, während bei dieser Methode insbesondere die glatte Gefäßmuskulatur, die Nierentubuli und das Endothel unbeeinflusst blieben.

KARDIOVASKULÄRES SYSTEM

Durch Stenosierung einer Nierenarterie (Goldblatt, et al., 1934) wurde über eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems ein arterieller Hypertonus erzeugt. Wie am beträchtlichen Anstieg des systolischen Druckes der operierten Tiere deutlich wird (siehe Abbildung 16), war diese Maßnahme erfolgreich. Des Weiteren erhöhte sich, allerdings mit erheblichen interindividuellen Schwankungen, bei mehreren Mäusen die Konzentration von Renin im Plasma; auch die Renin-Expression in den stenosierten Nieren stieg im Vergleich zur kontralateralen Seite an (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). Das unterschiedliche Ausmaß des Operationserfolgs ist mutmaßlich auf die Verwendung von Klammern mit einem einheitlichen Durchmesser zurückzuführen, die je nach ursprünglicher Größe der geclippten Arterie das Lumen somit prozentual stärker oder schwächer verengen. Hinzu kommt die individuell unterschiedliche Gewebsreaktion um das Fremdmaterial herum. Die Herzfrequenz (siehe Abbildung 16) blieb bei den Kontrolltieren über die Dauer des Versuchs mehr oder weniger unverändert. Bei den geclippten Mäusen fiel die Frequenz ab der vierten Woche nach der OP um etwa 20-30 Schläge pro Minute ab, vereinbar mit einer Gegenregulation zum Anstieg des Blutdrucks. Insgesamt ist somit festzuhalten, dass durch die operative Nierenarterienstenose wie geplant eine arterielle Hypertonie induziert werden konnte. Während ein Fehlen der Guanylat-Cyclase A im gesamten Organismus eine so erzeugte

Hypertension deutlich verstärkt (Demerath, et al., 2014), zeigten sich bei dem hier verwendeten Podocyten-spezifischen Knockout der GCA keine signifikanten Unterschiede. Der Blutdruck stieg bei den Wildtypen und den Knockouts sowohl in vergleichbarem Ausmaß als auch ähnlicher Geschwindigkeit an. Die Herzfrequenz der Wildtypen war zwar postoperativ signifikant höher, was eine durch den Knockout beeinflusste, veränderte Reaktion auf die Stenose darstellen könnte. Allerdings spricht vor allem der parallele Kurvenverlauf dagegen, dass es sich hierbei um eine andersartige Reaktion handelt. Hinzu kommt, dass die Frequenz bereits präoperativ unterschiedlich gewesen war, was jedoch in unabhängig von dieser Arbeit durchgeführten Experimenten in der gleichen Arbeitsgruppe (Staffel, et al., 2017) nicht reproduziert werden konnte. Daraus lässt sich am ehesten der Schluss ziehen, dass die erhöhte Herzfrequenz der Wildtypen durch die zufällige Auswahl der Tiere zustande gekommen ist. Die RAAS-Antwort der operierten Knockouts und Wildtypen war, wie auch der Blutdruck, nicht signifikant unterschiedlich. In beiden Gruppen waren das Plasmarenin und die renale Renin-Expression gegenüber den Kontrollen, mitunter extrem, erhöht.

Das kardiovaskuläre Reaktionsmuster auf die Nierenarterienstenose ist also bei den Knockouts und den Wildtypen gleichermaßen durch Steigerung des systolischen Blutdrucks bei verzögertem Absinken der Herzfrequenz und eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems vor allem über eine vermehrte Renin-Expression der operierten Niere gekennzeichnet. Dass diese Reaktion für beide Genotypen gleichermaßen auftritt, spricht deutlich gegen einen Einfluss der podocytären Guanylatcyclase A auf die Kreislaufregulation. Wahrscheinlicher sind die Wirkungen natriuretischer Peptide auf das kardiovaskuläre System durch die glattmuskuläre, die tubuläre und die endotheliale GCA bedingt, wofür bereits Hinweise aus anderen Studien vorliegen (Harris, et al., 1987; Holtwick, et al., 2002; Sabrane, et al., 2005; Demerath, et al., 2014).

SALZ- UND WASSERHAUSHALT

Neben Auswirkungen auf das zirkulatorische System wurde auch der Elektrolyt- und Volumenhaushalt näher betrachtet. Die NAS zeigte hierbei entgegen der Erwartung nur sehr diskrete Folgen. Im Einzelnen konnten weder eine Zunahme des Körpergewichts noch ein Absinken des Hämatokrit (siehe Abbildung 19) als mögliche Hinweise auf größere Einlagerungen von Wasser beobachtet werden. Auch die glomeruläre Filtrationsrate blieb

durch die Operation unbeeinflusst (siehe Abbildung 20). Die GFR war bei allen Tieren (inklusive Kontrollen) in der zweiten Messung niedriger, was am ehesten auf einen systematischen Fehler bei der Bestimmung zurückzuführen ist, welche in der zweiten Versuchsrunde prä- und postoperativ von zwei unterschiedlichen Personen vorgenommen wurde. Die von der Operation unbeeinflusste GFR lässt sich auf zwei Arten erklären. Die eine Möglichkeit wäre, dass der renale Perfusionsdruck der geclippten Nieren nicht unter den Autoregulationsbereich abgefallen ist und somit die Filtration auf gleichem Niveau aufrechterhalten werden konnte. Alternativ könnte die gesunde Niere den verminderten renalen Blutfluss auf der kontralateralen, geclippten Seite vollständig kompensiert und so einen Abfall der glomerulären Filtrationsleistung verhindert haben. Letztere Möglichkeit scheint angesichts der bei der Nekropsie festgestellten Vergrößerung der nativen Nieren im Vergleich zur Gegenseite (siehe Abbildung 23) jedoch die plausiblere Lösung zu sein.

Bei den Untersuchungen des Sammelurins fanden sich keine Hinweise auf eine veränderte Elektrolytausscheidung (siehe Abbildung 21) nach der Operation. Insbesondere konnte keine verstärkte Natriumretention bzw. Kaliumsekretion beobachtet werden, wie typischerweise bei erhöhten Mineralcorticoidspiegeln durch ein aktiviertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System zu erwarten. Einem solchen Effekt konnten die Tiere offenkundig erfolgreich entgegenwirken. Eine tendenzielle Steigerung der Urinausscheidung der operierten Tiere beider Genotypen lässt sich durch eine Druckdiurese erklären. Die scheinbar extreme Polyurie zweier Tiere im Stoffwechselkäfig war während des übrigen Experimentes nicht nachvollziehbar. Sie lässt sich am ehesten mit Undichtigkeiten der Trinkflaschen erklären. Die übrigen Parameter blieben dadurch jedoch unbeeinflusst, da aus der jeweiligen Konzentration und dem gemessenen Volumen die absolute Menge an Elektrolyten berechnet und verglichen wurde.

Zusammengefasst fanden sich hinsichtlich des Genotyps keinerlei Unterschiede in Bezug auf den Elektrolyt- und Volumenhaushalt. Postoperativ zeigten weder die Knockouts noch die Wildtypen eine Veränderung, die mit den durchgeführten Methoden erfasst worden wäre. Die Sekretion bzw. Resorption von Elektrolyten blieb in beiden Gruppen ebenso unbeeinflusst wie die Menge an retiniertem Wasser und die glomeruläre Filtrationsrate. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass auch bei der Regulation des Elektrolyt- und Volumenhaushaltes kein nennenswerter Effekt über die podocytäre Guanylatcyclase A vermittelt wird. Anders als beim kardiovaskulären System ist in diesem Fall jedoch nicht davon auszugehen, dass hierbei die glatte Gefäßmuskulatur und das Endothel die Hauptrolle spielen. Vielmehr gibt es

Hinweise, dass die bekannte Exkretionssteigerung von Natrium und Wasser durch natriuretische Peptide wohl eher auf lokale Wirkungen im proximalen Tubulus und im Sammelrohr zurückzuführen ist (Harris, et al., 1987; Rocha, et al., 1990). Auch die von ihnen verursachte Zunahme der glomerulären Filtrationsrate scheint zwar nicht podocytär, aber dennoch lokal über die ANP-Wirkung an der glatten Muskulatur des Vas afferens vermittelt zu werden (Cogan, 1986).

NEPHROPROTEKTION

Der zentrale Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung des Ausmaßes an renaler Schädigung und beginnender Sklerosierungsprozesse bei den operierten Tieren, aus denen sich mögliche nephroprotektive Effekte der podocytären GCA ableiten könnten. Bereits die makroskopische Betrachtung der Nieren lieferte Hinweise auf durch die Stenose verursachte Schäden. Nicht nur waren die geclippten Nieren kleiner als ihre kontralateralen Pendants, auch wiesen drei von ihnen (zwei Wildtypen, ein Knockout) flächige Aufhellungen und Mazerationen auf, die mit ischämisch bedingten nekrotischen Veränderungen vereinbar sind. Das verminderte Gewicht der stenosierten Organe bestärkte diesen Eindruck einer offenbar auf Minderperfusion beruhenden Nierenschädigung. Der Genotyp hatte keinen Einfluss auf das Ausmaß dieser Unterschiede.

Nicht nur die stenosierten, sondern auch die nativen Nieren waren offenbar vermehrtem Stress ausgesetzt. Wie aus Abbildung 26 hervorgeht, war durch die Operation die Expression der Fibrosemarker Collagen I, Fibronektin, α-SMA und TGF-β in den stenosierten und nativen Nieren tendenziell gesteigert. Während die eine Niere auf den verminderten Blutfluss und die schlechtere Versorgung reagieren musste, setzte sich die andere offenbar mit dem erhöhten Blutdruck und veränderter mechanischer Belastung auseinander. Diese vermehrte Sklerosierungstendenz war jedoch unabhängig vom Genotyp, sodass der in früheren Experimenten beschriebene positive Einfluss erhöhter cGMP-Werte (Fang, et al., 2013) scheinbar nicht ausschließlich auf die podocytäre GCA zurückzuführen ist. Es sei aber darauf hingewiesen, dass sich bei analogen Experimenten mit Podocyten-spezifischem Knockout der Guanylatcyclase A, Uninephrektomie und mehrwöchiger Gabe des Aldosteron-Agonisten DOCA (Deoxycorticosteronacetat) fluoreszenzmikroskopisch eine Zunahme von α-SMA nachweisen ließ. Auch ist in der erwähnten Arbeit elektronenmikroskopisch sichtbares „foot process effacement“ mit deutlich erweiterten Fußfortsätzen beschrieben, wobei diese Effekte

für die Knockouts nochmal signifikant ausgeprägter waren (Staffel, et al., 2017). Daher ist es durchaus möglich, dass die kurze Dauer des Experiments und das vergleichsweise „sanfte“ Goldblatt-Modell mit lediglich moderater Albuminurie der Grund dafür ist, dass in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede festzustellen waren.

Die glomeruläre Filtrationsrate insgesamt blieb, wie oben beschrieben, durch die Operation unverändert. Durch die verwendete Methode konnten nicht beide Nieren separat untersucht werden, sodass ein Absinken der GFR auf der einen Seite mit kontralateraler Kompensation in diesem Experiment zwar nicht nachgewiesen, aber aufgrund der Pathophysiologie sehr plausibel angenommen werden kann. Von dieser Annahme ausgehend wurden die relativen Expressionsraten der NP-Rezeptoren A und C (GCA und NPR-C, siehe Abbildung 24) sowie der Strukturproteine Nephrin und Podocin (siehe Abbildung 25) bestimmt. Die bekannte Funktion der natriuretischen Peptide beim Mechanismus der kompensatorischen Hypertrophie (Schreiber, 2012) sollte dadurch in Bezug auf die podocytäre Guanylatcyclase A näher charakterisiert werden. Die erhobenen Parameter zeigten sich jedoch sowohl von der Nierenarterienstenose als auch dem Genotyp unbeeinflusst, was einen Einfluss natriuretischer Peptide direkt über das glomeruläre Epithel unwahrscheinlich macht.

Als weiterer Marker für renale Schädigung wurde die Albumin-/Kreatinin-Ratio im Spontanurin gemessen, die einen brauchbaren Indikator für Eiweißverlust über die Niere darstellt (KDIGO-CKD-1, 2013). Die ACR der operierten Knockouts stieg in den Wochen nach der Stenose nahezu kontinuierlich an, wohingegen die der operierten Wildtypen auf dem Ausgangsniveau von etwa 80mg/g blieb (siehe Abbildung 22). Insgesamt war deren postoperative Albuminausscheidung signifikant geringer als die der genetisch veränderten Tiere, die mediane Verluste von über 130mg/g aufwiesen.

Das Ausmaß der renalen Schädigung durch die NAS ist somit insgesamt eher gering einzuschätzen, entsprechend ist auch in großen Teilen kein Einfluss von NPs auf den Podocyten erkennbar. Eine klare Ausnahme davon stellt die eben beschriebene Albuminurie dar. Die podocytäre Guanylatcyclase A scheint eine grundlegende Rolle bei der Retention von Proteinen zu spielen. Über natriuretische Peptide werden offenbar lokal an der glomerulären Filtrationsbarriere Prozesse gesteuert, die einem Verlust von Eiweiß entgegenwirken und die unabhängig von systemischen Wirkungen über die glatte Gefäßmuskulatur und das Endothel sind. Diese Eigenschaft kommt jedoch erst bei renaler Belastung (wie bei der hier verwendeten Nierenarterienstenose) zum Tragen, denn präoperativ befand sich die ACR aller

untersuchten Gruppen auf einem vergleichbaren Niveau. Der Verlust der podocytären GCA ist unter physiologischen Bedingungen offensichtlich kompensierbar.

Zunächst stellt sich hinsichtlich der in diesem Experiment erzeugten NAS natürlich die Frage, auf welchem Weg diese großen Mengen an Albumin in den Urin gelangen. Erhöht sich die Permeabilität in den Glomerula der stenosierten Niere oder wird durch den erhöhten Blutdruck in der nativen Niere erst der nötige Stress geschaffen, damit sich das Fehlen der GCA auswirkt? Trifft vielleicht beides zu? Zwar lassen sich diese Fragen mit den durchgeführten Versuchen nicht direkt beantworten, ähnliche Experimente mit den gleichen lox/Cre-Mäusen lassen aber mögliche Erklärungen zu. Beim bereits oben erwähnten Uninephrektomie/DOCA-Modell wird ebenfalls ein Hypertonus erzeugt und es kommt bei den Wildtypen zu einer moderaten, bei den Knockouts hingegen zu einer extremen Steigerung der Albuminausscheidung (Staffel, et al., 2017). Dies stützt zunächst einmal die Hypothese dieser Arbeit, dass die podocytäre GCA maßgeblich an der Funktion des glomerulären Filtrationsapparates bei renaler Belastung beteiligt ist. Da dort die verbliebene Niere einem erhöhten Blutdruck ausgesetzt ist, spricht dies ebenfalls dafür, dass auch im hier verwendeten Goldblatt-Modell eher die druckbelastete native Niere für den Eiweißverlust verantwortlich gemacht werden kann.

In der Folge sind weitere Untersuchungen notwendig, um die podocytär vermittelte nephroprotektive Wirkung natriuretischer Peptide noch genauer zu charakterisieren und besser zu validieren. Zum einen ließe sich natürlich über eine Replikation des in dieser Arbeit durchgeführten Versuchs mit einer größere Stichprobe die Verlässlichkeit des Ergebnisses erhöhen. Zum anderen könnte auch über eine längere Beobachtungsdauer nach Nierenarterienstenose ein größerer Schaden gesetzt werden, damit sich schützende Effekte deutlicher demarkieren. Als weitere Möglichkeit kommt der Einsatz komplementärer Methoden in Frage, vor allem hinsichtlich der Wirkung natriuretischer Peptide auf Sklerosierungsprozesse. Geeignet wäre zum einen die Bestimmung der tatsächlich translatierten Menge der an der Fibrose beteiligten Proteine im Western Blot als Ergänzung zur Quantifizierung der mRNA. Eine zusätzliche Darstellung mittels Immunfluoreszenzmikroskopie würde nicht nur eine Kontrolle der Quantifizierung ermöglichen, sondern überdies auch die räumliche Verteilung der induzierten Schäden abbilden. Elektronenmikroskopisch schließlich ließen sich auch minimale strukturelle Veränderungen am Podocyten, vor allem ein „foot process effacement“, nachweisen. Um die Nierenfunktion seitengetrennt zu betrachten, käme die Verwendung einer dynamischen

Szintigraphie mit radioaktiv markiertem Albumin in Frage. So könnte näher eingegrenzt werden, in welchem Ausmaß die Minderperfusion der stenosierten Niere oder der erhöhte glomeruläre Druck in der nativen Niere ausschlaggebend für die Albuminurie und Degeneration sind.

Wie bereits oben erwähnt, konnten Staffel et al. in ihrem primär auf erhöhtem Aldosteron basierenden Schädigungsmodell ebenfalls eine über den Podocyten vermittelte nephroprotektive Wirkung natriuretischer Peptide zeigen (Staffel, et al., 2017). Studien, die auf anderen pathophysiologischen Abläufen beruhen, liegen jedoch bisher noch nicht vor. Eines dieser alternativen Modelle wäre beispielsweise die diabetische Nephropathie, die sich initial auch über eine Albuminurie manifestiert. Eine weitere Möglichkeit zur genaueren Charakterisierung wäre über die Perfusion einer isolierten Niere möglich. Hier ließe sich einerseits eine Abhängigkeit von Perfusionsdruck und Schädigung nachstellen, andererseits kann auch über die Applikation interferierender Substanzen die Beteiligung unterschiedlicher Signalwege genauer herausgearbeitet werden.

MOLEKULARE MECHANISMEN

Welche Signalwege natriuretische Peptide nutzen, um ihre Wirkung am glomerulären Epithel zu entfalten, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt. Der *second messenger* cGMP ist bislang als das zentrale Molekül in der von natriuretischen Peptiden ausgelösten Signalkaskade bekannt. Die Regulation des Spiegels von cGMP ist im Podocyten von mehreren Faktoren abhängig. Podocyten verfügen mit den membranständigen Guanylatcyclasen (pGC) zum einen über Rezeptoren für natriuretische Peptide (Chansel, et al., 1990), die einen deutlichen Anstieg von cGMP bewirken (Chevalier, et al., 1992). Wie auch in glatter Gefäßmuskulatur wird die Regulation von cGMP im Podocyten durch die lösliche Guanylatcyclase (sGC) ergänzt, die von Stickstoffmonoxid aktiviert wird und ebenfalls den cGMP-Spiegel steigert (Lewko, et al., 2002). Die beiden Signalwege scheinen sich gegenseitig zu regulieren (Stepinski, et al., 2000; Lewko, et al., 2006). In welchem Ausmaß die sGC bzw. die pGC Einfluss auf den Erhalt der Integrität des Podocyten haben und inwieweit sie einen Wegfall der anderen kompensieren können, ist nicht abschließend untersucht. Bekannt ist jedoch ein unterschiedliches Verhalten bei Stimulation durch Angiotensin II: über AT_1-Rezeptoren und die Proteinkinase C senkt ANG II die ANP-

abhängige cGMP-Antwort im Podocyten, der NO-Signalweg hingegen scheint von AT_2-Rezeptoren abhängig zu sein (Golos, et al., 2002; Lewko, et al., 2006).

Schon länger ist bekannt, dass sich Podocyten und glatte Muskelzellen gewisse Merkmale teilen, insbesondere die Expression kontraktiler Moleküle (Trenchev, et al., 1976; Drenckhahn, et al., 1988; Saleem, et al., 2008). Daher liegt der Schluss nahe, dass sich möglicherweise auch die genutzten Signalwege ähneln. In der Tat ist nicht nur die Kontraktion glatter Muskelzellen durch Calcium vermittelt, auch die Motilität von Podocyten ist Calcium-abhängig. Eine große Rolle spielen dabei die beiden Ionen-Kanäle TRPC5 und TRPC6, die sich AT_1-Rezeptor-vermittelt öffnen und zu einem lokalen Einstrom von Calcium führen. Dadurch kommt es, je nach Kanal, zu einer Aktivierung von verschiedenen Rho-GTPasen. TRPC5 steigert über Rac1 die Motilität des Podocyten, TRPC6 hingegen erhöht über RhoA die Anzahl an Stressfasern, was einem kontraktilerem Phänotypen entspricht (Tian, et al., 2010). Bei längerer Exposition mit Angiotensin II dominiert Rac1, es bildet sich also der beweglichere Phänotyp des Podocyten aus. Darüber hinaus werden Ezrin, Radixin und Moesin vermehrt phosphoryliert. Dies steigert den Umbau des F-Aktin-Skeletts und führt zu vermehrter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Hsu, et al., 2008). Eine direkte Wirkung natriuretischer Peptide auf TRPC5 und TRPC6 ist bislang nicht nachgewiesen, jedoch scheint ein funktioneller Antagonismus zu bestehen. Im Uninephrektomie/DOCA-Modell von Staffel et al. wird in den GCA-KOs nach der DOCA-Behandlung über eine vermehrte Expression von TRPC6 (nicht aber TRPC5) sowie einen über diese Kanäle vermittelten, erhöhten ATP-abhängigen Calcium-Einstrom berichtet. Dies wird als Hinweis für eine von natriuretischen Peptide ausgelöste Suppression des intrazellulären Calcium-Anstieges gedeutet (Staffel, et al., 2017). Vermittelt wird diese Suppression wahrscheinlich durch erhöhtes cGMP. Durch diesen *second messenger* wird der Ionenkanal TRPC6 blockiert (Takahashi, et al., 2008). Dafür spricht auch, dass die Angiotensin II-vermittelte De-Phosphorylierung (und damit Aktivierung) des Kanals durch PDE-5-Inhibitoren antagonisierbar ist, was *in vitro* verhindert, dass der Podocyt an Motilität zunimmt (Hall, et al., 2014).

Durch Steigerung der cGMP-Spiegel mit PDE-5-Hemmern wird zudem unter anderem die PKG I aktiviert, was *in vitro* die Permeabilität für Albumin steigert (Piwkowska, et al., 2014). Durch Zugabe von H_2O_2 lässt sich, zumindest in Zellkulturen, der gleiche Effekt erzielen (Piwkowska, et al., 2012). Die PKG I ist überdies möglicherweise an der Insulin-vermittelten Glucoseaufnahme in den Podocyten beteiligt (Piwkowska, et al., 2014). Glucose selbst wiederum wirkt permissiv für die Bildung von cGMP im Podocyten (Lewko, et al., 2004). Im

entsprechenden Tiermodell der diabetischen Nephropathie in der Ratte verursachten PDE-5-Hemmer einen deutlichen cGMP-Anstieg im Podocyten. Sie milderten darüber hinaus Fibrosierung und Remodeling des Glomerulum unabhängig vom Blutdruck ab (Fang, et al., 2013).

Erfährt der Podocyt mechanischen Stress, hat dies auch auf molekularer Ebene weitreichenden Einfluss. So werden einerseits die cGMP-Spiegel im Podocyten durch mechanische Belastung gesenkt (Lewko, et al., 2004), die Bildung anderer Botenstoffe wie TGF-β1 und Angiotensin-II hingegen wird lokal erhöht; zudem wird die Expression des AT1-Rezeptors gesteigert (Durvasula, et al., 2004). Bei mechanischer Belastung wird darüber hinaus durch verringerte Nephrin-Expression die Durchlässigkeit des glomerulären Filters gesteigert (Miceli, et al., 2010) und schließlich kommt es in Folge auftretender Scherkräfte zu einer Hypertrophie des Podocyten (Petermann, et al., 2005). Wie genau die erwähnten Signalwege wechselwirken und sich gegenseitig beeinflussen ist nicht abschließend geklärt. Am Anfang der Signalübermittlung durch mechanische Belastung stehen möglicherweise Zelladhäsionsmoleküle wie Integrine, die ebenso an der Kontraktilität von Podocyten beteiligt sind. Diese bewirken über die integrin-linked kinase (ILK) eine Umstrukturierung des Zytoskeletts, was eine Aufrechterhaltung der Filterfunktion unter Belastung ermöglicht. Im Komplex mit PINCH1 und α-Parvin aktiviert die ILK über eine Translokation von β-Catenin in den Nucleus LEF-1 und damit den Wnt-Signalweg (Yang, et al., 2005). Stimuliert man *in vitro* die ILK, so wird die Expression von P-Cadherin und CD2AP gehemmt, es kommt zur Proliferation und zum Ablösen des Podocyten von der Oberfläche (Teixeira, Vicente de Paulo Castro, et al., 2005). Ein Podocyten-spezifischer Knockout der ILK hat in der Maus eine Verdickung der glomerulären Basalmembran und die Entwicklung einer progressiven, fokal-segmentalen Glomerulosklerose mit Albuminurie zur Folge (El-Aouni, et al., 2006). Eine Verbindung von Integrin-abhängigen Signalwegen und natriuretischen Peptiden wurde bisher noch nicht beschrieben. Aufgrund der hochkomplexen Regulation der podocytären Kontraktilität ist jedoch eine Wechselwirkung keinesfalls auszuschließen, was Raum für weitergehende Untersuchungen in diese Richtung bietet.

Einzelne Bestandteile des Mechanismus, wie natriuretische Peptide über den Podocyten eine nephroprotektive Wirkung entfalten könnten, sind in den oben erwähnten Arbeiten zwar beschrieben, genauere Zusammenhänge sind jedoch bisher nur unzureichend geklärt. Es besteht lediglich die grobe Hypothese, dass unter pathologischen Bedingungen mit erhöhtem glomerulärem Druck ein cGMP-abhängiges Re-Arrangement des Zytoskeletts im Podocyten

stattfindet, wodurch die Integrität des Schlitzdiaphragmas länger erhalten bleibt (Sharma, et al., 1992; Lewko, et al., 2002; Pavenstädt, et al., 2003). Überhaupt ist der Pathomechanismus der Podocyten-Schädigung nicht abschließend verstanden. Es ist zwar bekannt, dass Schäden ganz unterschiedlicher Genese am Podocyten zu einem „foot process effacement“ (FPE), also einer Vergröberung der Fußfortsätze führt (Farquhar, et al., 1957). Wie genau jedoch dieser Umbau der podocytären Zellarchitektur zustande kommt und welche Prozesse sich dabei auf molekularer Ebene abspielen ist noch weitgehend unbekannt. Insbesondere die Rolle der damit verbundenen Proteinurie wird kontrovers diskutiert. Grundsätzlich wird angenommen, dass FPE bei lediglich temporärer Schädigung reversibel ist (Greka, et al., 2012; Kriz, et al., 2013). Bei chronischer Niereninsuffizienz gibt es dagegen mehrere konkurrierende Hypothesen: Entweder gilt FPE selbst als Auslöser einer Proteinurie, als pathophysiologischer Schnittpunkt verschiedener Ursachen podocytärer Schäden oder als völlig unabhängig vom Auftreten einer Proteinurie (Shankland, 2006). Möglicherweise stellt FPE auch den Versuch des Podocyten dar, eine sich beginnende Ablösung von der Basalmembran zu verhindern, indem er seine Auflagefläche vergrößert; freiliegende Stellen der GBM, durch die Proteine verloren gehen, würden so zumindest teilweise wieder abgedeckt (Kriz, et al., 2013).

Insgesamt erscheint sowohl ein zu schlaffes als auch ein zu sprödes glomeruläres Epithel als dysfunktional. Entsprechend bedarf der cGMP-Spiegel einer strikten Regulation, um eine adäquate Reaktion auf veränderte glomeruläre Druckverhältnisse zu gewährleisten. Als Gegenpart zum Renin-Angiotensin-Aldosteron-System spielen hierbei natriuretische Peptide über die membranständige Guanylatcyclase auf der einen Seite und über Stickstoffmonoxid und die lösliche Guanylatcyclase auf der anderen die wohl größte Rolle. Diese führen beide zu einem erhöhten cGMP-Spiegel, was weitere Effekte auf TRPC-Kanäle und die PKG I nach sich zieht. Unter physiologischen Bedingungen scheint ein Wegfall der membranständigen GCA von der löslichen kompensiert werden zu können, nicht jedoch unter renaler Belastung wie etwa bei einer einseitigen Nierenarterienstenose.

Unabhängig von direkten Wirkungen auf das glomeruläre Epithel haben natriuretische Peptide möglicherweise auch eine indirekten Effekt durch parakrine Wirkungen von podocytär erzeugtem, aber sezerniertem cGMP: weiter distal im Tubulussystem könnten Ionenkanäle und Rezeptoren beeinflusst werden (Ardaillou, et al., 1993; Hirsch, et al., 1999; McCoy, et al., 1995). Von besonderem Interesse wäre hier die Resorption von Albumin, dem direkte tubulotoxische Eigenschaften nachgesagt werden (Eddy, 2004; Abbate, et al., 2006).

KLINISCHER ASPEKT

Es ist hinlänglich bekannt, dass es durch eine Angiotensin-Blockade mit ACE-Hemmern bzw. AT_1-Antagonisten bei der CKD im Gegensatz zu anderen Blutdrucksenkern wie Betablockern, Diuretika oder Calciumantagonisten zu einem zusätzlichen nephroprotektiven Effekt kommt (KDIGO-CKD-3, 2013). Durch diese Arbeit neu ist hingegen, dass natriuretische Peptide direkt über den Podocyten der nierenschädigenden Wirkung eines aktivierten Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems entgegenwirken. Mit diesem Wissen um die Beteiligung der NPs und seiner Effektor-Moleküle ergibt sich Raum für die Erforschung einer Reihe von Medikamenten, die ihren Angriffspunkt außerhalb des RAAS hätten, ohne Einbußen bei der Effektivität der Behandlung hinnehmen zu müssen. So ergäben sich theoretisch Einsatzmöglichkeiten für (organspezifische) Phosphodiesterase-Hemmer, Modulatoren von TRPC6 oder Neprilysin-Inhibitoren für die Behandlung des chronischen Nierenversagens.

Möglich wäre dies auch als Add-On zu den bereits etablierten Medikamenten, wie es beispielsweise bei dem seit Kurzem für Herzinsuffizienz zugelassenen Kombinationswirkstoff Sacubitril/Valsartan der Fall ist, der in der PARADIGM-HF-Studie (Prospective comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact on Global Mortality and morbidity in Heart Failure) einen Zusatznutzen gegenüber einer Monotherapie mit dem ACE-Hemmer Enalapril zeigte (McMurray, et al., 2014). Eine 2015 veröffentlichte Meta-Analyse bisher durchgeführter Studien mit Neprilysin-Antagonisten von Bodey et al. legt einen solchen Benefit zumindest nahe. Abschließende Aussagen lassen sich allerdings nicht treffen, da einerseits – bei primärem Fokus auf der Herzinsuffizienz – in nur sehr wenigen der untersuchten Studien ausreichend Daten bezüglich chronischen Nierenversagens erhoben worden waren und andererseits keine einheitliche Definition für eine Verschlechterung der Nierenfunktion verwendet worden war (Bodey, et al., 2015). Das Hauptproblem einer uneinheitlichen Definition wird auch in einer Untersuchung von Voors et al. aus dem selben Jahr deutlich: In dieser Analyse der PARAMOUNT-Studie (Prospective comparison of ARNI with ARB on Management Of heart failUre with preserved ejectioN fraction) zeigte sich unter Sacubitril/Valsartan bei Patienten mit Herzinsuffizienz und erhaltener Ejektionsfraktion verglichen mit einer Valsartan-Monotherapie eine bessere errechnete GFR, gleichzeitig aber ein höherer Albumin-/Kreatinin-Quotient im Urin (Voors, et al., 2015). Aus diesen Gründen sind weitere, speziell auf die CKD ausgerichtete Studien wie beispielsweise UK HARP-(UK Heart and Renal Protection)-III (Haynes, laufende Studie, Stand 2016) nötig, um genauere

Rückschlüsse auf eine Anwendbarkeit in diesem Gebiet zulassen. Die Ambivalenz der bisher durchgeführten klinischen Studien zur nephroprotektiven Wirkung natriuretischer Peptide macht es umso wichtiger, die Funktionsweise dieser Moleküle und der von ihnen abhängigen Signalwege genauer zu ergründen, um sich noch zielgerichteter positive Effekte zunutze machen zu können.

ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSS

Abschließend lässt sich sagen, dass die podocytäre Guanylatcyclase A über eine Eindämmung der Albuminurie, wie sie im Rahmen eines aktivierten Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems bei der Nierenarterienstenose auftritt, einen nephroprotektiven Effekt aufweist. Diese Wirkung beruht am ehesten auf einer bisher nicht näher bekannten, über natriuretische Peptide vermittelten Modifikation der glomerulären Filtrationsbarriere. Einflüsse auf das Herz-Kreislauf-System, den Elektrolyt- und Wasserhaushalt sowie Sklerosierungsprozesse ließen sich hingegen nicht nachweisen. Bei diesen Vorgängen spielen vermutlich die glattmuskuläre, die tubuläre und die endotheliale GCA die größere Rolle. Insgesamt liefert die vorliegende Arbeit den angestrebten Beitrag zur weiteren Charakterisierung der über den Podocyten vermittelten, direkt nephroprotektiven Wirkung natriuretischer Peptide bei durch Angiotensin II und arterielle Hypertonie verursachter Nierenschädigung.

VI. KURZFASSUNG/ABSTRACT

Nephroprotektive Effekte der podocytären Guanylat-Cyclase A

Hintergrund: Chronisches Nierenversagen ist regelmäßig mit Albuminurie und Hypertonie vergesellschaftet. Als therapeutischer Standard kommen daher Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System wie ACE-Hemmer zum Einsatz. Eine mögliche Alternative könnten Medikamente sein, welche die Wirkung natriuretischer Peptide beeinflussen. Diese physiologischen Gegenspieler des RAAS senken u.a. den arteriellen Blutdruck, führen zu einer erhöhten Natriumausscheidung und können unter bestimmten Umständen fibrotische Umbauprozesse abmildern. Ungeklärt ist jedoch, ob diese Effekte lediglich durch systemische Wirkungen auf die glatte Gefäßmuskulatur und das Endothel zustande kommen oder ob dabei auch lokale Vorgänge, insbesondere im Podocyten, eine Rolle spielen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern natriuretische Peptide direkt am Glomerulum schützenden Einfluss gegen durch ein aktiviertes RAAS verursachte renale Belastung nehmen können.

Vorgehensweise: Dazu wurde eine Studie an Mäusen durchgeführt, welche einen mittels lox/Cre-System erzeugten Podocyten-spezifischen Knockout der Guanylatcyclase A, dem gemeinsamen ANP- und BNP-Rezeptor, aufwiesen. Um eine renale Belastung zu schaffen, wurde operativ eine Nierenarterie stenosiert. Die Auswirkungen auf das Kreislaufsystem wurden über Blutdruck und Herzfrequenz mittels Tail-Cuff-Methode gemessen sowie die Plasmakonzentration von Renin und dessen renale Expressionsrate stellvertretend für die RAAS-Aktivität. Die Ausscheidung von Natrium und Kalium über die Niere wurde zusammen mit der glomerulären Filtrationsrate, dem Hämatokrit und dem Körpergewicht der Tiere zur Einschätzung des Elektrolyt- und Volumenhaushalts bestimmt. Außerdem wurden das Ausmaß und die Folgen der direkten Nierenschädigung über die Bestimmung der renalen Expressionsrate mehrerer Fibrosemarker (Collagen I, Fibronektin, α-SMA und TGF-β), der NP-Rezeptoren und der Strukturproteine Podocin und Nephrin mittels quantitativer PCR untersucht. Ein weiterer Bestandteil war die Messung des renalen Eiweißverlusts über den Albumin-/Kreatinin-Quotienten über ELISA bzw. einen photometrischen Assay im Spontanurin. Die jeweiligen Werte der operierten Wildtypen wurden mit denen jener Knockouts verglichen, die einer Nierenarterienstenose unterzogen worden waren.

Ergebnisse: Bezüglich des Herz-Kreislauf-Systems zeigten beide untersuchten Gruppen eine vergleichbare Reaktion auf die Operation. Der Blutdruck stieg sowohl bei den Knockouts als auch den Wildtypen postoperativ an, die Herzfrequenz sank nach einigen Wochen in ähnlichem Ausmaß ab. Das RAAS beider Gruppen wurde vergleichbar stark aktiviert. Der Salz- und Wasserhaushalt blieb, wie auch die gesamte GFR, unbeeinflusst. Auch die Expressionsraten der untersuchten Gene zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Hinsichtlich einer Nephroprotektion zeigte der Genotyp einen deutlichen Einfluss, da die Albuminausscheidung bei den Knockouts postoperativ signifikant höher war als bei den Wildtypen.

Schlussfolgerung: Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass unter renaler Belastung durch ein aktiviertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System die podocytäre Guanylatcyclase A an der Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere und Reduktion von Albuminurie beteiligt ist. Von einem Einfluss auf die Regulation des Herz-Kreislauf-Systems sowie den Elektrolyt- und Wasserhaushalt ist hingegen nicht auszugehen. Dieser nephroprotektive Effekt beruht mutmaßlich auf einer lokalen, NP-vermittelten Modifikation des Schlitzdiaphragmas zwischen den Podocyten.

Renoprotective Effects of the Guanylyl Cyclase A in the Podocyte

Background: Chronic renal failure is associated with albuminuria and hypertension and is usually treated with inhibitors of the renin-angiotensin-aldosterone system. Natriuretic peptides as physiological antagonists of the RAAS might represent an alternative target. NPs are known to lower blood pressure, increase renal sodium excretion and ameliorate fibrosis. However, it is unclear if these properties are only due to systemic effects via vascular smooth muscle cells and the endothelium or if local glomerular cells could play a role. This thesis aims at the investigation of possible renoprotective effects of NPs mediated by podocytes under conditions of RAAS activation.

Proceedings: Therefore, lox/Cre-modified mice with podocytes lacking their guanylyl cyclase A, the ANP/BNP receptor, were used. A unilateral renal artery stenosis was surgically induced to provoke renal stress. The impact on the circulatory system was assessed by blood

pressure and heart rate measurement via tail-cuff method along with the quantification of renin in the blood plasma and the renal renin expression representing the activity of the RAAS. The excretion of sodium and potassium and the glomerular filtration rate as well as the haematocrit and the body weight were used to estimate the effects on the water and electrolyte balance. Furthermore, the renal expression of the NP receptors A and C, the structural proteins nephrin and podocin as well as of collagen I, fibronectin, α-SMA and TGF-β as markers for fibrosis was measured. Moreover, the albumin/creatinine ratio in spot urine was determined via ELISA and a photometric assay, respectively. Knockout mice with renal artery stenosis were compared to wildtype mice with renal artery stenosis.

Results: Concerning the circulatory system both groups showed similar reactions upon the renal artery stenosis. The blood pressure of both KOs and WTs increased, whereas the heart rate decreased after several weeks in a comparable range and fashion. The RAAS was activated to an equivalent extent. Seemingly, the salt and water balance as well as the overall glomerular filtration rate remained unaffected. Neither did the expression levels of the examined genes differ. Regarding renal protection, the genotype had marked influence as albuminuria was significantly more severe in KOs compared to WTs.

Conclusion: These findings indicate a major role for the guanylyl cyclase A in the podocyte in maintaining the glomerular filtration barrier and reducing albuminuria under renal stress caused by an activated renin-angiotensin-aldosterone system. In contrast, influence on the circulatory system as well as the salt and water balance seems unlikely. This renoprotective effect of the GCA might be caused by a local, NP-mediated modification of the slit diaphragm between podocytes.

VII. ANHANG

DANKSAGUNG

Danken möchte ich an erster Stelle meiner Frau Barbara für ihren starken Rückhalt und ihr beinahe grenzenloses Verständnis, das sie mir während der Anfertigung dieser Arbeit entgegengebracht hat. Vielen Dank auch an meine Eltern Bärbel und Günter dafür, dass sie mir durch ihre Unterstützung ein sorgenfreies Studium ermöglicht haben und sich, wie auch mein Bruder Florian, Zeit für das Lektorat genommen haben.

Ebenfalls meinen Dank aussprechen möchte ich Katharina Ehm, Anna Federlein, Dr. rer. nat. Janina Staffel, Dr. rer. physiol. Daniela Valletta, Regine Volkmann und Frieda Webinger für ihre Geduld mit mir, ihre Hilfestellung sowie ihre vielen guten Ratschläge, Tipps und Kniffe.

Abschließend gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Frank Schweda für sein stets offenes Ohr, seine gute Betreuung und für die rundum lehrreiche Zeit in seiner Arbeitsgruppe.

LEBENSLAUF

Stefan Ströhl, geboren am 20.12.1989 in Sulzbach-Rosenberg

2009	Abitur am Herzog-Christian-August-Gymnasium Sulzbach-Rosenberg
2009-2010	Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg
2010 - 2016	Wechsel zum Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
2013-2015	Studium der Molekularen Medizin an der Universität Regensburg (Abschluss als B.Sc.), Abschlussarbeit an der University of Cambridge (UK)
2016	Approbation als Arzt
seit 2017	Assistenzarzt am Universitätsklinikum Regensburg (Nephrologie)

PROTOKOLLE UND MATERIALIEN

RNA-Isolierung

Die noch in N_2 gefrorenen Organe wurden zunächst in je 1ml TRIZOL (Invitrogen) gegeben und homogenisiert. TRIZOL enthält chaotrope Salze und Phenol, wodurch Proteine und DNA denaturiert werden und in Lösung gehen. Die entstandene Suspension wurde dazu fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200µl Chloroform zugegeben, vorsichtig geschüttelt und bei 4°C und 12000rpm 20 Minuten lang zentrifugiert. Die Phenolphase und eine Interphase mit hydrophilen Proteinen wurde verworfen, die RNA im wässrigen Überstand wurde abgenommen und mit 500µl 100%igem Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Nach kurzem Schütteln im Vortexmischer und zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 4°C und 12000rpm für zehn Minuten erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 1ml 75%igem Ethanol bei 4°C und 7500rpm fünf Minuten lang gewaschen, um Salzreste zu entfernen. Der Überstand wurde abermals verworfen. Nach zehnminütigem Trocknen bei Raumtemperatur wurde die RNA in 300µl Wasser gelöst, kurz gevortext, für zwei Minuten bei 65°C im Thermomix inkubiert, nochmal durchmischt und schließlich bei -80°C gelagert.

Agarosegelelektrophorese

Die Proben wurden nach Zugabe von Ethidiumbromid in einer Elektrophoresekammer der Firma BioRad auf ein 1%iges Agarosegel (0,6g Agarose in 60ml TBE-Puffer) aufgetragen. Verschieden große RNA-Bestandteile wurden durch Anlegen einer Spannung getrennt. Zur Auswertung wurden die Banden durch UV-Bestrahlung mit dem Multiimager von BioRad sichtbar gemacht und abfotografiert.

RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA wurde mit dem NanoDrop von ThermoScientific gemessen. Hierbei wurden je 1,5µl von auf 1:50 verdünnten Proben eingesetzt und mit DEPC-Wasser geeicht. Aus der Extinktion bei 230nm wurde automatisch durch die Konzentration der enthaltenen RNA berechnet.

Reverse Transkription

Aus der gewonnenen RNA wurde mittels reverser Transkription cDNA gewonnen. Zunächst wurden dazu 2µg RNA mit 1µl oligo-dT-Primern (0,5µg/µl) versetzt. Der Rest auf 10µl wurde mit Wasser aufgefüllt und fünf Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden auf Eis 1µl reverse Trankriptase (200Units/µl, 4µl dNTPs (A/T/G/C; 2,5mM), 4µl Puffer und 3µl DEPC-Wasser zugegeben. Der Ansatz wurde nun erst bei 37°C eine Stunde, dann bei 94°C zwei Minuten inkubiert; die entstandene cDNA wurde bei -20°C eingefroren gelagert.

Quantitative real time PCR

Die erhaltene cDNA wurde 1:2 verdünnt. Auf einer 96-well-Platte wurden zunächst pro Vertiefung 9µl eines Mastermix vorgelegt, der aus 3µl Wasser, 0,5µl sense- und 0,5µl anti-sense-Primer sowie 5µl SYBRgreen bestand. Hinzu kam in die ersten acht Wells je 1µl eines Standards (gepoolt aus mehreren verschiedenen Proben cDNA) in unterschiedlicher Verdünnung (1:1, 1:3, 1:6, 1:12, je doppelt aufgetragen), in das neunte Well 1µl Wasser und in die restlichen Vertiefungen je 1µl Probe. Der Ansatz wurde mit Folie bedeckt, beschriftet und mit dem LightCycler 480 der Firma Roche amplifiziert. Die Berechnung erfolgte mit der zugehörigen Software.

Primer

β-Aktin sense	5’ GGTCCACACCCGCCACCAG 3’
β-Aktin anti-sense	5’ GGGCCTCGTCACCCACATAGG 3’
RPL32 sense	5’ TTAAGCGAAACTGGCGGAAAC 3’
RPL32 anti-sense	5’ TTGTTGCTCCCATAACCGATG 3’
Collagen I sense	5’ ACGTCCTGGTGAAGTTGGTC 3’
Collagen I anti-sense	5’ CAGGGAAGCCTCTTTCTCCT 3’
Fibronektin sense	5’ TCCAGCCCCACCCTACAAGT 3’
Fibronektin anti-sense	5’ CCAGACCAAACCATAAGAAC 3’
α-SMA sense	5’ ACTGGGACGACATGGAAAAG 3’
α-SMA anti-sense	5’ CATCTCCAGAGTCCAGCACA 3’
TGF-β sense	5’ TGGACCGCAACAACGCCATCT 3’
TGF-β anti-sense	5’ TCAGTGGGGGTCAGCAGCCG 3’
Renin sense	5’ GGTGTTCTAGGCATGGGCTT 3’
Renin anti-sense	5’ GATAATGCTGCGGGTCGCTA 3’
Podocin sense	5’ TTGGCACATCGATCCCTCAC 3’
Podocin anti-sense	5’ GGGACTCTGAAGCAGCCTTT 3’
Nephrin sense	5’ CTGGGGGACAGTGGATTGAC 3’
Nephrin anti-sense	5’ AAGACCACCAACCGCAAAGA 3’
GCA sense	5’ CTCAACATCACAGTAAATCACC 3’
GCA anti-sense	5’ GGCTTTGCCCAAACACATCC 3’
NPR-C sense	5’ GGCTCAATGAGGAGGATTACGTG 3’
NPR-C anti-sense	5’ CACAGAGAAGTCCCCATACCG 3’

Software und Datenbanken

http://scholar.google.de/

http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Microsoft Office 2010

SPSS Statistics 21

GraphPad Prism 6

Citavi 4

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACR	albumin/creatinine ratio
ANP	atrial natriuretic peptide
BNP	brain natriuretic peptide
BP	blood pressure
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CNP	C-type natriuretic peptide
Ctrl	Kontrolle
DOCA	Deoxycorticosteronacetat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
GBM	glomeruläre Basalmembran
GCA/GCB	Guanylatcyclase-A bzw. B
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
KO	Knockout, d.h. Genotyp GCA $flox^{+/+}$ / Podocin Cre^{tg}
mRNA	messenger ribonucleic acid
NAS	Nierenarterienstenose
Nat	native Niere
NPR	natriuretic peptide receptor
n.s.	nicht signifikant
OP	Operation
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RT	reverse Transkriptase
Ste	stenosierte Niere
TGF-β	transforming growth factor β
WT	Wildtyp
α-SMA	α-smooth muscle actin
PDE	Phosphodiesterase
2K1C	2 kidneys, 1 clip

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
bpm	beats per minute, Schläge pro Minute
g	Gramm
l	Liter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mosmol	Milliosmol
nm	Nanometer

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Podocyten-beeinflussende Transkriptionsfaktoren 14
Tabelle 2: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz 19
Tabelle 3: ANP-Antworten gewebespezifischer GCA-KO-Mäuse 29

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Nephron 8
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Glomerulum 9
Abbildung 3: Glomeruläre Kapillaren und Blut-Harn-Schranke 11
Abbildung 4: Schema der glomerulären Filtrationsbarriere 12
Abbildung 5: Nephrogenese 13
Abbildung 6: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System 17
Abbildung 7: Diagnoseverteilung bei Beginn einer Nierenersatztherapie 21
Abbildung 8: „Effacement“ der podocytären Fußfortsätze 22
Abbildung 9: Pathophysiologie der CKD 24
Abbildung 10: Wirkung von RAAS-Inhibitoren auf den glomerulären Druck 26
Abbildung 11: Medikamentöse Angriffspunkte am RAAS 26
Abbildung 12: Wechselwirkungen zwischen NPs, RAAS und Sympathikus 28
Abbildung 13: Podocyten-spezifische Wirkungen von ANP und BNP 32
Abbildung 14: lox/Cre-System 35
Abbildung 15: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs 36
Abbildung 16: Kreislaufparameter 42
Abbildung 17: Reninkonzentration im Plasma 44
Abbildung 18: Relative renale Renin-Expression 44
Abbildung 19: Hämatokrit und Körpergewicht 45
Abbildung 20: Glomeruläre Filtrationsrate 46
Abbildung 21: Metabolischer Käfig 47
Abbildung 22: Albuminurie 48
Abbildung 23: Organgewicht 49
Abbildung 24: Expressionsmuster der NP-Rezeptoren 50
Abbildung 25: Strukturproteine des Schlitzdiaphragmas 51
Abbildung 26: Renale Expression der Fibrosemarker 53

LITERATURVERZEICHNIS

Abbate, Mauro, Zoja, Carla und Remuzzi, Giuseppe. 2006. How does proteinuria cause progressive renal damage? *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2006, Bd. 17, 11, S. 2974-2984.

ACEI, ARB, and Aliskiren Comparison. PL Detail-Document, ACEI, ARB, and Aliskiren Comparison. Pharmacist's Letter/Prescriber's Letter. March 2013.

Agrawal, Varun, et al. 2009. Cardiovascular implications of proteinuria: an indicator of chronic kidney disease. *Nature reviews. Cardiology.* 2009, Bd. 6, 4, S. 301-311.

Alexander, C. S. 1957. A New Simple Method for Indirect Determination of Blood Pressure in the Rat. *Experimental Biology and Medicine.* 1957, Bd. 94, 2, S. 368-372.

Anand-Srivastava, M. B. und Trachte, G. J. 1993. Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacological reviews.* 1993, Bd. 45, 4, S. 455-497.

Ardaillou, N., et al. 1993. Release of cyclic nucleotides from the apical and basolateral poles of cultured human glomerular epithelial cells. *Experimental nephrology.* 1993, Bd. 1, 4, S. 253-260.

Ballermann, Barbara J., et al. 1998. Shear stress and the endothelium. *Kidney International.* 1998, Bd. 54, s67, S. 100-108.

Bevan, Heather S., et al. 2011. Acute laminar shear stress reversibly increases human glomerular endothelial cell permeability via activation of endothelial nitric oxide synthase. *American journal of physiology. Renal physiology.* 2011, Bd. 301, 4, S. F733-42.

Bodey, Fiona, Hopper, Ingrid und Krum, Henry. 2015. Neprilysin inhibitors preserve renal function in heart failure. *International journal of cardiology.* 2015, Bd. 179, S. 329-330.

Boerries, Melanie, et al. 2013. Molecular fingerprinting of the podocyte reveals novel gene and protein regulatory networks. *Kidney International.* 2013.

Bold, A. J., et al. 1981. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sciences.* 1981, Bd. 28, 1, S. 89-94.

Boute, N., et al. 2000. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature genetics.* 2000, Bd. 24, 4, S. 349-354.

Bowling, C. Barrett, et al. 2013. Prevalence of reduced estimated glomerular filtration rate among the oldest old from 1988-1994 through 2005-2010. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2013, Bd. 310, 12, S. 1284-1286.

Burford, James L., et al. 2014. Intravital imaging of podocyte calcium in glomerular injury and disease. *The Journal of clinical investigation.* 2014, Bd. 124, 5, S. 2050-2058.

Carter, Henry Vandyke. 1918. http://www.wikipedia.org. [Online] 1918. [Zitat vom: 04. 11. 2015.] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8a/Kidney_nephron.jpg.

Chansel, D., et al. 1990. Characterization of atrial natriuretic factor receptors in human glomerular epithelial and mesangial cells. *The American journal of physiology.* 1990, Bd. 259, 4 Pt 2, S. F619-27.

Chen, W., et al. 2011. Atrial natriuretic peptide enhances microvascular albumin permeability by the caveolae-mediated transcellular pathway. *Cardiovascular Research.* 2011, Bd. 93, 1, S. 141-151.

Chevalier, R. L., et al. 1992. Localization of cGMP after infusion of ANP or nitroprusside in the maturing rat. *American Journal of Physiology Renal Physiology.* 1992, Bd. 262, 3 pt 2, S. 417-424.

Chun, Yang-Sook, et al. 2003. Hypoxic activation of the atrial natriuretic peptide gene promoter through direct and indirect actions of hypoxia-inducible factor-1. *The Biochemical journal.* 2003, Bd. 370, Pt 1, S. 149-157.

Cogan, M. G. 1986. Atrial natriuretic factor can increase renal solute excretion primarily by raising glomerular filtration. *The American journal of physiology.* 1986, Bd. 250, 4 Pt 2, S. F710-4.

Coresh, Josef, et al. 2007. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2007, Bd. 298, 17, S. 2038-2047.

Currie, Gemma und Delles, Christian. 2013. Proteinuria and its relation to cardiovascular disease. *International journal of nephrology and renovascular disease.* 2013, Bd. 7, S. 13-24.

Davidson, A. J. 2009. Mouse kidney development. *StemBook.* s.l. : The Stem Cell Research Community, 2009. doi/10.3824/stembook.1.34.1.

Deckert, T. et al. 1989. Albuminuria reflects widespread vascular damage. *Diabetologia.* 1989, 32, S. 219-226.

Deen, W. M., Lazzara, M. J. und Myers, B. D. 2001. Structural determinants of glomerular permeability. *American journal of physiology. Renal physiology.* 2001, Bd. 281, 4, S. F579-96.

Dellamea, Bruno Schmidt, et al. 2014. Nitric oxide system and diabetic nephropathy. *Diabetology & metabolic syndrome.* 2014, Bd. 6, 1, S. 17.

Demerath, Theo, et al. 2014. Natriuretic peptides buffer renin-dependent hypertension. *American journal of physiology. Renal physiology.* 2014, Bd. 306, 12, S. F1489-98.

Drenckhahn, D. und Franke, R. P. 1988. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 1988, Bd. 59, 5, S. 673-682.

Drumm, Karina, et al. 2002. Albumin Induces NF-κB Expression in Human Proximal Tubule-Derived Cells (IHKE-1). *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2002, Bd. 12, 4, S. 187-196.

Durvasula, Raghu V., et al. 2004. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney international.* 2004, Bd. 65, 1, S. 30-39.

Eardley, K. S., et al. 2006. The relationship between albuminuria, MCP-1/CCL2, and interstitial macrophages in chronic kidney disease. *Kidney international.* 2006, Bd. 69, 7, S. 1189-1197.

Eddy, A. A. 2004. Proteinuria and interstitial injury. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2004, Bd. 19, 2, S. 277-281.

Eddy, Allison A., et al. 1995. Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. *Kidney International.* 1995, Bd. 47, 6, S. 1546-1557.

El-Aouni, Chiraz, et al. 2006. 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.* 2006, Bd. 17, 5, S. 1334-1344.

Endlich, K., Kriz, W. und Witzgall, R. 2001. Update in podocyte biology. *Current opinion in nephrology and hypertension.* 2001, Bd. 10, 3, S. 331-340.

Engvall, E. und Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971, Bd. 8, 9, S. 871-874.

Fang, Lilla, et al. 2013. Selective phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitor vardenafil ameliorates renal damage in type 1 diabetic rats by restoring cyclic 3',5' guanosine monophosphate (cGMP) level in podocytes. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2013, Bd. 28, 7, S. 1751-1761.

Farquhar, M. G., VERNIER, R. L. und GOOD, R. A. 1957. An electron microscope study of the glomerulus in nephrosis, glomerulonephritis, and lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine.* 1957, Bd. 106, 5, S. 649-660.

Faul, Christian, et al. 2007. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends in cell biology.* 2007, Bd. 17, 9, S. 428-437.

Frei, U. und Schober-Halstenberg, H.-J. 2008. *Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007.* Berlin : QuaSi-Niere GmbH, 2008. ISBN 3-9809996-3-7.

Freissmuth, M., Offermanns, S. und Böhm, S. 2012. *Pharmakologie & Toxikologie.* Heidelberg : Springer Medizin Verlag, 2012. ISBN 978-3-642-12353-5.

Fujimoto, T. und Singer, S. J. 1987. Immunocytochemical studies of desmin and vimentin in pericapillary cells of chicken. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society.* 1987, Bd. 35, 10, S. 1105-1115.

Gansevoort, Ron T., et al. 2011. Lower estimated GFR and higher albuminuria are associated with adverse kidney outcomes. A collaborative meta-analysis of general and high-risk population cohorts. *Kidney international.* 2011, Bd. 80, 1, S. 93-104.

Goldblatt, H., et al. 1934. STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION. *The Journal of experimental medicine.* 1934, Bd. 59, 3, S. 347-379.

Golos, Magdalena, et al. 2002. Effect of Angiotensin II on ANP-Dependent Guanylyl Cyclase Activity in Cultured Mouse and Rat Podocytes. *Kidney and Blood Pressure Research.* 2002, Bd. 25, 5, S. 296-302.

Grabias, Bryan M. und Konstantopoulos, Konstantinos. 2014. The physical basis of renal fibrosis: effects of altered hydrodynamic forces on kidney homeostasis. *American journal of physiology. Renal physiology.* 2014, Bd. 306, 5, S. F473-85.

Gray, Henry. 1918. Anatomy of the Human Body. Philadelphia und New York : Lea and Febiger, 1918. 20.

Greka, Anna und Mundel, Peter. 2012. Cell biology and pathology of podocytes. *Annual review of physiology.* 2012, Bd. 74, S. 299-323.

Gruden, G., et al. 2000. Mechanical stretch-induced fibronectin and transforming growth factor-beta1 production in human mesangial cells is p38 mitogen-activated protein kinase-dependent. *Diabetes.* 2000, Bd. 49, 4, S. 655-661.

Hall, Gentzon, et al. 2014. Phosphodiesterase 5 inhibition ameliorates angiontensin II-induced podocyte dysmotility via the protein kinase G-mediated downregulation of TRPC6 activity. *American journal of physiology. Renal physiology.* 2014, Bd. 306, 12, S. F1442-50.

Haraldsson, Börje, Nyström, Jenny und Deen, William M. 2008. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiological reviews.* 2008, Bd. 88, 2, S. 451-487.

Harel, Ziv, et al. 2012. The effect of combination treatment with aliskiren and blockers of the renin-angiotensin system on hyperkalaemia and acute kidney injury: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.).* 2012, Bd. 344, S. e42.

Harris, P. J., Thomas, D. und Morgan, T. O. 1987. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature.* 1987, Bd. 326, 6114, S. 697-698.

Harvey, J. 1992. Renal biopsy findings in hypertensive patients with proteinuria. *The Lancet.* 1992, Bd. 340, 8833, S. 1435-1436.

Haynes, Richard. laufende Studie, Stand 2016. UK HARP-III. *UK Heart and Renal Protection III.* UK : University of Oxford, laufende Studie, Stand 2016. DOI 10.1186/ISRCTN11958993.

Hirsch, J. R., et al. 1999. A novel cGMP-regulated K+ channel in immortalized human kidney epithelial cells (IHKE-1). *The Journal of Physiology.* 1999, Bd. 519, 3, S. 645-655.

Holtwick, Rita, et al. 2002. 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.* 2002, Bd. 99, 10, S. 7142-7147.

Hsu, Hsiang-Hao, et al. 2008. Mechanisms of angiotensin II signaling on cytoskeleton of podocytes. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany).* 2008, Bd. 86, 12, S. 1379-1394.

Hughson, Michael D., et al. 2014. Hypertension, glomerular hypertrophy and nephrosclerosis: the effect of race. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2014, Bd. 29, 7, S. 1399-1409.

ICD-10. 2016. [Online] 2016. [Zitat vom: 04. 11. 2015.] http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/N18.

Izzo, Joseph L., et al. 2014. Efficacy of LCZ696, an angiotensin receptor-neprilysin inhibitor (ARNI) in patients with stage 1-2 systolic hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension.* 2014, Bd. 8, 4, S. e30.

Jain, Gaurav, Campbell, Ruth C. und Warnock, David G. 2009. Mineralocorticoid receptor blockers and chronic kidney disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN.* 2009, Bd. 4, 10, S. 1685-1691.

Judge, Parminder, et al. 2014. Neprilysin inhibition in chronic kidney disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2014.

Jun, Min, Perkovic, Vlado und Cass, Alan. 2011. Intensive glycemic control and renal outcome. *Contributions to nephrology.* 2011, Bd. 170, S. 196-208.

KDIGO-CKD-1. 2013. Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Chapter 1: Definition and classification of CKD. *Kidney international supplements.* 2013, Bd. 3, 1, S. 19-62.

KDIGO-CKD-3. 2013. Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Chapter 3: Management of progression and complications of CKD. *Kidney International Supplements.* 2013, Bd. 3, 1, S. 73-90.

KDIGO-GN. 2012. Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. *Kidney international supplements.* 2012, Bd. 2, 2, S. 143-153.

Keller, Gunhild, et al. 2003. Nephron number in patients with primary hypertension. *The New England journal of medicine.* 2003, Bd. 348, 2, S. 101-108.

Kerjaschki, D., Sharkey, D. J. und Farquhar, M. G. 1984. Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *The Journal of cell biology.* 1984, Bd. 98, 4, S. 1591-1596.

Kestila, M. 1998. Positionally Cloned Gene for a Novel Glomerular Protein?Nephrin?Is Mutated in Congenital Nephrotic Syndrome. *Molecular Cell.* 1998, Bd. 1, 4, S. 575-582.

Khan, Usman A., et al. 2013. Prevention of chronic kidney disease and subsequent effect on mortality: a systematic review and meta-analysis. *PloS one.* 2013, Bd. 8, 8, S. e71784.

Klein, Silvia et al. 2013. Dialyseprävalenz und -versorgung in Deutschland - Bestandsaufnahme und Perspektiven. *12. Deutscher Kongress für Versorgungsforschung, Berlin.* 2013.

Klinke, Rainer, et al. 2010. *Physiologie.* Stuttgart : Georg Thieme Verlag KG, 2010. ISBN 9783137960065.

Komorniczak, Michał. 2009. http://www.wikipedia.org. [Online] 2009. [Zitat vom: 04. 11. 2015.] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/22/Renal_corpuscle.svg.

Kriz, W., et al. 1998. From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 1998, Bd. 13, 11, S. 2781-2798.

Kriz, Wilhelm, et al. 2013. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *American journal of physiology. Renal physiology.* 2013, Bd. 304, 4, S. F333-47.

Kuhn, Michaela. 2003. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circulation research.* 2003, Bd. 93, 8, S. 700-709.

Kuhn, Michaela, et al. 2009. The natriuretic peptide/guanylyl cyclase--a system functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation.* 2009, Bd. 119, 7, S. 2019-2030.

Lachapelle, M. und Bendayan, M. 1991. 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.* 1991, Bd. 60, 2, S. 105-111.

Lang, R. E., et al. 1985. Atrial natriuretic factor—a circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature.* 1985, Bd. 314, 6008, S. 264-266.

Lehmann, Rainer und Schleicher, Erwin D. 2000. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clinica Chimica Acta.* 2000, Bd. 297, 1-2, S. 135-144.

Levey, Andrew S., et al. 2011. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney international.* 2011, Bd. 80, 1, S. 17-28.

Lewko, B., et al. 2006. Regulation of cGMP synthesis in cultured podocytes by vasoactive hormones. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society.* 2006, Bd. 57, 4, S. 599-610.

Lewko, Barbara und Stepinski, Jan. 2002. Cyclic GMP signaling in podocytes. *Microscopy Research and Technique.* 2002, Bd. 57, 4, S. 232-235.

Lewko, Barbara, et al. 2004. C-type natriuretic peptide as a podocyte hormone and modulation of its cGMP production by glucose and mechanical stress. *Kidney International.* 2004, Bd. 66, 3, S. 1001-1008.

Liu, Youhua. 2011. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nature reviews. Nephrology.* 2011, Bd. 7, 12, S. 684-696.

Löffler, Georg, Petrides, Petro und Heinrich, Peter. 2007. *Biochemie und Pathobiochemie.* Heidelberg : Springer-Verlag GmbH, 2007. ISBN: 978-3-540-32680-9.

López-Novoa, José M., et al. 2010. Common pathophysiological mechanisms of chronic kidney disease: therapeutic perspectives. *Pharmacology & therapeutics.* 2010, Bd. 128, 1, S. 61-81.

Lüllmann-Rauch, Renate. 2009. *Taschenlehrbuch Histologie.* Stuttgart : Georg Thieme Verlag KG, 2009. ISBN 978-3-13-129243-8.

Matsushita et al., The Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. 2010. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *The Lancet.* 2010, Bd. 375, 9731, S. 2073-2081.

McCoy, David E., Guggino, Sandra E. und Stanton, Bruce A. 1995. The renal cGMP-gated cation channel: Its molecular structure and physiological role. *Kidney International.* 1995, Bd. 48, 4, S. 1125-1133.

McMurray, John J V, et al. 2014. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *The New England journal of medicine.* 2014, Bd. 371, 11, S. 993-1004.

Mennuni, S., et al. 2014. Hypertension and kidneys: unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. *Journal of human hypertension.* 2014, Bd. 28, 2, S. 74-79.

Mezzano, S. A., et al. 2001. Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney international.* 2001, Bd. 60, 4, S. 1366-1377.

Miceli, Ilaria, et al. 2010. Stretch reduces nephrin expression via an angiotensin II-AT(1)-dependent mechanism in human podocytes: effect of rosiglitazone. *American journal of physiology. Renal physiology.* 2010, Bd. 298, 2, S. F381-90.

Miner, Jeffrey H. 2012. The glomerular basement membrane. *Experimental cell research.* 2012, Bd. 318, 9, S. 973-978.

Moro, Cedric und Lafontan, Max. 2013. Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology.* 2013, Bd. 304, 3, S. H358-68.

Mundel, P., Gilbert, P. und Kriz, W. 1991. Podocytes in glomerulus of rat kidney express a characteristic 44 KD protein. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society.* 1991, Bd. 39, 8, S. 1047-1056.

Mundel, Peter und Reiser, Jochen. 2010. Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? *Kidney international.* 2010, Bd. 77, 7, S. 571-580.

Nagy, Andras. 2000. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis.* 2000, Bd. 26, 2, S. 99-109.

Nangaku, M., Pippin, J. und Couser, W. G. 1999. Complement membrane attack complex (C5b-9) mediates interstitial disease in experimental nephrotic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 1999, Bd. 10, 11, S. 2323-2331.

Nathan, D. M. 1993. Long-term complications of diabetes mellitus. *The New England journal of medicine.* 1993, Bd. 328, 23, S. 1676-1685.

Novartis. 2012. Rote Hand Brief Aliskiren Feb 2012. 2012.

Novartis. 2012. Rote Hand Brief Aliskiren Jan 2012. 2012.

Ogawa, Y., et al. 2012. Natriuretic Peptide Receptor Guanylyl Cyclase-A Protects Podocytes from Aldosterone-Induced Glomerular Injury. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2012, Bd. 23, 7, S. 1198-1209.

Pabst, R. und Sterzel, R. B. 1983. Cell renewal of glomerular cell types in normal rats. An autoradiographic analysis. *Kidney international.* 1983, Bd. 24, 5, S. 626-631.

Pavenstädt, Hermann, Kriz, Wilhelm und Kretzler, Matthias. 2003. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiological reviews.* 2003, Bd. 83, 1, S. 253-307.

Peacock, A. C. und Dingman, C. W. 1968. Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. *Biochemistry.* 1968, Bd. 7, 2, S. 668-674.

Petermann, Arndt T., et al. 2005. Mechanical stretch induces podocyte hypertrophy in vitro. *Kidney international.* 2005, Bd. 67, 1, S. 157-166.

Pillai, Unnikrishnan, Balabhadraputani, Krishna und Bhat, Zeenat. 2014. Immunoglobulin A nephropathy: a review of current literature on emerging pathophysiology. *The American journal of the medical sciences.* 2014, Bd. 347, 3, S. 249-253.

Piwkowska, Agnieszka, et al. 2014. High glucose increases glomerular filtration barrier permeability by activating protein kinase G type Iα subunits in a Nox4-dependent manner. *Experimental cell research.* 2014, Bd. 320, 1, S. 144-152.

Piwkowska, Agnieszka, et al. 2012. Hydrogen peroxide induces dimerization of protein kinase G type Iα subunits and increases albumin permeability in cultured rat podocytes. *Journal of cellular physiology.* 2012, Bd. 227, 3, S. 1004-1016.

Piwkowska, Agnieszka, et al. 2014. Insulin stimulates glucose transport via protein kinase G type I alpha-dependent pathway in podocytes. *Biochemical and biophysical research communications.* 2014, Bd. 446, 1, S. 328-334.

Qi, Zhonghua, et al. 2004. Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *American journal of physiology. Renal physiology.* 2004, Bd. 286, 3, S. F590-6.

Rad, Aria. 2006. http://www.wikipedia.org. [Online] 2006. [Zitat vom: 04. 11. 2015.] http://en.wikipedia.org/wiki/Renin%E2%80%93angiotensin_system#mediaviewer/File:Renin-angiotensin-aldosterone_system.png,.

Reiser, J., et al. 2000. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2000, Bd. 11, 1, S. 1-8.

Rocha, A. S. und Kudo, L. H. 1990. Atrial peptide and cGMP effects on NaCl transport in inner medullary collecting duct. *The American journal of physiology.* 1990, Bd. 259, 2 Pt 2, S. F258-68.

Rosario, Rey F. und Wesson, Donald E. 2006. Primary hypertension and nephropathy. *Current opinion in nephrology and hypertension.* 2006, Bd. 15, 2, S. 130-134.

Roscioni, Sara S., Heerspink, Hiddo J Lambers und Zeeuw, Dick. 2014. The effect of RAAS blockade on the progression of diabetic nephropathy. *Nature reviews. Nephrology.* 2014, Bd. 10, 2, S. 77-87.

Roscioni, Sara S., Lambers Heerspink, Hiddo J und Zeeuw, Dick. 2014. Microalbuminuria: target for renoprotective therapy PRO. *Kidney international.* 2014, Bd. 86, 1, S. 40-49.

Sabrane, Karim, et al. 2005. Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *The Journal of clinical investigation.* 2005, Bd. 115, 6, S. 1666-1674.

Saito, Yoshihiko. 2010. Roles of atrial natriuretic peptide and its therapeutic use. *Journal of Cardiology.* 2010, Bd. 56, 3, S. 262-270.

Saleem, Moin A., et al. 2008. The molecular and functional phenotype of glomerular podocytes reveals key features of contractile smooth muscle cells. *American journal of physiology. Renal physiology.* 2008, Bd. 295, 4, S. F959-70.

Sauer, Brian und Henderson, Nancy. 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1988, Bd. 85, 14, S. 5166-5170.

Saxén, L. und Sariola, H. 1987. Early organogenesis of the kidney. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany).* 1987, Bd. 1, 3, S. 385-392.

Schnabel, E., Anderson, J. M. und Farquhar, M. G. 1990. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *The Journal of cell biology.* 1990, Bd. 111, 3, S. 1255-1263.

Schreiber, Andrea. 2012. *Die Mechanismen der kompensatorischen renalen Hypertrophie.* Regensburg : Elektronischer Publikationsserver, 2012.

Sealey, J. E., et al. 1988. On the renal basis for essential hypertension: nephron heterogeneity with discordant renin secretion and sodium excretion causing a hypertensive vasoconstriction-volume relationship. *Journal of Hypertension.* 1988, Bd. 6, 6 // 10, S. 763-777.

Shankland, S. J. 2006. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney international.* 2006, Bd. 69, 12, S. 2131-2147.

Sharma, R., et al. 1992. Vasoactive substances induce cytoskeletal changes in cultured rat glomerular epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 1992, Bd. 3, 5, S. 1131-1138.

Simpson, D. A., et al. 2000. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Molecular vision.* 2000, Bd. 6, S. 178-183.

Sonnenberg, J. L., et al. 1988. Identification of protease 3.4.24.11 as the major atrial natriuretic factor degrading enzyme in the rat kidney. *Peptides.* 1988, Bd. 9, 1, S. 173-180.

Spiegelman, S., Watson, K. F. und Kacian, D. L. 1971. Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1971, Bd. 68, 11, S. 2843-2845.

Staffel, J., et al. 2017. Natriuretic Peptide Receptor Guanylyl Cyclase-A in Podocytes is Renoprotective but Dispensable for Physiologic Renal Function. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2017.

Stepinski, J., et al. 2000. Co-operation between particulate and soluble guanylyl cyclase systems in the rat renal glomeruli. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society.* 2000, Bd. 51, 3, S. 497-511.

Sterner, Rosalie M., Hartono, Stella P. und Grande, Joseph P. 2014. The Pathogenesis of Lupus Nephritis. *Journal of clinical & cellular immunology.* 2014, Bd. 5, 2.

Sugimoto, H., et al. 1998. Increased expression of endothelial cell nitric oxide synthase (ecNOS) in afferent and glomerular endothelial cells is involved in glomerular hyperfiltration of diabetic nephropathy. *Diabetologia.* 1998, Bd. 41, 12, S. 1426-1434.

Takahashi, Shinichi, et al. 2008. Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6. *The Journal of physiology.* 2008, Bd. 586, Pt 17, S. 4209-4223.

Tang, K. Mary, et al. 2003. Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nature medicine.* 2003, Bd. 9, 12, S. 1506-1512.

Teixeira, Vicente de Paulo Castro, et al. 2005. Functional consequences of integrin-linked kinase activation in podocyte damage. *Kidney international.* 2005, Bd. 67, 2, S. 514-523.

Tian, Dequan, et al. 2010. Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. *Science signaling.* 2010, Bd. 3, 145, S. ra77.

Trenchev, P., et al. 1976. Localization of smooth muscle-like contractile proteins in kidney by immunoelectron microscopy. *Journal of anatomy.* 1976, Bd. 121, Pt 1, S. 85-95.

USRDS. 2009. www.usrds.org. *United States Renal Data System.* [Online] 2009. [Zitat vom: 09. 11. 2015.] http://www.usrds.org/2009/slides/indiv/INDEX_CKD.HTML.

Vasmant, D., Maurice, M. und Feldmann, G. 1984. Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat. *The Anatomical record.* 1984, Bd. 210, 1, S. 17-24.

Volpe, Massimo. 2014. Natriuretic peptides and cardio-renal disease. *International journal of cardiology.* 2014, Bd. 176, 3, S. 630-639.

Voors, Adriaan A., et al. 2015. Renal effects of the angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *European journal of heart failure.* 2015, Bd. 17, 5, S. 510-517.

Wartiovaara, Jorma, et al. 2004. Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *The Journal of clinical investigation.* 2004, Bd. 114, 10, S. 1475-1483.

Weidemann, Alexander, et al. 2008. Hypoxia, via stabilization of the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha, is a direct and sufficient stimulus for brain-type natriuretic peptide induction. *The Biochemical journal.* 2008, Bd. 409, 1, S. 233-242.

Weir, Matthew R. 2007. Microalbuminuria and cardiovascular disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN.* 2007, Bd. 2, 3, S. 581-590.

Weiß, Christel. 2013. *Basiswissen Medizinische Statistik (6. Auflage).* Berlin Heidelberg : Springer, 2013. ISBN 978-3-642-34261-5.

Wohlfarth, Verena, et al. 2003. Protein uptake disturbs collagen homeostasis in proximal tubule-derived cells. *Kidney International.* 2003, Bd. 63, s84, S. 103-109.

Wolf, Gunter und Ziyadeh, Fuad N. 2007. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron. Physiology.* 2007, Bd. 106, 2, S. p26-31.

Yang, Yanqiang, et al. 2005. Formation and phosphorylation of the PINCH-1-integrin linked kinase-alpha-parvin complex are important for regulation of renal glomerular podocyte adhesion, architecture, and survival. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2005, Bd. 16, 7, S. 1966-1976.

Zaporowska-Stachowiak, Iwona, et al. 2014. Aliskiren - an alternative to angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers in the therapy of arterial hypertension. *Archives of medical science : AMS.* 2014, Bd. 10, 4, S. 830-836.

Zhang, Jia, Zhao, Zhilong und Wang, Jiansheng. 2014. Natriuretic peptide receptor A as a novel target for cancer. *World journal of surgical oncology.* 2014, Bd. 12, S. 174.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Stefan Ströhl, geboren am 20.12.1989 in Sulzbach-Rosenberg, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Nephroprotektive Effekte der podocytären Guanylat-Cyclase A“ eigenständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 12. September 2017 Stefan Ströhl