

**Der sGC-Aktivator Cinaciguat als Therapieoption der  
diabetischen Nephropathie  
und Untersuchung von glukoseinduzierten molekularen  
Mechanismen in Mesangialzellen**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER  
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT  
CHEMIE UND PHARMAZIE

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Manuela Harloff

aus Buchloe

im Jahr 2021



Die vorliegende Doktorarbeit entstand im Zeitraum von Oktober 2015 bis Mai 2020 unter der Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Jens Schlossmann am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg.

Teile dieser Arbeit wurden bereits im „British Journal of Pharmacology“ veröffentlicht (1).

Beteiligte Personen, die Versuche angeleitet oder maßgeblich durchgeführt haben, sind im Methodenteil namentlich erwähnt.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 27. September 2021

Prüfungsausschuss:

- |                        |   |
|------------------------|---|
| Vorsitzender:          | Herr Prof. Dr. rer. nat. Sigurd Elz       |
| 1. Gutachter / Prüfer: | Herr Prof. Dr. rer. nat. Jens Schlossmann |
| 2. Gutachter / Prüfer: | Herr Prof. Dr. rer. nat. Achim Göpferich  |
| 3. Prüfer:             | Herr Prof. Dr. med. Frank Schweda         |

Unterschrift: .....

(Manuela Harloff)



Was ist das schon ein Wissenschaftler?

Ein neugieriger Mensch, der durch ein Schlüsseloch blickt –  
durch das Schlüsseloch der Natur –  
und zu erkennen versucht, was dahinter vor sich geht.

*Jacques Cousteau (1910-1997)*



# Zusammenfassung

Die Anzahl der Patienten, die an Diabetes mellitus erkranken und als Langzeitfolge eine diabetische Nephropathie (DN) entwickeln, steigt stetig. Weltweit stellt die DN die Hauptursache der terminalen Niereninsuffizienz dar, die im ungünstigsten Fall eine Dialyse-Therapie oder Nierentransplantation notwendig macht. Bis heute existieren immer noch keine zielgerichteten Behandlungsmöglichkeiten für die DN. Als Standardtherapie erhalten die Patienten im Allgemeinen Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, welche den Progress der Erkrankung zwar verlangsamen aber nicht zu einer Heilung führen.

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung der NO/sGC/cGMP-Signalkaskade durch sGC-Aktivatoren effektiv diabetesinduzierte Nierenschädigungen verhindern konnte. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob der sGC-Aktivator Cinaciguat einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung der DN in einem murinen Typ-1-Diabetesmodell hat.

Hierfür wurden sowohl diabetische Wildtyp- als auch eNOS-KO-Mäuse in einem Zeitraum von acht oder zwölf Wochen untersucht. Die Hälfte der Tiere erhielt in den letzten vier Wochen des jeweiligen Versuchszeitraums zudem Cinaciguat über das Futter verabreicht.

Insbesondere eNOS-KO-Mäuse nach zwölf Wochen Diabetes entwickelten deutliche Merkmale einer humanen DN, wie eine reduzierte glomeruläre Filtrationsrate, erhöhte Serum-Kreatininspiegel, Albuminurie, Expansion des Mesangiums und Nierenfibrose. In Tieren, die zusätzlich Cinaciguat erhalten haben, konnte diese Nierenschädigung jedoch erfolgreich reduziert werden.

Um außerdem einen detaillierteren Einblick in die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu erhalten, wurde zusätzlich die Expression verschiedener Signalproteine der sGC/cGMP/PKG-Signalkaskade im Nierengewebe aber auch in primären Mesangialzellen analysiert. Erstmals wurde beispielsweise die Expression der Phosphodiesterase (PDE) 9a in der diabetischen Niere analysiert, wobei eine signifikante Reduktion dieses Enzyms festgestellt werden konnte. Auch Thrombospondin 1 (TSP1) wurde genauer untersucht. Als Regulator des Zytokins TGF $\beta$ , nimmt TSP1 eine Schlüsselfunktion in fibrotischen Nierenerkrankungen ein. Sowohl in den diabetischen Nieren als auch in den mit Glukose stimulierten Mesangialzellen konnten deutlich erhöhte TSP1-Level beobachtet werden. Die pharmakologische Aktivierung der sGC/cGMP/PKG-Signalkaskade mit Cinaciguat oder 8-Br-cGMP konnte diese Expressionszunahme jedoch zuverlässig hemmen.

Durch weitere Zellkulturversuche mit PKG-KO-MCs wurde schließlich untersucht, ob die regulatorischen Effekte auf die TSP1-Expression eventuell durch die PKGs vermittelt werden. In diesem Zusammenhang wurde zum ersten Mal überhaupt nachgewiesen, dass neben der PKGI auch die PKGII in Mesangialzellen exprimiert wird. Da die Reduktion der TSP1 mit Cinaciguat und 8-Br-cGMP jedoch sowohl in PKGI-KO als auch in PKGII-KO-Zellen weiterhin detektierbar war, wurde postuliert, dass möglicherweise beide Isoformen der PKG in Kombination an der Regulation der TSP1 beteiligt sind.

Zusammengefasst konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass die pharmakologische Aktivierung der NO/sGC/PKG-Signalkaskade mit Cinaciguat einen protektiven Effekt auf die Niere unter hyperglykämischen Bedingungen hat. sGC-Aktivatoren stellen somit grundsätzlich eine vielversprechende Therapieoption für die DN dar. Des Weiteren konnten neue Einblicke in zugrundeliegenden molekularen Mechanismen gewonnen werden, die dazu beitragen, die diabetische Nierenerkrankung besser zu verstehen.



## Abstract

The number of patients struggling with diabetes mellitus (DM) and consequently with its long-term complication diabetic nephropathy (DN) is steadily rising. Today, DN is the leading cause for end-stage renal disease worldwide, which might require dialysis and renal replacement therapy. Until now, there is no specific therapy available. Standard treatment with inhibitors of the renin-angiotensin system just slows down progression and does not cure the disease. Targeting the NO/sGC/cGMP pathway using sGC activators has been shown previously to effectively prevent kidney damage. Thus, in this thesis, it was investigated if the sGC activator cinaciguat shows beneficial effects on kidney impairments in a type 1 diabetes mouse model.

Therefore, diabetic wild type (WT) and endothelial NO synthase knockout (eNOS KO) mice were analyzed after eight or twelve weeks observation time. Additionally, half of these mice received cinaciguat incorporated into their chow in the last four weeks of each observation period. Particularly, 12 weeks DM eNOS KO mice developed most characteristics of a human DN, like a reduced glomerular filtration rate, increased serum creatinine, albuminuria, mesangial cell expansion and kidney fibrosis. However, animals which further received cinaciguat showed markedly decreased kidney impairments.

To get a more detailed insight into the underlying molecular mechanisms, the expression of various signaling proteins of the sGC/cGMP/PKG pathway was analyzed in kidney tissue but also in primary mesangial cells (MCs). For example, the expression of phosphodiesterase (PDE) 9a in diabetic kidneys was analyzed for the first time, and a significant reduction in this enzyme was found.

Furthermore, Thrombospondin 1 (TSP1) a regulator of the cytokine TGF $\beta$  and key mediator in fibrotic kidney diseases, was examined more closely. Significantly increased TSP1 levels were observed both in diabetic kidneys and high glucose-stimulated mesangial cells. The pharmacological activation of the sGC/cGMP/PKG signaling cascade with cinaciguat or 8-Br-cGMP could, however, reliably inhibit this increase in expression.

By means of further cell culture experiments with PKG-KO-MCs, it was finally investigated whether the regulatory effects on TSP1 expression are possibly mediated by the PKGs. In this context, it was also demonstrated for the first time that PKGII is expressed in mesangial cells. Since the reduction of TSP1 with cinaciguat and 8-Br-cGMP was still detectable in

both PKGI-KO and PKGII-KO cells, it was postulated that both isoforms of PKG in combination may be involved in the regulation of TSP1.

In summary, this thesis showed that the pharmacological activation of the NO/sGC/PKG signaling cascade with cinaciguat has protective effects on the kidneys under hyperglycemic conditions. In principle, sGC activators are a promising therapeutic option for DN. Furthermore, new insights into the underlying molecular mechanisms could be gained, which may contribute to a better understanding of diabetic kidney disease.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Diabetes mellitus .....	1
1.2 Diabetische Nephropathie .....	2
1.2.1 Aufbau und Funktion der Niere .....	3
1.2.2 Charakteristika der diabetischen Nephropathie .....	6
1.2.3 Aktuelle Therapiemöglichkeiten .....	8
1.3 Die NO/sGC/cGMP-Signalkaskade .....	9
1.3.1 Signaltransduktion .....	9
1.3.2 Phosphodiesterasen .....	11
1.3.3 cGMP-abhängigen Proteinkinasen.....	12
1.3.4 Physiologische Bedeutung der NO-Signalkaskade in der Niere.....	13
1.4 sGC als pharmazeutisches Target .....	14
1.4.1 Struktur und physiologische Aktivierung der sGC.....	14
1.4.2 Pharmakologische Aktivierung der sGC.....	15
1.4.3 Therapeutische Anwendungen von sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren .....	17
1.5 Mausmodelle zur Untersuchung der DN .....	19
1.6 Ziele der Arbeit .....	21
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.1 Material .....	22
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.2 Geräte .....	24
2.1.3 Antikörper .....	25
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	26

---

2.1.5	Primer.....	28
2.2	Tierexperimentelle Methoden .....	28
2.2.1	Mausmodell zur Untersuchung der diabetischen Nephropathie .....	29
2.2.2	Blutdruckmessung.....	30
2.2.3	Ermittlung der Stoffwechselfparameter .....	31
2.2.4	Retrograde Perfusion und Organentnahme .....	31
2.3	Urin- und Serumanalysen.....	32
2.3.1	Bestimmung des Glukosegehalts im Urin.....	32
2.3.2	Bestimmung der Kreatininkonzentration und Kreatinin-Clearance .....	32
2.3.3	Bestimmung der Proteinurie .....	33
2.3.4	Bestimmung der Albuminurie.....	33
2.3.5	Bestimmung der cNMP-Konzentration im Urin.....	34
2.4	Histochemische Untersuchung der Nieren.....	34
2.4.1	Immunhistochemie.....	35
2.4.2	Pikro-Siriusrot-Färbung .....	35
2.5	Zellkulturversuche mit Mesangialzellen .....	36
2.5.1	Isolierung von primären Mesangialzellen.....	36
2.5.2	Subkultivierung der Mesangialzellen.....	37
2.5.3	Stimulation der Mesangialzellen.....	38
2.5.4	Immuncytochemie.....	38
2.6	RT-qPCR.....	39
2.6.1	Extraktion der Gesamt-RNA.....	39
2.6.2	Reverse Transkription .....	40
2.6.3	Quantitative PCR .....	40
2.7	Nachweis der PKGII-mRNA mittels PCR.....	42
2.8	SDS-PAGE und Western Blot .....	43
2.8.1	Probenvorbereitung .....	43
2.8.2	Western Blot .....	45
2.9	Statistische Auswertung .....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
3.1	Cinaciguat als Therapieoption in einem Mausmodell der DN.....	47
3.1.1	Einfluss von Cinaciguat auf Krankheitszeichen des Diabetes mellitus .....	47
3.1.2	Einfluss von Cinaciguat auf den Blutdruck .....	50

3.1.3	Einfluss von Cinaciguat auf verschiedene Nierenparameter .....	52
3.1.4	Einfluss von Cinaciguat auf die renale Ausscheidung zyklischer Nukleotide....	56
3.1.5	Untersuchung der fibrotischen Veränderungen in der Niere .....	59
3.1.6	Immunhistochemische Untersuchung von Fibrosemarkern.....	61
3.1.7	Untersuchung der Podozytenschädigung .....	63
3.1.8	Analyse der Mesangialzellexpansion.....	64
3.1.9	Untersuchung des Gefäßmarkers CD31.....	66
3.1.10	mRNA-Expressionsanalyse von Fibrosemarkern und Signalproteinen.....	67
3.1.11	Regulation von Signalproteinen der sGC/cGMP/PKG-Signalkaskade .....	70
3.2	Untersuchung von glucoseinduzierten Mechanismen in murinen Mesangialzellen ..	73
3.2.1	Reinheitskontrolle der isolierten primären Mesangialzellen .....	73
3.2.2	Aktivierung der sGC/cGMP-Signalkaskade in glukosestimulierten WT-MCs ..	74
3.2.3	Die Rolle der PKGI in glukosestimulierten Mesangialzellen.....	77
3.2.4	Nachweis der PKGII in Mesangialzellen.....	79
3.2.5	Die Rolle der PKGII in glukosestimulierten Mesangialzellen.....	81
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>83</b>
4.1	Beurteilung der Nierenschädigung im verwendeten Mausmodell .....	83
4.1.1	Induktion eines Typ-1-DM mittels STZ .....	83
4.1.2	Untersuchung der Nierenfunktion im verwendeten STZ-Mausmodell.....	84
4.1.3	Nierenpathologie im STZ-Mausmodell .....	88
4.1.4	Analyse der Podozytenschädigung .....	90
4.1.5	Fazit zum verwendeten Mausmodell .....	91
4.2	Pharmakologische Aktivierung der sGC als Therapieoption der DN.....	92
4.2.1	NO/sGC/PKG-Signalkaskade in der DN .....	92
4.2.2	Einfluss von Cinaciguat auf die diabetische Nephropathie .....	95
4.2.3	Einfluss von Cinaciguat auf die Expression verschiedener Signalproteine in der diabetischen Niere.....	98
4.3	Glukoseinduzierte Effekte auf die NO/sGC/cGMP-Signalkaskade in MCs.....	101
4.3.1	Untersuchung der Proteinregulation in Wildtyp-MCs .....	101
4.3.2	Untersuchung der Proteinregulation in PKGI- und PKGII-KO-Zellen .....	103
4.4	Fazit und Ausblick .....	106
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>123</b>

6.1 Zugehörige Totalprotein-Spuren der Immunoblots in Abbildung 3-11.....	123
<b>7 Veröffentlichungen .....</b>	<b>124</b>
7.1 Publikationen .....	124
7.2 Posterpräsentationen .....	124
<b>8 Danksagung .....</b>	<b>125</b>
<b>9 Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>126</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Makroskopischer Aufbau der Niere.....	3
Abbildung 1-2: Aufbau eines Nephrons.....	4
Abbildung 1-3: Struktur eines Glomerulums.....	5
Abbildung 1-4: Die fünf Stadien der diabetischen Nephropathie.....	7
Abbildung 1-5: Die NO/sGC/cGMP-Signalkaskade.....	10
Abbildung 1-6: Pharmakologische Aktivierung der sGC.....	16
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.....	30
Abbildung 2-2: Darstellung eines Stoffwechselläufigs.....	31
Abbildung 2-3: Farbskala zur Auswertung des Urinteststreifens.....	32
Abbildung 2-4: Mesangialzellwachstum in Zellkultur.....	37
Abbildung 3-1: Tägliche Wasseraufnahme und Urinausscheidung.....	50
Abbildung 3-2: Grafische Darstellung der systolischen Blutdruckwerte.....	51
Abbildung 3-3: Grafische Darstellung der untersuchten Nierenparameter.....	53
Abbildung 3-4: cGMP- und cAMP-Ausscheidung über den Urin.....	58
Abbildung 3-5: Untersuchung der Nierenfibrose und glomerulären Hypertrophie.....	60
Abbildung 3-6: Immunhistochemische Analyse weiterer Fibrosemarker in Nierengewebe nach der Induktion von DM.....	62
Abbildung 3-7: Analyse der Nephrinexpression in diabetischem Nierengewebe.....	64
Abbildung 3-8: Immunhistochemische Analyse von $\alpha 8$ -Integrin (ITGA8) in diabetischem Nierengewebe von WT- und eNOS-KO-Mäusen.....	65
Abbildung 3-9: Immunhistochemische Analyse des Endothelzellmarkers CD31 in diabetischem Nierengewebe von WT- und eNOS-KO-Mäusen.....	66
Abbildung 3-10: mRNA-Expressionsanalyse von Fibrosemarkern und Signalproteinen... 68	
Abbildung 3-11: Regulation von Signalproteinen der sGC/cGMP-Signalkaskade.....	71
Abbildung 3-12: Vergleich der Proteinexpression in WT- und eNOS-KO-Kontrollnieren.....	72
Abbildung 3-13: Charakterisierung der isolierten primären, murinen Mesangialzellen mittels Immunocytochemie.....	73
Abbildung 3-14: Effekte der sGC/PKG-Aktivierung auf die mRNA-Expression in HG-stimulierten WT-Mesangialzellen.....	74
Abbildung 3-15: Regulation der Proteinexpression in HG-stimulierten Mesangialzellen..	76

Abbildung 3-16: Regulation der Proteinexpression in HG-stimulierten PKGI-KO-MCs. .	78
Abbildung 3-17: Nachweis der PKGII in primären, murinen Mesangialzellen. ....	79
Abbildung 3-18: Analyse der PKGII-Expression in HG-stimulierten WT- und PKGI-KO-MCs. ....	80
Abbildung 3-19: Regulation der Proteinexpression in HG-stimulierten PKGII-KO-MCs.	82
Abbildung 4-1: Einfluss des DM auf die Proteine der NO/sGC/cGMP-Signalkaskade. ....	95
Abbildung 4-2: Einfluss der pharmakologischen Aktivierung der sGC mit Cinaciguat auf die durch DM veränderte Expression einzelner Signalproteine. ....	100



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Kriterien für Mausmodelle zur Erforschung der DN (112). .....	19
Tabelle 2-1: Verwendete Spezialchemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	22
Tabelle 2-2: Eingesetzte Geräte.....	24
Tabelle 2-3: Primärantikörper. ....	25
Tabelle 2-4: Sekundärantikörper. ....	26
Tabelle 2-5: Zusammensetzung einzelner Puffer und Lösungen. ....	26
Tabelle 2-6: Primer für RT-qPCR-Analyse.....	28
Tabelle 2-7: Einzelne Schritte der cDNA-Synthese. ....	40
Tabelle 2-8: Zusammensetzung eines qPCR Ansatzes.....	41
Tabelle 2-9: qPCR-Programm. ....	41
Tabelle 2-10: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes. ....	42
Tabelle 2-11: PCR-Programm. ....	43
Tabelle 2-12: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.....	45
Tabelle 3-1: Blutzuckerspiegel und Körpergewicht der Versuchstiere.....	47
Tabelle 3-2: Untersuchung der Glukosurie mittels Harnteststreifen. ....	48
Tabelle 3-3: Untersuchung der täglichen Wasseraufnahme und Urinausscheidung. ....	49
Tabelle 3-4: Bestimmung des systolischen Blutdrucks. ....	51
Tabelle 3-5: Untersuchung verschiedener Nierenparameter. ....	52
Tabelle 3-6: Gesamtgewicht der isolierten Nieren. ....	56
Tabelle 3-7: Bestimmung der cGMP- und cAMP-Ausscheidung im Urin. ....	57
Tabelle 3-8: Auswertung der Sirius-Rot-Färbung und glomerulären Hypertrophie. ....	61
Tabelle 3-9: mRNA-Expressionsanalyse von Fibrosemarkern und Signalproteinen. ....	69
Tabelle 3-10: mRNA-Expressionsanalyse von Fibrosemarkern und Signalproteinen in MCs. .....	75
Tabelle 4-1: Regulation der PKGI und II in WT- und KO-MCs im Vergleich zu NG-Zellen. .....	104

# Abkürzungsverzeichnis

8-Br-cGMP	zyklisches 8-Bromo-Guanosin-3',5'-monophosphat
ACE	<i>angiotensin-converting enzyme</i>
AMDCC	<i>Animal Models of Diabetic Complications Consortium</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARB	Angiotensinrezeptorblocker
ATP	Adenosin-5'-trihydrogentriphosphat
BD	Blutdruck
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cCMP	zyklisches Cytidin-3',5'-monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
Cin	Cinaciguat
CNG-Kanäle	zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle ( <i>cyclic nucleotide-gated ion channel</i> )
Col	Collagen
cUMP	zyklisches Uridin-3',5'-monophosphat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DM	Diabetes mellitus
DN	Diabetische Nephropathie
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbant assay</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FBS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HbA <sub>1c</sub>	Hämoglobin A <sub>1c</sub>
HFrEF	chronische Herzinsuffizienz mit verminderter Ejektionsfraktion
HG	Hochglukose
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
i.p.	intraperitoneal
ITGA8	$\alpha$ 8-Integrin
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie
MC	Mesangialzelle
MMP	Matrixmetalloproteinase
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NG	Normalglukose
NO	Stickstoffmonoxid

---

NP	natriuretisches Peptid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAS-Domäne	Per-ARNT-Sim-Domäne
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
pGC	partikuläre Guanylylcyclase
PH	pulmonale Hypertonie
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sGC	lösliche Guanylylcyclase
SGLT 2	<i>sodium dependent glucose transporter</i>
STZ	Streptozotocin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	tubuloglomeruläres Feedback
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TIMP	endogener Inhibitor der MMPs ( <i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i> )
TP	Totalprotein
TSP1	Thrombospondin 1
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
Wo	Woche
WT	Wildtyp
$\alpha$ SMA	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Diabetes mellitus

Der Begriff Diabetes mellitus (DM) beschreibt eine heterogene Gruppe von Stoffwechselstörungen, die sich vor allem durch eine chronische Erhöhung der Blutglukosekonzentration auszeichnet. Ursache für die Hyperglykämie ist entweder eine gestörte Insulinsekretion der Beta-Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas oder eine verringerte Insulinwirkung. Häufig finden sich zusätzlich auch Störungen des Kohlehydrat-, Fett- oder Proteinstoffwechsels (2, 3).

Nach der *American Diabetes Association* (ADA) werden die verschiedenen Diabetes-Typen in vier Haupt-Kategorien unterteilt (4):

- *Typ-1-Diabetes* wird durch eine Autoimmunreaktion hervorgerufen, die zur Destruktion der Beta-Zellen und schließlich zum absoluten Insulinmangel führt. Diese Form tritt meistens bereits im Kindesalter auf.
- Beim *Typ-2-Diabetes* verlieren die Körperzellen aufgrund chronisch erhöhter Blutzuckerspiegel die Fähigkeit auf Insulin zu reagieren (Insulinresistenz), was mit einem fortschreitenden Verlust der Insulinsekretion einhergeht. Dieser Typ tritt vor allem bei älteren Erwachsenen auf, wobei bestimmte Risikofaktoren wie Übergewicht, familiäre Belastung oder Bewegungsmangel die Entstehung begünstigen können.
- *Gestationsdiabetes*, wird erstmals während der Schwangerschaft diagnostiziert.
- Zu den *anderen spezifischen Diabetes-Typen* gehören beispielsweise genetische Defekte der Betazellfunktion oder Insulinwirkung, Erkrankungen des exokrinen Pankreas, aber auch medikamentös-chemisch induzierter Diabetes.

Mit etwa 90–95 % der Erkrankungen ist der Typ-2-Diabetes mit Abstand die am häufigsten auftretende Form, gefolgt vom Typ-1-Diabetes mit 5–10 % (2).

Im Jahr 2019 waren weltweit etwa 463 Millionen Menschen im Alter zwischen 20 und 79 Jahren an Diabetes mellitus erkrankt. Dies entspricht einem Anteil von 9,3 % aller Menschen in dieser Altersgruppe. 4,2 Millionen Menschen sind an den Folgen der Krankheit verstorben. Prognosen zufolge soll die Zahl an Erkrankten bis 2045 weltweit um weitere 51 % auf 700 Millionen steigen, was vor allem für Länder mit geringem und mittlerem Einkommen eine enorme volkswirtschaftliche Herausforderung darstellt (5). Allein in Deutschland lebten im Jahr 2020 etwa 8 Millionen Typ-2-Diabetiker, wobei die Dunkelziffer der nicht-diagnostizierten Patienten bei schätzungsweise weiteren 1,6–2 Millionen liegt. Hinzukommen etwa

372 000 Typ-1-Diabetiker. Auch in der Bundesrepublik nimmt die Zahl der Erkrankten stetig zu, jährlich werden etwa 500 000 Neuerkrankungen registriert (6).

Entsprechend der Empfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) sind die Diagnosekriterien für einen Diabetes mellitus erfüllt, wenn der Gelegenheits-Plasmaglukosewert  $\geq 200$  mg/dl ( $\geq 11,1$  mmol/l), der Nüchtern-Plasmaglukosewert  $\geq 126$  mg/dl ( $\geq 7,0$  mmol/l) oder der 2-h-Wert des oralen Glukose-Toleranz-Tests (OGTT)  $\geq 200$  mg/dl ( $\geq 11,1$  mmol/l) beträgt und/oder eine erhöhte Konzentration des glykierten Hämoglobins  $A_{1c}$  ( $HbA_{1c}$ )  $\geq 6,5$  % ( $\geq 48$  mmol/mol) festgestellt wurde (7). Des Weiteren gehören Glukosurie, Polyurie, Polydipsie und Gewichtsverlust zu den typischen Symptomen einer Diabeteserkrankung (2, 7, 8). Da es sich beim Typ-1-Diabetes um eine Autoimmunerkrankung handelt, werden zur Diagnosestellung zusätzlich sogenannte Autoantikörper, wie z. B. Inselzellantikörper, Insulinautoantikörper oder Autoantikörper gegen die Glutamat-Decarboxylase der Betazelle, als serologische Marker im Blut der Patienten bestimmt (9).

Während sich der Typ-1-Diabetes meist schon in den frühen Stadien klinisch manifestiert, bleibt der Typ-2-Diabetes oft jahrelang unerkannt. Chronisch erhöhte Blutzuckerspiegel sind jedoch die Hauptursache für weitreichende Folgeerkrankungen verschiedener Organe. Mikrovaskuläre Komplikationen führen zur Schädigung der kleinen Blutgefäße wodurch die Funktion der Augen (diabetische Retinopathie), der Niere (diabetische Nephropathie) oder Nerven (diabetische Neuropathie) beeinträchtigt wird. Makrovaskuläre Schädigungen der Arterien führen außerdem zu kardiovaskulären Erkrankungen wie Herzinfarkten und Schlaganfällen. Diabetespatienten haben demnach ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko Herz-Kreislaufenerkrankungen zu entwickeln, als gesunde Personen (8, 10, 11).

## **1.2 Diabetische Nephropathie**

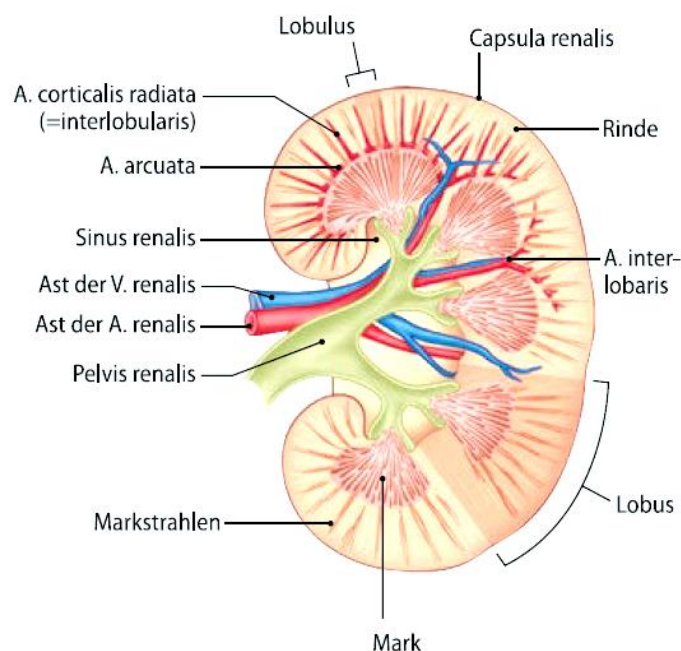
Die diabetische Nephropathie ist eine chronische Nierenerkrankung, die sich aufgrund eines langjährigen Diabetes mellitus entwickelt. Der fortschreitende Funktionsverlust des Organs führt im ungünstigsten Fall zu einer terminalen Niereninsuffizienz, die eine Dialyse-Therapie und Nierentransplantation notwendig macht. Bis zu 40 % der Diabetespatienten entwickeln im Laufe der Erkrankung eine DN (12) und 80 % der terminalen Niereninsuffizienzen werden durch Diabetes mellitus verursacht (5). Die diabetische Nephropathie ist deshalb die Hauptursache für Morbidität und Sterblichkeit bei Diabetes mellitus und stellt sowohl beim Typ-1 als auch Typ-2-Diabetes eine kritische Folgeerkrankung dar. Im Folgenden soll nun zunächst der Aufbau und die Funktion einer gesunden Niere näher erläutert werden.

## 1.2.1 Aufbau und Funktion der Niere

### Makroskopischer Aufbau der Niere

Die Niere ist neben Leber, Darm, Haut und Lunge das wichtigste Ausscheidungsorgan. Wasserlösliche Stoffwechselprodukte, wie Harnstoff oder Ammoniak, aber auch organische Fremdstoffe, wie Pharmaka, werden über den Harn ausgeschieden. Zusätzlich hat die Niere eine wichtige regulatorische Funktion. Durch Steuerung des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Base-Haushalts werden Volumen und chemische Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten kontrolliert. Des Weiteren werden in der Niere Hormone, wie Erythropoetin, Renin oder Calcitriol gebildet, weshalb die Niere ebenfalls Einfluss auf Blutbildung, Blutdruck und Knochenmineralisierung hat (13, 14).

Die beiden bohnenförmigen, etwa 10–14 cm langen Nieren liegen retroperitoneal beidseits der Wirbelsäule auf Höhe der oberen Lendenwirbel. Der makroskopische Aufbau einer Niere ist schematisch in Abbildung 1.1 dargestellt. Grundsätzlich lässt sich das funktionelle Nierengewebe (Nierenparenchym) in zwei Bereiche unterteilen, der äußeren Nierenrinde (*Cortex renalis*) und dem Nierenmark (*Medulla renalis*). Das Mark besteht aus 10–12 konisch zulaufenden Markpyramiden, deren Spitzen (Papillen) in die Nierenkelche ragen, welche sich zum Nierenbecken (*Pelvis renalis*) verbinden. Dort sammelt sich der gebildete Harn, der schließlich über den Harnleiter in die Blase geleitet wird (13, 14).

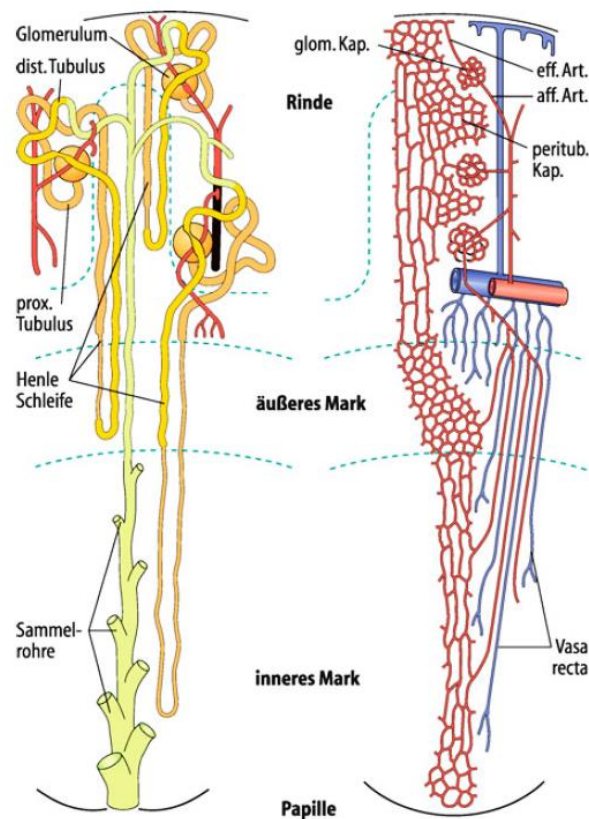


**Abbildung 1-1: Makroskopischer Aufbau der Niere.**

Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature Customer Service Centre GmbH (14).

### Mikroskopischer Aufbau der Niere

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, welches aus dem Nierenkörperchen (*Corpusculum renale*) und dem Tubulusapparat besteht. Das Nierenkörperchen besteht seinerseits aus dem Glomerulum, einem Knäuel aus Kapillarschlingen, und der umgebenen Bowman-Kapsel. Eine Niere besitzt etwa 1–1,5 Millionen dieser Nephrene. Die Glomeruli aller Nephrene befinden sich dabei in der Nierenrinde, die damit den am stärksten durchbluteten Bereich des Organs darstellt, während der Tubulusapparat teilweise bis in das innere Nierenmark hineinreicht (Abbildung 1.2).



**Abbildung 1-2: Aufbau eines Nephrons.**

Schematischer Aufbau eines Nephrons (links) und Darstellung der Blutgefäße in der Niere (rechts).

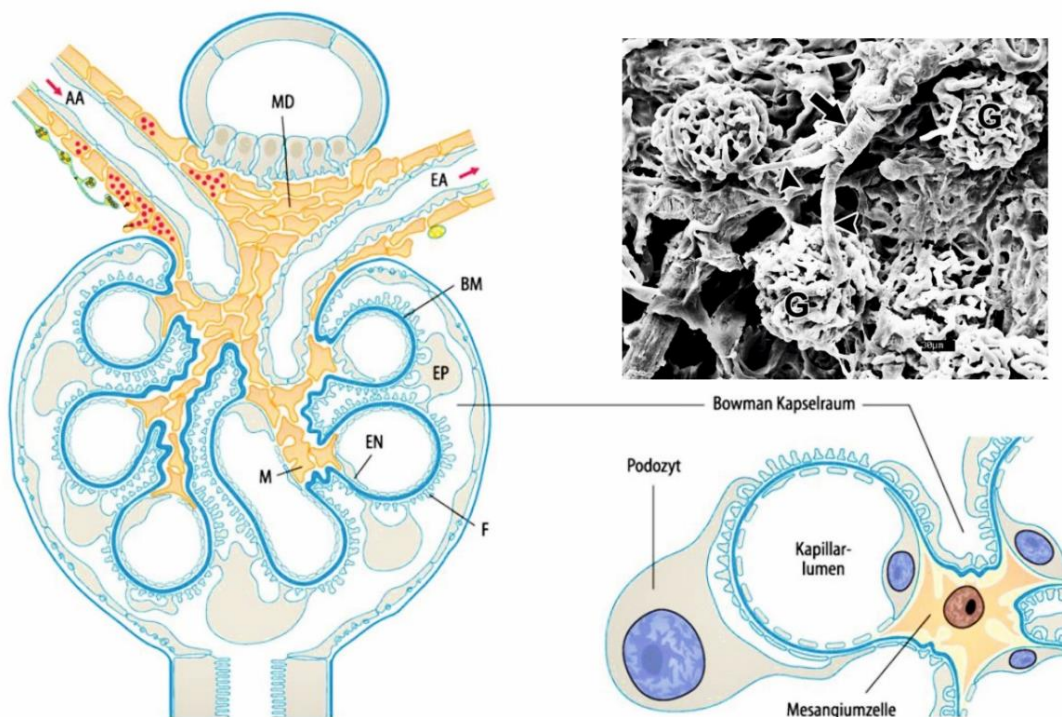
Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature Customer Service Centre GmbH (14).

Im Glomerulum findet die eigentliche Filtration des Blutes statt. Über die afferente Arteriole gelangt das Blut in die Kapillarschlingen. Etwa 20 % des Blutes wird dort über die aus drei Schichten aufgebaute Kapillarwand filtriert. Die innenliegende Schicht des glomerulären Filters besteht aus Endothelzellen, die 50–100 nm große Poren ausbilden (fenestriertes Endothel). Die Außenfläche der Kapillarwand wird von Podozyten mit ihren Fußfortsätzen be-

deckt. Diese sind über eine Schlitzmembran mit Poren von nur wenigen Nanometern Durchmesser, miteinander verbunden. Zwischen Endothel- und Podozytenschicht befindet sich außerdem eine negativ geladene Basalmembran (Abbildung 1.3).

Die geringe Porengröße des dreischichtigen Filters verhindert effektiv den Durchtritt von Blutzellen oder großen Molekülen ( $> 50\text{--}60\text{ kDa}$ ) in den Primärharn. Die negative Ladung verhindert zudem die Passage von den i. d. R. negativ geladenen Plasmaproteinen. Kleine Teilchen, wie Wasser, Elektrolyte, Glukose oder Kreatinin, können den Filter jedoch ungehindert passieren.

Der unfiltrierte Rest des Blutes, etwa 80 %, wird nach Passage der Kapillarschlingen über die efferente Arteriole drainiert. Durch Dilatation oder Konstriktion der afferenten bzw. efferenten Arteriole wird der Gefäßwiderstand und damit auch der Blutfluss und Filtrationsdruck im Glomerulum reguliert. Auf diese Weise wird die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) auch bei schwankendem Blutdruck über einen weiten Bereich konstant gehalten (13, 14, 16).



**Abbildung 1-3: Struktur eines Glomerulums.**

Schematischer Aufbau eines Glomerulums (links und rechts unten) und Elektronenmikroskopische Aufnahme von Glomeruli einer Rattenniere (rechts oben)

AA: Afferente Arteriole; EA: Efferente Arteriole; MD: Macula densa; BM: Basalmembran; M: Mesangialzellen; F: Fußfortsätze der Podozyten; EP: Epithelzelle; EN: Endothelzelle

Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature Customer Service Centre GmbH (14) und John Wiley and Sons (15)



Im nachgeschalteten Tubulusapparat wird der bei der glomerulären Filtration gebildete Primärharn weiter zum Endharn aufkonzentriert. Die einzelnen Abschnitte des Tubulusapparats, proximaler Tubulus, Henle-Schleife, distaler Tubulus und Sammelrohr, sind dafür aus unterschiedlichen Epithelzellen aufgebaut, die jeweils auf verschiedene Resorptions- und Sekretionsprozessen spezialisiert sind. Auf diese Weise werden am Ende 99 % der Flüssigkeit aus dem Primärharn rückresorbiert, zusammen mit physiologisch wichtigen Stoffen, wie Elektrolyte, Aminosäuren oder Glukose (13, 14, 16).

Im Urin eines gesunden Menschen finden sich deshalb nur geringe Mengen Protein und keine Glukose. Kommt es jedoch aufgrund einer Erkrankung zur Schädigung des glomerulären Filters, z. B. durch Entzündungsprozesse, gelangen auch größere Proteine in den Harn. Es wird dann von einer sogenannten glomerulären Proteinurie gesprochen. Die Konzentration von Albumin im Urin dient deshalb als wichtiger Marker bei der Diagnostik von Nierenschädigungen (17).

### Mesangialzellen

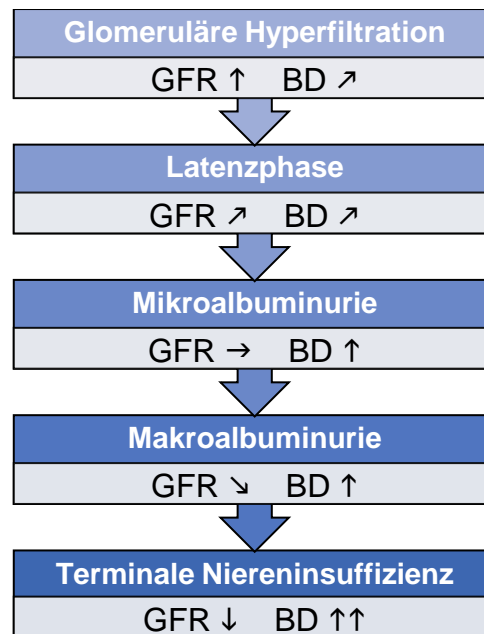
Neben Endothelzellen und Podozyten beinhaltet ein Glomerulum noch einen weiteren Zelltyp, die Mesangialzellen. Mesangialzellen haben zum einen eine wichtige Stützfunktion für das glomeruläre Kapillarknäuel, zum anderen spielen sie eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase der mesangialen Matrix, indem sie sowohl deren Bildung als auch den Abbau kontrollieren. Die extrazelluläre Matrix besteht aus verschiedenen Proteinen, wie Collagen IV, Fibronektin oder Laminin. Auch wenn Mesangialzellen anatomisch gesehen nicht zur glomerulären Kapillarwand gehören, nehmen sie aufgrund ihrer kontraktilen Eigenschaften dennoch direkt Einfluss auf die Filtration, indem sie den intraglomerulären Fluss und die zur Filtration zur Verfügung stehende Oberfläche regulieren. Des Weiteren zeichnen sich Mesangialzellen durch ihre phagozytotische Fähigkeit aus, die es ihnen ermöglicht, Makromoleküle und Immunkomplexe aufzunehmen und abzubauen (18).

## **1.2.2 Charakteristika der diabetischen Nephropathie**

Im Typ-1-Diabetes sind der Verlauf und die Charakteristika einer diabetischen Nephropathie eindeutig definiert. Im Typ-2-Diabetes hingegen kommen aufgrund der älteren Patientenzahl häufig Komorbiditäten, wie Bluthochdruck hinzu, die ebenfalls Einfluss auf die Nierenfunktion haben. Die Charakterisierung der Nierenschädigung allein aufgrund des Diabetes wird dadurch erschwert. Während Typ-1-Diabetiker erste Nierenschädigung häufig

erst 10 Jahre nach Diagnosestellung entwickeln, weisen etwa 3 % der Typ-2- Diabetiker bereits bei Erstdiagnose eine offenkundige Nephropathie auf (19, 20).

Nach Mogensen et al. kann der Verlauf der DN auf Grundlage der zunehmenden Albuminurie in fünf Stadien eingeteilt werden (Abbildung 1.4).



**Abbildung 1-4: Die fünf Stadien der diabetischen Nephropathie.**

Die Einteilung der einzelnen Abschnitte einer DN auf Grundlage der Albuminurie nach Mogensen et al. (21, 22). GFR: Glomeruläre Filtrationsrate; BD: Blutdruck

Die initiale Phase der DN zeichnet sich insbesondere beim Typ-1-Diabetes durch einen Anstieg der GFR und des glomerulären Kapillardrucks aus. In der nachfolgenden Latenzphase normalisiert sich die GFR häufig, klinisch sind noch keine Zeichen einer Nierenschädigung, wie etwa eine Albuminurie, erkennbar. Dennoch treten hier bereits erste Strukturveränderungen der Niere auf und es kommt zu einem moderaten Anstieg des Blutdrucks.

Im dritten Stadium können klinisch erstmals geringe Mengen Albumin im Urin festgestellt werden, eine sogenannte Mikroalbuminurie (Albuminausscheidung 30-300 mg/24 h). Mit fortschreitender Nierenschädigung steigen die Albuminkonzentrationen im Urin, bis im Stadium 4 von einer Makroalbuminurie (Albuminausscheidung im Urin >300 mg/24 h) gesprochen wird. Die GFR nimmt hier tendenziell ab, während der Blutdruck oft deutlich erhöht ist. Im letzten Stadium kommt es zur terminalen Niereninsuffizienz, die GFR sinkt dramatisch, die Konzentration harnpflichtiger Substanzen, wie Kreatinin oder Harnstoff im Blut

steigt deutlich an (Urämie). Es besteht eine erhöhte Morbidität und Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Komplikationen. Als Therapieoption bleibt nur noch eine lebenserhaltende Dialyse oder Nierentransplantation (21, 22).

Im Verlauf der Erkrankung kommt es zunehmend zu strukturellen Veränderungen in verschiedenen Bereichen des Nierengewebes. Die erste persistierende Veränderung ist die Verdickung der glomerulären und tubulären Basalmembran. Es folgt der Verlust des fenestrierten Endothels, Expansion der mesangialen Matrix und Schädigung der Podozyten. Im fortgeschrittenen Stadium führt dies zur charakteristischen nodulären Glomerulosklerose, auch als Kimmelstiel-Wilson-Syndrom bekannt. Des Weiteren kommt es zu tubulären Veränderungen, wie einer interstitiellen Fibrose, tubulären Atrophie, Entzündungsprozessen oder Arteriosklerose (23). Diese pathologischen Veränderungen in den Nieren von Typ-1-Diabetikern sind denen bei Typ-2-Diabetikern grundsätzlich sehr ähnlich, beim Typ-2-Diabetes sind diese aber deutlich heterogener und weniger vorhersehbar.

### **1.2.3 Aktuelle Therapiemöglichkeiten**

Eine zielgerichtete Therapie der diabetischen Nephropathie ist bis heute nicht möglich, weshalb vor allem die Prävention einen wichtigen Stellenwert einnimmt. Die zwei größten Risikofaktoren, die die Entwicklung einer DN fördern sind Hyperglykämie und Hypertonie (12).

Studien zeigten, dass die intensive Kontrolle des Blutzuckerspiegels, vor allem in den ersten Jahren der Erkrankung, einen bedeutenden positiven Effekt auf den langfristigen Krankheitsverlauf und die Entwicklung von Folgeerkrankungen, wie eine DN, hat (24, 25). Beim Typ-2-Diabetes sind verschiedene Wirkstoffe, die sogenannten Antidiabetika, zur medikamentösen Senkung des Blutzuckerspiegels zugelassen. Als Therapieziel wurde ein HbA<sub>1c</sub>-Wert zwischen 6,5–8,5 % (entspricht 48–69 mmol/mol Hb) festgelegt, Mittel der Wahl ist nach der aktuellen nationalen Versorgungsrichtlinie das Biguanid Metformin (26). Zu den neueren Antidiabetika zählen die SGLT (*sodium dependent glucose transporter*) 2-Inhibitoren, die über eine gesteigerte Glukosurie zur Senkung der Blutglukosewerte beitragen. Außerdem konnte in klinischen Studien ein protektiver Effekt, insbesondere des SGLT2-Inhibitors Empaglifozin, auf die Niere festgestellt werden (27, 28).

Zur Reduzierung des Blutdrucks werden sowohl beim Typ-1 als auch beim Typ-2-Diabetes als Standardtherapie Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), wie ACE (*angiotensin-converting enzyme*)-Hemmer oder Angiotensinrezeptorblocker (ARB),

eingesetzt. Der einzustellende Zielblutdruck ist dabei individuell zu bestimmen. Bei Patienten ohne Albuminurie sollte ein Blutdruck unter 140/90 mmHg erreicht werden, bei Patienten mit Albuminurie weniger als 130/80 mmHg (12). Des Weiteren konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Hemmung des RAS effektiv das Fortschreiten der DN verlangsamt (29–32).

Grundsätzlich verringern auch lebensstilmodifizierende Maßnahmen, wie eine Gewichtsnormalisierung, körperliche Aktivität, Nikotin- und Alkoholverzicht, sowie salz- und proteinarme Ernährung das Risiko für Nierenschädigungen (33).

Trotz intensiver Präventionsmaßnahmen bleibt das Risiko einer schwerwiegenden Nierenschädigung als Spätkomplikation einer Diabeteserkrankung bestehen.

Es bedarf deshalb auch zukünftig noch weitere Forschungsbemühungen, um eine geeignete, zielgerichtete Therapieoption für die DN zu finden.

## **1.3 Die NO/sGC/cGMP-Signalkaskade**

### **1.3.1 Signaltransduktion**

Mit der Entdeckung des Botenstoffs Stickstoffmonoxid (NO) und der Erforschung dessen physiologischer Bedeutung, begründeten die drei Forscher R. F. Furchgott, L. J. Ignarro und F. Murad ein neues Forschungsgebiet und wurden für ihre Arbeiten im Jahr 1998 mit dem Medizinnobelpreis ausgezeichnet.

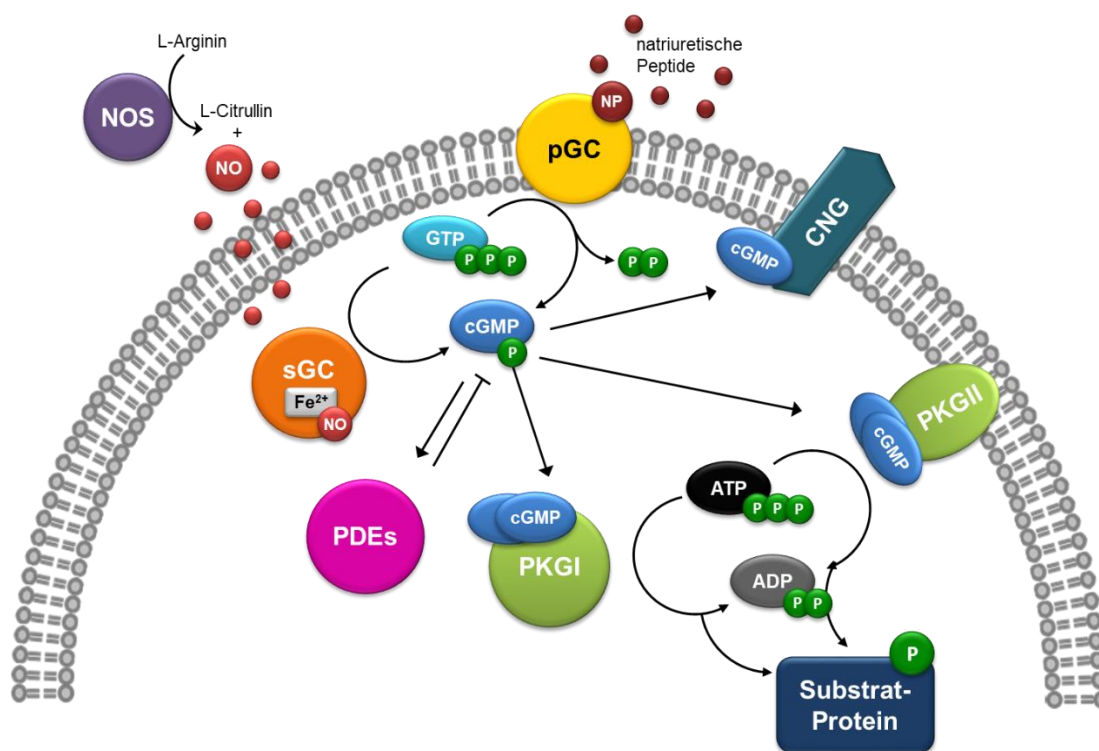
Das gasförmige Radikal NO wird endogen durch die Enzymfamilie der NO-Synthasen (NOS) gebildet, die aus den drei Isoformen endotheliale NOS (eNOS, NOS-III), induzierbare NOS (iNOS, NOS-II) und neuronale NOS (nNOS, NOS-I) besteht. Alle NO-Synthasen nutzen L-Arginin als Substrat und bilden unter Verbrauch von Sauerstoff und NADPH den Botenstoff NO und L-Citrullin. An dieser Reaktion sind außerdem die Co-Faktoren Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN) und Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) beteiligt (34).

Als Gas diffundiert NO frei durch die Zellmembranen und interagiert mit einer Vielzahl molekularer Zielstrukturen. Dabei stellt die lösliche Guanylylcyclase (sGC) den wohl bedeutendsten NO-Rezeptor dar. Durch die Bindung von NO an die Häm-Gruppe der  $\beta$ -Untereinheit des Heterodimers, wird die katalytische Umwandlung des Guanosin-5'-triphosphats (GTP) in das zyklische Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) stimuliert (35, 36). Der genaue Aufbau und die Funktionsweise der sGC werden in Kapitel 1.4.1 näher erläutert.

Neben der sGC kann auch die membranständige partikuläre Guanylylcyclase (pGC) die Synthese von cGMP ausgehend von GTP katalysieren. Insgesamt sind sieben verschiedene Isoformen der pGC (GC-A bis GC-G) bekannt, die durch Bindung verschiedener Peptide an die extrazellulären Domänen aktiviert werden. GC-A wird durch die natriuretischen Peptide (NP) ANP (atriales NP) und BNP (NP Typ B) aktiviert, GC-B durch CNP (NP Typ C). Weitere Liganden sind Guanylin und Uroguanylin die den GC-C-Rezeptor binden und aktivieren können (37).

cGMP ist ein bedeutender sekundärer Botenstoff, der in vielen verschiedenen Geweben und Zelltypen vorkommt und an der Regulation vieler zellulärer Prozesse beteiligt ist.

Die wichtigsten nachgeschalteten Zielstrukturen von cGMP sind die zyklische Nukleotid-aktivierten Kationenkanäle (CNG-Kanäle) (38), Phosphodiesterasen (PDEs) und die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKGI, PKGII). In Abbildung 1-5 ist der Signaltransduktionsweg ausgehend von NO schematisch dargestellt.



**Abbildung 1-5: Die NO/sGC/cGMP-Signalkaskade.**

Stickstoffmonoxid (NO) wird aus L-Arginin durch die NO-Synthasen (NOS) gebildet und bindet an die Häm-Gruppe der löslichen Guanylylcyclase (sGC). Die aktivierte sGC katalysiert daraufhin die Synthese des zyklischen Guanosin-3'5'-Monophosphats (cGMP) aus Guanosin-5'-Triphosphat (GTP). Die partikuläre Guanylylcyclase (pGC) katalysiert nach Aktivierung durch die natriuretischen Peptide (NP) ebenfalls die Bildung von cGMP. Der Botenstoff cGMP stimuliert die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKGI bzw. PKGII), die nachfolgend verschiedene Substratproteine durch Phosphorylierung regulieren. Weitere Zielstrukturen von cGMP sind die Phosphodiesterasen (PDEs) und die zyklische Nukleotid-aktivierten Kationenkanäle (CNG).

### 1.3.2 Phosphodiesterasen

Phosphodiesterasen sind die einzigen Enzyme, die in der Lage sind 3'-5'-zyklische Nukleotide, wie cGMP oder cAMP abzubauen und regulieren so die intrazelluläre Konzentration und die Signaltransduktion dieser Botenstoffe. PDEs katalysieren die hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindung der cNMPs, die dadurch in die biologisch inaktiven 5'-Monophosphate umgewandelt werden. In Säugetieren konnten bisher 21 PDE-codierende Gene identifiziert werden. Durch alternatives Spleißen entsteht eine große Zahl an Isoformen, die elf verschiedenen Familien (PDE1 bis PDE11) zugeordnet werden. Die einzelnen Enzyme unterscheiden sich dabei in der Substratspezifität, ihrer Struktur, der intrazellulären Lokalisation und der Verteilung in den einzelnen Geweben. Alle PDEs besitzen eine konservierte C-terminale katalytische Domäne, während die regulatorische N-terminale Domäne zwischen den einzelnen Isoformen variiert und so die Eigenschaften der jeweiligen katalytischen Domäne, wie die Substratspezifität beeinflussen kann. Die PDEs 5, 6 und 9 zeigen eine hohe cGMP-Spezifität, während es sich bei den PDEs 4, 7 und 8 um cAMP-spezifische PDEs handelt. Die PDEs 1, 2, 3, 10 und 11 sind in der Lage beide zyklischen Nukleotide zu hydrolysieren (39, 40).

Die Aktivität der PDEs kann u. a. durch Bindung der zyklischen Nukleotide reguliert werden. So wird die cAMP-Hydrolyseaktivität der PDEs 2 und 3 durch cGMP gesteuert, indem cGMP die PDE2 stimuliert und die PDE3 inhibiert. Der Botenstoff cGMP nimmt so einen direkten Einfluss auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration, es findet ein sogenannter *Cross-Talk* zwischen den zwei Signalkaskaden statt (41). In Thrombozyten wurde gezeigt, dass die PDE5 direkt durch die Bindung von cGMP und indirekt durch Phosphorylierung durch die PKGI aktiviert werden kann, wodurch ein sogenannter Feedback-Mechanismus generiert wird, mit dem das cGMP-Signal kontrolliert werden kann (42).

Als Regulatoren der cGMP-Konzentration in der Zelle, stellen die PDEs interessante therapeutische Angriffspunkte innerhalb der NO/sGC/cGMP-Signalkaskade dar. Mittlerweile wurden für nahezu alle bekannten PDEs spezifische und weniger spezifische Inhibitoren entwickelt, von denen es einige bis zur Marktzulassung geschafft haben (40). Zu den klinisch bedeutendsten gehören sicherlich die Hemmstoffe der cGMP-spezifischen PDE5, wie Sildenafil oder Tadalafil zur Behandlung der erektilen Dysfunktion oder der pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) (43–46). Weitere zugelassene PDE-Inhibitoren sind z. B. Milrinon (PDE3-Inhibitor) bei Herzinsuffizienz (47), Ampremilast (PDE4-Inhibitor) bei Psoriasis oder Papaverin (PDE10A-Inhibitor) bei Vasospasmus und erektiler Dysfunktion (48).

### 1.3.3 cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen stellen die Haupteffektoren des Signalmoleküls cGMP dar. Die PKGI und PKGII gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und werden durch die Gene *prkg1* und *prkg2* codiert (49). Durch alternatives Spleißen werden von der PKGI zwei Isoformen exprimiert, die PKGI $\alpha$  und PKGI $\beta$  (50). Während die beiden PKGI-Isoformen als lösliche Kinasen im Zytosol lokalisiert sind, liegt die PKGII an der Zellmembran verankert vor (51). Die PKGs sind grundsätzlich aus zwei funktionellen Domänen aufgebaut, einer regulatorischen und einer katalytischen. Die C-terminale katalytische Domäne beinhaltet je eine Bindungsstelle für das Substrat und Adenosin-5'-trihydrogenetriphosphat (ATP) und katalysiert die Phosphatübertragung auf das Zielprotein. Die regulatorische Untereinheit besteht einerseits aus einer N-terminalen Domäne mit einem Leucin-Zipper-Motiv, welches für die Homodimerisierung des Proteins relevant ist und einer autoinhibitorischen Domäne, welche die Aktivierung des katalytischen Zentrums kontrolliert. Des Weiteren beinhaltet die regulatorische Untereinheit eine cGMP-Bindedomäne mit jeweils einer hochaffinen und einer niedrigaffinen cGMP-Bindetasche. Die Bindung von cGMP führt zu einer Konformationsänderung der PKGs, wodurch die autoinhibitorische Domäne aus dem katalytischen Zentrum entfernt und die Phosphorylierung des Substratproteins ermöglicht wird (52).

Die PKGs werden üblicherweise in unterschiedlichen Geweben exprimiert und sind dort an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt. Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP), welches ubiquitär exprimiert wird, kann durch beide PKGI-Isoformen spezifisch am Ser-239 phosphoryliert werden, wodurch beispielsweise Vorgänge des Aktin-Zytoskeletts oder des Vesikel-Transports reguliert werden (53, 54). Die Untereinheit der Myosin Phosphatase MYPT1 (*Myosin Phosphatase targeting Untereinheit 1*) ist ein spezifisches Substrat der PKGI $\alpha$  und reguliert die Interaktion zwischen Aktin und Myosin (55). Das IP<sub>3</sub>-Rezeptor-assoziierte cGMP-Kinasesubstrat (IRAG1) interagiert hingegen spezifisch mit der PKGI $\beta$ . IRAG1 spielt unter anderem eine wichtige regulatorische Rolle bei der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung im kardiovaskulären System (56) oder bei der Inhibition der Thrombozytenaggregation (57). Als PKGII spezifisches Substrat wurde der Transkriptionsfaktor SOX9 identifiziert, der an der Differenzierung der Chondrozyten beteiligt ist (58).

### 1.3.4 Physiologische Bedeutung der NO-Signalkaskade in der Niere

Am besten untersucht ist die Rolle der NO/ sGC-Signalkaskade im kardiovaskulären System. NO wirkt als Vasodilatator und steuert so den Tonus glatter Gefäßmuskelzellen und damit auch den Blutdruck (59). In Thrombozyten führt die Aktivierung des NO-Signalwegs zur Inhibition der Thrombozytenaggregation (60). NO spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der neuronalen Signaltransduktion (61), aber auch bei Entzündungsprozessen (62). Außerdem hat die NO/sGC/cGMP-Signalkaskade bei der Regulation der Nierenfunktion eine grundlegende Bedeutung. Der durch NO vermittelte vasodilatative Effekt nimmt auch Einfluss auf den renalen Blutfluss. So führen erhöhte cGMP-Spiegel beispielsweise zur Relaxation der afferenten bzw. efferenten Arteriole, wodurch sich die glomeruläre Filtrationsrate ändert. Eine dauerhafte Inhibition des NO/cGMP-Systems führt zur Hypertonie der glomerulären Kapillaren, Schädigung der Glomeruli und schließlich zur Proteinurie (63).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das NO/cGMP-System im Glomerulum eine Art Gegenspieler zum RAAS darstellt, welches durch Vasokonstriktion zu einer Blutdrucksteigerung in den Kapillaren führt (64, 65).

Renin, das Schlüsselenzym des RAAS, wird von den Zellen des juxtaglomerulären Apparats (JGA) gebildet und sezerniert. Sowohl die Synthese, als auch die Freisetzung des Renins sind komplexen physiologischen Kontrollmechanismen unterworfen. cGMP kann die Reninfreisetzung stimulieren aber auch inhibieren. So wird die Renin-Sekretion gesteigert, indem die PDE 3-abhängige Hydrolyse von cAMP durch NO/cGMP gehemmt wird (66, 67). Auf der anderen Seite wird die Renin-Sekretion durch Aktivierung der PKGII gehemmt (68). In einer aktuellen Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass bei der akuten Regulation der Renin-Freisetzung sowohl PKGII als auch PKGI beteiligt sind (69).

Der tubuloglomeruläre Feedbackmechanismus (TGF) regelt die glomeruläre Filtration eines einzelnen Nephrons. Osmosensorische Zellen der Macula densa messen mit Hilfe des Na-K-2Cl-Symporters (NKCC2) kontinuierlich die Natrium- und Chloridionenkonzentration im Lumen des distalen Tubulus. Bei erhöhten Konzentrationen kommt es zu einer Vasokonstriktion der afferenten Arteriole und in Folge zu einer Verringerung der GFR, während niedrige NaCl-Konzentrationen zu einer Dilatation des Gefäßes führen und damit zu einer Steigerung der GFR. NO, welches hauptsächlich durch NO-Synthasen in den Zellen der Macula densa gebildet wird, ist in der Lage cGMP-abhängig den TGF zu verringern, wodurch es zur Abschwächung der prä-glomerulären Vasokonstriktion kommt (70–72).

Die Regulierung des Wasser- und Salzhaushalts gehört zu den Hauptaufgaben der Niere und der Einfluss der NO/cGMP-Signaltransduktion darauf ist bisher noch wenig verstanden.



Funktionale *in vivo*-Studien haben hier einen allgemein inhibitorischen Effekt von NO auf die Na<sup>+</sup>-Transporter des proximalen Tubulus, wie den apikalen Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter NHE3, die basolaterale Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase und den Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Kotransporter gezeigt (73).

## 1.4 sGC als pharmazeutisches Target

### 1.4.1 Struktur und physiologische Aktivierung der sGC

Die im Zytosol vorliegende NO-sensitive sGC ist ein Heterodimer bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit und ist auch nur als Heterodimer enzymatisch aktiv (74, 75). Insgesamt sind vier verschiedene sGC-Untereinheiten bekannt ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ), am weitesten verbreitet ist jedoch die ubiquitär vorkommende  $\alpha_1/\beta_1$ -Isoform. Jede Untereinheit ist ähnlich aufgebaut und besteht aus einer N-terminalen Häm-bindenden H-NOX (*heme nitric oxide and oxygen binding*)-Domäne, einer Per-ARNT-Sim (PAS)-Domäne, einer Coiled-Coil (CC)-Domäne und einer C-terminalen katalytischen Domäne. Die PAS- und CC-Domäne vermitteln unter anderem die zur Dimerisierung notwendigen Protein-Protein-Interaktionen, während die katalytische Domäne zuständig für die cGMP-Synthese aus GTP ist (76, 77). Für diese Umwandlung wird Mg<sup>2+</sup> als Kofaktor benötigt, um die Komplexierung des GTPs an die C-terminale Region zu ermöglichen (78).

Jedes sGC-Heterodimer enthält eine Hämgruppe, die über das His-105 der  $\beta_1$ -Untereinheit gebunden ist (79). Durch die Bindung von NO kommt es zunächst zur Ausbildung eines sechsfach-koordinierten Häm-Nitrosyl-Komplexes. Durch die anschließende Spaltung der proximalen Histidin-Häm-Bindung entsteht ein penta-koordinierter Häm-Nitrosyl-Komplex. Dieser Prozess geht einher mit einer Konformationsänderung der sGC, die zu einer 100–400-fach erhöhten katalytischen Aktivität des Enzyms führt (80). Das Vorhandensein der Häm-Gruppe ist dabei unerlässlich für die Aktivierung der sGC durch NO (81).

Neben NO ist auch Kohlenmonoxid (CO) in der Lage an das Häm der sGC zu binden und diese zu aktivieren. Hierbei bildet sich ein sechsfach-koordinierter Häm-Carbonyl-Komplex aus. Die enzymatische Aktivität der sGC wird dabei allerdings nur um das 2–4-fache erhöht (82). Im Gegensatz zu anderen Proteinen, die eine H-NOX-Domäne besitzen, wie das Hämoglobin oder Myoglobin, kann das sGC-Häm kein O<sub>2</sub> binden. Diese Eigenschaft der sGC ist wichtig, um als NO-Sensor auch unter aeroben Bedingungen im humanen Gewebe zu funktionieren (83).

### 1.4.2 Pharmakologische Aktivierung der sGC

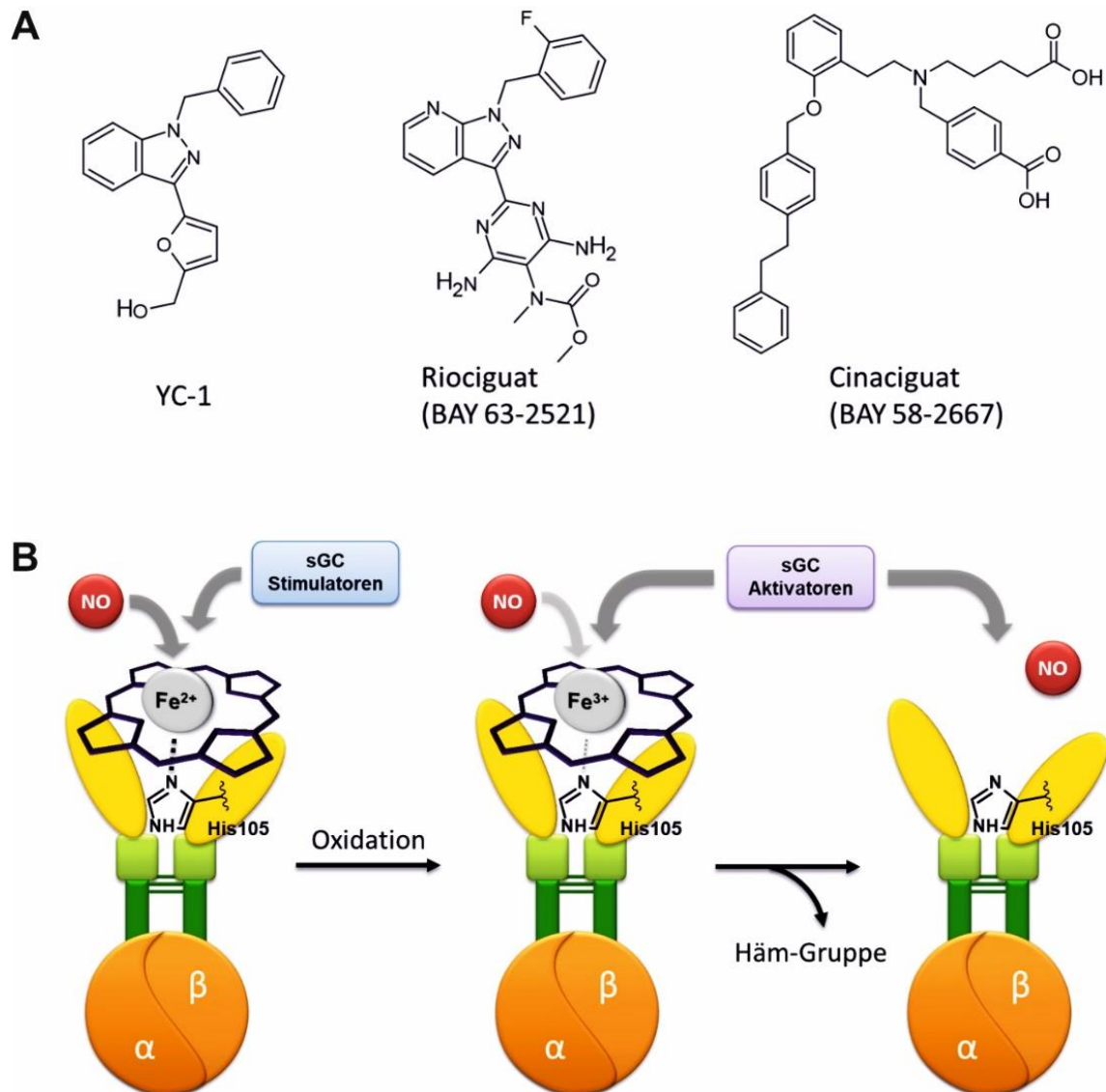
Wie bereits im vorangegangenen Kapitel 1.3.3 beschrieben, wird eine dysfunktionale NO/sGC/cGMP-Signalkaskade mit einer Vielzahl an Krankheitsbildern in Verbindung gebracht. Unter bestimmten pathologischen Bedingungen kommt es zu einer vermehrten Synthese von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Dieser oxidative Stress führt zu einer verringerten Bioverfügbarkeit von NO und zur Oxidation des zentralen Eisen (II)-Kations der Hämgruppe in der sGC. Dieser oxidierte Eisen (III)-Komplex ist insensitiv gegenüber NO und zeigt eine schwächere Bindung an den His-105-Rest im Enzym. Als Folge verliert die sGC ihre prosthetische Häm-Gruppe (Abbildung 1-6 B) und wird schließlich durch Ubiquitin enzymatisch abgebaut (84–86).

Über viele Jahrzehnte wurden organische Nitrate, wie Nitroglycerin, Isosorbiddinitrat oder Isosorbidmononitrat aufgrund ihrer gefäßerweiternden Wirkung zur Behandlung der Angina pectoris oder akuter Herzinsuffizienz eingesetzt. Bis heute spielen NO-Donoren eine wichtige Rolle bei der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen (87). Allerdings zeigen diese Substanzen auch eine Reihe von Nachteilen. Ein Hauptproblem stellt die Entwicklung einer Tachyphylaxie, der sogenannten Nitrattoleranz und einer NO-Resistenz bei Langzeitanwendung dar (88). Des Weiteren kann das freigesetzte NO mit ROS reagieren, wodurch Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) entsteht, welches zu Gewebeschädigungen führt (89).

Diese Einschränkungen führten schließlich zur Entwicklung einer neuen pharmakologischen Wirkstoffklasse, den NO-unabhängigen sGC-Stimulatoren. Im Jahr 1994 wurde die Benzylindazol-Verbindung YC-1 veröffentlicht, die durch Stimulation der cGMP-Synthese aggregationshemmend auf Thrombozyten wirkt (90). Erst etwas später stellte sich heraus, dass es sich dabei, um einen direkten NO-un- aber Häm-abhängigen sGC-Stimulator handelt (91). Aufgrund ihrer geringen Wirksamkeit und Selektivität waren die ersten sGC-Stimulatoren noch nicht dazu geeignet, diese in klinischen Studien einzusetzen. Durch konsequente Weiterentwicklung konnten schließlich eine Reihe neuer potentieller Wirkstoffe erhalten werden. Riociguat (BAY 63-2521) war der erste sGC-Stimulator, der an Patienten mit pulmonaler Hypertonie (PH) in einer klinischen Studie getestet wurde und schließlich auch zur Behandlung der PH zugelassen wurde (92).

sGC-Stimulatoren binden sehr wahrscheinlich an die  $\alpha$ -Untereinheit der sGC und erhöhen so die katalytische Aktivität des Enzyms auch in Abwesenheit von NO, weshalb sie als NO-unabhängig bezeichnet werden. Außerdem zeigen sGC-Stimulatoren einen synergistischen Effekt mit NO, wenn dieses bereits an die Häm-Gruppe gebunden ist, indem sie die NO-

Häm-sGC-Bindung stabilisieren (93). Unter oxidativem Stress, der zur Oxidation der sGC führt, verlieren sGC-Stimulatoren allerdings ihre Wirksamkeit (Abbildung 1-6).



**Abbildung 1-6: Pharmakologische Aktivierung der sGC.**

**A:** Chemische Strukturformeln der sGC-Stimulatoren YC-1 und Riociguat, sowie des sGC-Aktivators Cinaciguat.

**B:** Die prosthetische Häm-Gruppe mit einem Eisen (II)-Zentralion ist über den His-105-Rest an die β-Untereinheit der sGC gebunden. sGC-Stimulatoren können diese NO-unabhängig aktivieren. Durch Oxidation des Eisens wird die Bindung an den His-105-Rest geschwächt, in Folge kommt es zum Verlust des Häms. Nur sGC-Aktivatoren sind in der Lage diese apo-sGC zu aktivieren.

Mit Hilfe eines Hochdurchsatz-Screenings wurde unerwartet die Substanzklasse der Aminocarbonsäuren entdeckt, die ebenfalls in der Lage ist die sGC zu aktivieren. Durch weitere chemische Optimierung wurde schließlich die Substanz Cinaciguat (BAY 58-2667) erhalten (Abbildung 1-6 A). Cinaciguat war in der Lage die sGC ebenfalls NO-unabhängig zu stimulieren. Im Gegensatz zu den bereits bekannten sGC-Stimulatoren, konnte Cinaciguat die sGC aber auch nach Oxidation durch O<sub>2</sub>Q und nach Verlust der Häm-Gruppe effektiv aktivieren (94). Verbindungen, die die sGC NO- und Häm-unabhängig aktivieren können, werden als sGC-Aktivatoren bezeichnet. Cinaciguat bindet direkt in der Häm-Bindetasche des Häm-freien apo-sGCs, ohne eine kovalente Bindung mit dem His-105 einzugehen. Die Bindung des sGC-Aktivators verursacht eine ähnliche Konformationsänderung der sGC, wie die Bindung von NO an das Häm, wodurch die sGC aktiviert wird (95). Außerdem wird vermutet, dass Cinaciguat das oxidierte Häm aus seiner Bindetasche verdrängen kann (96, 97).

### **1.4.3 Therapeutische Anwendungen von sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren**

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, reguliert der sekundäre Botenstoff cGMP die Funktion verschiedenster Zelltypen, wie beispielsweise der Fibroblasten, glatter Muskelzellen, Kardiomyozyten oder Neuronen. Entsprechend sind Störungen des NO/sGC/cGMP-Signalwegs auch mit einer Vielzahl unterschiedlicher Krankheiten verknüpft. Die Aktivierung dieser Signalkaskade mit sGC-Modulatoren stellt somit eine vielversprechende Therapiestrategie dar. Im Folgenden soll ein kurzer Einblick in die derzeitigen Anwendungsmöglichkeiten von sGC-Modulatoren als Therapeutika gegeben werden.

Mit Riociguat (BAY 63-2521) wurde im Jahr 2013 der erste sGC-Stimulator zur Behandlung der PAH und chronisch thromboembolischen pulmonalen Hypertonie (CTEPH) zugelassen. In klinischen Placebo-kontrollierten Phase 3-Doppelblindstudien war Riociguat in der Lage die körperliche Belastungsfähigkeit der untersuchten Patienten signifikant zu verbessern. Außerdem verringerten sich unter der Therapie mit dem sGC-Stimulator der Gefäßwiderstand in der Lunge und der Blutdruck in der Lungenarterie, sowie der Herzinsuffizienzmarker NT-proBNP (98, 99).

Als zweiter sGC-Stimulator wurde in diesem Jahr nach erfolgreicher Phase III-Studie Vericiguat (BAY 1021189) von der U.S.-amerikanischen Gesundheitsbehörde FDA (*Food and Drug Administration*) zur Behandlung der symptomatischen chronischen Herzinsuffizienz und verminderter Ejektionsfraktion (HFREF) zugelassen. Die Therapie mit Vericiguat soll

das Risiko für kardiovaskulären Tod oder Hospitalisierung wegen Herzversagens bei Patienten mit HFrEF senken (100).

Auch bei Erkrankungen der Niere gibt es vielversprechende Daten zur Wirksamkeit von sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren. In verschiedenen prä-klinischen Modellen der Nierenfibrose, diabetischen Nephropathie oder akuten glomerulären Nephritis führte die Behandlung mit sGC-Stimulatoren oder -Aktivatoren zu einer verringerten Albuminurie, reduzierten renalen Glomerulosklerose und einer Abnahme von Fibrose und Fibrosemarkern (101, 102). Pralicyguat (IW-1973) ist der erste sGC-Stimulator, der in einer klinischen Studie zur Behandlung der diabetischen Nephropathie bei Typ-2-Diabetikern getestet wurde. In der 12-wöchigen, placebokontrollierten Phase II-Studie konnte zwar der primäre Endpunkt, die signifikante Verringerung der Albuminurie im Vergleich zur Placebogruppe, nicht ganz erreicht werden, dennoch konnte eine Reduktion der Albuminurie beobachtet werden. Außerdem wurde von positiven Effekten auf Blutdruck, Cholesterinspiegel und den HbA1c-Werten berichtet (103).

Weitere klinische und prä-klinische Studien untersuchten den Nutzen der pharmakologischen sGC-Aktivierung bei der Behandlung von beispielsweise der Leberzirrhose (104), der Duchenne Muskeldystrophie (105), der Achalasie (106), dem Glaukom (107) oder der Sichelzellanämie (108). Auch hier zeigte sich, dass die Gabe von sGC-Modulatoren einen vielversprechenden Therapieansatz darstellt.

Bisher haben es nur sGC-Stimulatoren bis zur Marktzulassung geschafft, die Entwicklung von sGC-Aktivatoren ist weniger weit fortgeschritten. Mehrere Projekte mit sGC-Aktivatoren in der Phase II-Prüfung mussten vorzeitig eingestellt werden. Auch eine Phase IIb-Studie zur Behandlung von akut dekompensierter Herzschwäche mit Cinaciguat wurde aufgrund starker blutdrucksenkender Effekte und keinem deutlich erkennbaren klinischen Nutzen frühzeitig beendet (109, 110).

Aufgrund der vielseitigen potentiellen Einsatzmöglichkeiten der sGC-Modulatoren, wird intensiv an der Weiterentwicklung dieser Wirkstoffklasse gearbeitet. Es befindet sich eine Vielzahl neuer Substanzen in der Entwicklungspipeline, weshalb auch in der Zukunft mit weiteren Therapiemöglichkeiten zu rechnen ist (111).

## 1.5 Mausmodelle zur Untersuchung der DN

Eine Vielzahl an Tiermodellen wurde zur Erforschung des Diabetes mellitus und seiner Folgeerkrankungen geschaffen. Besonders häufig wurden dafür Nagetiere, vor allem Mäuse und Ratten eingesetzt, da diese im Vergleich zu anderen Tiermodellen einige Vorteile aufweisen. So ist die Haltung der Nager vergleichsweise platzsparend und kostengünstig, sie weisen eine kurze Reproduktionszeit auf und ihr Genom ist bereits vollständig entschlüsselt und lässt sich relativ einfach manipulieren.

Das AMDCC (*Animal Models of Diabetic Complications Consortium*) hat bereits Anfang der 2000er Kriterien festgelegt, die ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der DN aufweisen sollte (Tabelle 1-1).

**Tabelle 1-1: Kriterien für Mausmodelle zur Erforschung der DN (112).**

<b>Funktionale Charakteristika</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• &gt;10-fach erhöhte Albuminurie</li> <li>• &gt;50 %-ige Verringerung der GFR</li> <li>• Systemischer Bluthochdruck</li> </ul>
<b>Nierenpathologie</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fortgeschrittene Expansion der mesangialen Matrix</li> <li>• Arteriosklerose</li> <li>• Verdickung der glomerulären Basalmembran um &gt;50 %</li> <li>• Tubulointerstitielle Fibrose</li> </ul>

Da die DN als Spätfolge eines Diabetes mellitus auftritt, besteht der erste maßgebende Schritt im Tiermodell in der Induktion einer chronischen Hyperglykämie und/oder Insulinresistenz. Dazu wurden, je nach Fragestellung, eine Reihe von Standardprotokollen etabliert. Eine gängige Methode um einen Typ-1-DM zu induzieren ist beispielsweise die Gabe von Streptozotocin (STZ), welches toxisch auf die Betazellen des Pankreas wirkt (113). Dieses Modell lässt sich einfach umsetzen und kann bei unterschiedlichsten, bereits genetisch veränderten Tieren angewendet werden. Allerdings wurde auch gezeigt, dass STZ unspezifisch Nierenschädigungen hervorrufen kann (114). Die NOD (*non-obese diabetic*)-Maus hingegen entwickelt aufgrund genetischer Veränderungen einen Typ-1-DM, durch eine spontan auto-immuninduzierte Zerstörung der Inselzellen (115).

Ein weit verbreitetes Modell des Typ-2-DM stellen Mäuse dar, die einen genetischen Defekt im Leptin-Rezeptor (*db/db*) oder direkt im Leptin (*ob/ob*) aufweisen. Diese Tiere nehmen rasch an Gewicht zu und werden bereits im jungen Alter adipös und hyperglykämisch (116). Auch wenn mit diesen klassischen Verfahren typische diabetische Charakteristika hervorgehoben werden können, so ist die Niere in diesen Modellen oftmals nur wenig beeinträchtigt. Durch Weiterentwicklung dieser Standardmethoden wurden neue Tiermodelle entwickelt, die deutlich ausgeprägtere Eigenschaften der humanen Nierenerkrankung aufweisen.

Als sehr erfolgsversprechende Strategie hat sich die zusätzliche Deletion der eNOS erwiesen. Die reduzierte Verfügbarkeit von NO fördert Bluthochdruck und endotheliale Dysfunktion und damit auch die beschleunigte Entwicklung einer DN. Durch Kreuzung von eNOS-KO Mäusen mit *db/db*-Tieren mit C57BLKS/J-Hintergrund, entstand eine Mauslinie, die hypertensiv ist, einen beträchtlichen Anstieg der Albuminurie aufweist und deutliche histopathologische Veränderungen der Niere, ähnlich einer humanen DN, zeigt (117). Auch im STZ-Modell führt der zusätzliche Knockout der eNOS zu weitreichenden Nierenveränderungen, die typisch für eine DN sind (118, 119).

Bluthochdruck spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der humanen DN. Auch in murinen Modellen konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus Diabetes und genetisch bedingter Hypertonie zu einer ausgeprägteren Albuminurie, Glomerulosklerose und tubulointerstitiellen Fibrose führt, wie bei Diabetes alleine. Deshalb haben Forscher eine transgene Mauslinie entwickelt, bei denen das RAAS chronisch aktiviert ist. In TTRhRen-Mäusen wird ein modifiziertes, humanes Renin unter Kontrolle des Transthyretin-Promotors überexprimiert, was zu Bluthochdruck führt. Durch Kreuzung mit der OVE26 Linie, die aufgrund der Überexpression von Calmodulin in den  $\beta$ -Zellen kein Insulin produzieren kann, entsteht ein Mausmodell, das die typischen Nierenschädigungen einer DN aufweist (120).

Die BTBR *ob/ob*-Maus ist ein weiteres, häufig genutztes Typ-2-Diabetes Mausmodell. Die Kombination der BTBR (*black and tan, brachyuric*)-Mauslinie, die eine natürliche Insulinresistenz aufweist, mit der *ob/ob*-Leptinmutation führt zu Tieren, die sehr schnell pathologische Nierenveränderungen ausbilden, die der humanen DN sehr ähnlich sind (121).

Grundsätzlich spielt bei allen Mausmodellen der genetische Hintergrund der verwendeten Stämme eine bedeutende Rolle. So wurde gezeigt, dass der C57BL/6-Stamm unabhängig von dem experimentellen Mausmodell, eher resistent gegenüber der Ausbildung von Albuminurie und anderer histopathologischen Veränderungen der Niere sind, während der 129-, FVB- oder DBA/2-Stamm deutlich sensitiver reagieren (122). Auch beim Menschen

konnte festgestellt werden, dass verschiedene genetische Faktoren das Entstehungsrisiko einer DN beeinflussen (123).

Trotz vieler Bemühungen und den zahlreichen bereits etablierten Modellen, ist es bis heute nicht gelungen, ein Tiermodell zu entwickeln, welches alle pathophysiologischen Aspekte einer humanen diabetischen Nephropathie abbildet (124). Bei der Interpretation der Daten, die mit solchen Tierversuchen generiert wurden, sollten die jeweiligen Einschränkungen des Modells deshalb immer mit berücksichtigt werden.

## **1.6 Ziele der Arbeit**

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben steht bis heute keine zielgerichtete Therapie zur Behandlung der diabetischen Nephropathie zur Verfügung. Bisherige Behandlungsmethoden beschränken sich allein auf präventive Maßnahmen und eine Verlangsamung der Krankheitsprogression. Diabetes mellitus gilt immer noch als Hauptursache dafür, dass Menschen dialysepflichtig werden (6). Von den mehr als 7000 Patienten, die im Jahr 2020 auf der Warteliste für eine Nierentransplantation standen, wies etwa die Hälfte einen Diabetes oder Prädiabetes auf (125).

Die NO/sGC/cGMP-Signalkaskade spielt in der Pathophysiologie der Niere eine wichtige Rolle (126). In prä-klinischen und klinischen Studien konnte die Gabe von sGC-Modulatoren den Krankheitsverlauf einer diabetischen Nephropathie positiv beeinflussen (Kapitel 1.4.3). In dieser Arbeit sollte deshalb der sGC-Aktivator Cinaciguat als mögliche Therapieoption in einem Typ-1-DM Mausmodell der diabetischen Nephropathie untersucht werden. Anhand typischer Marker wie die Albuminurie, GFR und Kreatinin, sowie immunhistologischer Untersuchungen der Niere sollte gezeigt werden, ob Cinaciguat einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat. Dabei sollte zudem insbesondere die NO/sGC/cGMP-Signalkaskade genauer analysiert werden, sowie die Expressionsänderung der einzelnen Proteine unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen.

Als Produzenten der extrazellulären Matrix in den Glomeruli, haben Mesangialzellen einen großen Einfluss auf die pathologischen Veränderungen in der Niere. Deshalb sollten in dieser Arbeit zusätzlich die Mesangialzellen anhand eines geeigneten Zellkulturmodells näher untersucht werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Standardlaborchemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von folgenden Firmen bezogen: Merck KGaA, DE; Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE; Carl Roth GmbH & Co, DE; Fluka Chemie GmbH, DE; Sarstedt AG & Co. KG, DE; VWR International, USA.

Spezialchemikalien und wichtige Verbrauchsmaterialien sind im Folgenden tabellarisch aufgelistet (Tabelle 2-1).

**Tabelle 2-1: Verwendete Spezialchemikalien und Verbrauchsmaterialien.**

Produkt	Hersteller
8-Br-cGMP Natriumsalz	BIOLOG Life Science Institute, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	VWR Life Science, USA
Bio-Rad DC Protein Assay (Lowry)	Bio-Rad Laboratories GmbH, DE
Blutzuckermesstreifen, CONTOUR® XT Sensoren	Bayer AG, DE
Bovines Serumalbumin (BSA)	Gerbu Biotechnik GmbH, DE
Cinaciguat Hydrochlorid (BAY 58-2667)	AxonMedChem, Niederlande
Cinaciguat-Futter (15 mg/kg in Standardfutter)	ssniff Spezialdiäten GmbH, DE
Clarity™ Western ECL Substrate (Luminol, Peroxid-Lösung)	Bio-Rad Laboratories, USA
Collagenase A	Roche Diagnostics GmbH, DE
Dako Glycergel® Mounting Medium	Agilent, USA
Deckgläser, Borosilikat; Dicke: 1; 24 x 50 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, DE
DePeX Mounting Medium	SERVA Electrophoresis GmbH, DE
Direct Red 80	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE
DNA Gel Loading Dye (6×)	ThermoFisher Scientific, USA
DNA-Leiter GeneRuler™ 100 bp Plus	ThermoFisher Scientific, USA
dNTP-Mix (2,5 mM)	ThermoFisher Scientific, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) mit MgCl <sub>2</sub> und CaCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE
Dynabeads M-450 Epoxy	ThermoFisher Scientific, USA
ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Life Sciences, UK
Falcon™ Kammer-Objektträger, 0.7 cm <sup>2</sup> , 8 wells	Fisher Scientific GmbH, DE
FBS Superior (S0615)	BioChrom GmbH, DE

Gibco™ Horse Serum (26050088)	ThermoFisher Scientific, USA
Hanks balanced salt solution (HBBS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE
Harnteststreifen, Medi-Test Combi 2	Macherey-Nagel, USA
Heparin-Natrium (5000 I.E./ml)	B. Braun, DE
Insulin (28 USP/mg)	Merck KGaA, DE
Insulinspritzen 0,5 ml	Becton Dickinson GmbH, DE
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, DE
L-Glutamine; 200 mM	Merck KGaA, DE
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, DE
Lightcycler® 480 SYBR Green I Master	Roche Diagnostics GmbH, DE
Maus Albumin ELISA Kit (ab108792)	Abcam, UK
Midori Green	Biozym Scientific GmbH, DE
Mikrohämatokrit-Kapillaren, heparinisiert	Brand GmbH & CO. KG, DE
N,N,N',N'- Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE
Objekträger Polysine®	ThermoFisher Scientific, USA
Oligo (dT)18 Primer	ThermoFisher Scientific, USA
Page Ruler Plus, Prestained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific, USA
Page Ruler, Unstained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific, USA
Paraffin, Paraplast X-tra (P3808)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE
Penicillin-Streptomycin (10000 U Penicillin/ 10 mg/ml Streptomycin)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE
PhosStop	Roche Diagnostics GmbH, DE
Ponceau S	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE
PVDF-Membran Immobilon	Merck Millipore, USA
qPCR-Platten, LightCycler® 480, 96 well, weiß	Roche Diagnostics GmbH, DE
Red Taq Polymerase	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE
Rekombinantes murines TSP1-Protein	R&D-Systems, USA
Reverse Transkriptase (RT), M-MLV	Promega, USA
RNAlater®	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE
RNAasin®, Ribonuklease Inhibitor	Promega, USA
RPMI 1640-Medium, mit NaHCO <sub>3</sub> , ohne L-Glutamin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE
RPMI-Medium, mit L-Glutamin, ohne Glucose	Biozym Scientific GmbH, DE
Streptozotocin (U-9889)	Santa Cruz Biotechnology, USA
Trizol (PeqGold TriFast)	PeqLab Biotechnologie GmbH, DE
Trypsin-EDTA Lösung (10×)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt AG & CO. KG, DE
Zellsieb, 100 µm, (Corning® cell strainer)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE

## 2.1.2 Geräte

Verwendete Geräte, die nicht zur Standardlaborausrüstung gehören, sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt (Tabelle 2-2).

**Tabelle 2-2: Eingesetzte Geräte.**

Gerät	Beschreibung	Hersteller
Agarosegel-Elektrophorese-Kammer	Casting System Compact Biometra	Biometra GmbH, DE
Blotting-Apparatur	Semi-Dry Elektrobloetter	VWR International, DE
Blutdruckmessgerät	Tail-Cuff-Blutdruckmessvorrichtung mit Verstärker	IITC Life Science Inc, USA
Blutzuckermessgerät	CONTOUR® XT	Bayer AG, DE
Dispergiergerät	Ultra-Turrax®	IKA Werke, DE
Fluoreszenzmikroskop	Axio Observer Z1	Carl Zeiss, DE
HPLC mit UV-Detektor	Prominence LC20 series Degasser: DGU-20A Pumpe: LC 20AT Autosampler: SIL-20AC HT Säulenofen: CTO-10AS VP UV-Detektor: SPD-10 AV Steuergerät: CBM-20A	Shimadzu, Japan
HPLC-Säule	Zorbax 300-SCX 5µm; 150×4,6mm	Agilent Technologies, DE
Geldokumentationssystem	ChemiDoc™ MP	Bio-Rad Laboratories, DE
Inkubator	CO-150 oder CO-170	New Brunswick Scientific, USA
Isofluran-Verdampfer	Vapor 19.3	Drägerwerk AG, DE
Magnet zur Glomeruli-Isolation	BDI Magnet™ Cell Separation Magnet	Becton Dickinson GmbH
Mikroplatten-Reader	Tecan Sunrise Remote™	Tecan Group Ltd., CH
Mikroskop Zellkultur	CK2; inverses Mikroskop mit Phasenkontrast	Olympus, Japan
PCR-Cycler	Biometra T1 Thermocycler	Biometra GmbH, DE
Photometer	Biophotometer plus	Eppendorf AG, DE
qPCR-Cycler	Lightcycler® 480 System	Roche Diagnostics, DE
Rotationsmikrotom	Microm HM 355S	Thermo Scientific, USA
SDS-PAGE-System	Mini Protean Tetracell	Bio-Rad Laboratories, USA
Spiegelreflexkamera	EOS 1200D	Canon Inc., Japan
Stoffwechsellkäfige		Tecniplast GmbH, DE
UV-Transilluminator	Biometra TI 1	Biometra GmbH, DE
Vorsäule	Nucleoshell RP18 2,7 µm; 4×3 mm,	Macherey-Nagel, DE
Ultraschallhomogenisator	Sonopuls UW 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, DE
Zentrifugen	Zentrifuge mit Vortexer, CM-70M Kühlzentrifuge, Mikro 220R Centrifuge 5417 R Centrifuge 5424 R	neoLab, DE Hettich Zentrifugen, DE Eppendorf AG, DE Eppendorf AG, DE

### 2.1.3 Antikörper

Die für den Western Blot (WB), die Immunocytochemie (ICC) und die Immunhistochemie (IHC) verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in den folgenden Tabellen aufgeführt (Tabelle 2-3, Tabelle 2-4).

**Tabelle 2-3: Primärantikörper.**

Antigen	Spezies	Verdünnungsfaktor			RRID	Hersteller
		WB	ICC	IHC		
CD31	rabbit			1:100	AB_726362	Abcam, UK
Collagen IV	rabbit			1:200	AB_305584	Abcam, UK
Fibronektin	mouse		1:100		AB_2262890	Santa Cruz Biotechnology, USA
GAPDH	rabbit	1:1000			AB_561053	Cell Signaling Technology, USA
Nephrin	guinea pig		1:50	1:50	AB_1005584	OriGene Technologies (Acris), USA
PDE5a	rabbit	1:500			AB_2161266	Santa Cruz Biotechnology, USA
PDE9a	rabbit	1:500			AB_11204529	Merck Millipore, USA
PKGII	rabbit	1:100			-	Lehrstuhlinterne Herstellung
PKG1 $\alpha$	rabbit	1:80			-	Lehrstuhlinterne Herstellung
PKG1 $\beta$	rabbit	1:200			-	Lehrstuhlinterne Herstellung
sGC $\beta$ 1	rabbit	1:1000			AB_259906	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE
TSP1	mouse	1:500			AB_793045	Santa Cruz Biotechnology, USA
P(Ser239)-VASP	rabbit	1:750			AB_2213396	Cell Signaling Technology, USA
VASP	rabbit	1:750			AB_2213393	Cell Signaling Technology, USA
Vimentin	goat		1:200		AB_793998	Santa Cruz Biotechnology, USA
$\alpha$ 8 Integrin	goat			1:100	AB_2296280	R&D-Systems, USA
$\alpha$ SMA	mouse			1:200	AB_262054	Beckman Coulter, USA
$\beta$ -Aktin	rabbit	1:1000			AB_2305186	Abcam, UK

**Tabelle 2-4: Sekundärantikörper.**

Antigen	Spezies	Verdünnungsfaktor		RRID	Hersteller
		WB	ICC/IHC		
anti-Mouse IgG (HRP-konjugiert)	goat	1:10 000		AB_258167	Merck KGaA, DE
anti-Rabbit IgG (HRP- konjugiert)	goat	1:10 000		AB_2313567	DIANOVA GmbH, DE
anti-Rabbit IgG (Alexa 647- konjugiert)	donkey		1:200	AB_2536183	ThermoFisher Scientific, USA
anti-Mouse IgG (Alexa 647- konjugiert)	donkey		1:200	AB_162542	ThermoFisher Scientific, USA
anti-Goat IgG (Alexa 546- konjugiert)	donkey		1:200	AB_142628	ThermoFisher Scientific, USA
anti-Guinea pig IgG CF 555	donkey		1:200	AB_2814810	Merck KGaA, DE

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

In Tabelle 2-5 werden die verwendeten Puffer und andere Lösungen und deren genaue Zusammensetzung beschrieben.

**Tabelle 2-5: Zusammensetzung einzelner Puffer und Lösungen.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Probenvorbereitung</b>	
Lyse-Puffer (2 % Lubrol)	20 mM Tris; 140 mM NaCl; 2 % (w/v) Nonaethylglycolmonodocylether; 1,0 mM Benzamidin; 0,5 µg/µl Leupeptin; 0,3 mM PMSF; PhosStop; pH 8,0
<b>SDS-PAGE und Western Blot</b>	
Acrylamid-Lösung (SDS-PAGE)	30 % (w/v) Acrylamid; 0,2 % (w/v) Bisacrylamid
Tris-HCl-Puffer 1,8 M	1,8 M Tris; pH 6,8
Tris-HCl-Puffer 0,6 M	0,6 M Tris; pH 8,8
Blotting-Puffer Anode 1	36,3 g/l Tris; 20 % (v/v) Methanol; pH 10,4
Blotting-Puffer Anode 2	3,6 g/l Tris; 20 % (v/v) Methanol; pH 10,4
Blotting-Puffer Kathode	3 g/l Tris; 5,8 g/l 6-Aminohexansäure; 20 % (v/v) Methanol; pH 7,6
Elektrophoresepuffer (10×)	30 g/l Tris; 144 g/l Glycin; 10 g/l SDS (pH 8,3)
Lämmli-Puffer (6×)	3,6 ml Glycerin; 1 g SDS; 0,93 g DTT; 1,2 g Bromphenolblau; ad 10 ml H <sub>2</sub> O
Ponceau S-Lösung	0,2 % (w/v) Ponceau S; 2 % (w/v) Trichloressigsäure
AK-Verdünnungslösung	3 % (w/v) BSA; 0,05 % (w/v) Natriumazid in TBST
Stripping-Lösung	20 ml 1 N NaOH; 180 ml H <sub>2</sub> O; 4 mg SDS; 1 mg DTT
TBS-Puffer (10×)	24,2 g/l Tris; 80 g/l NaCl pH 7,6
TBST-Puffer	0,1 % (v/v) Tween-20 in TBS-Puffer (1×)

<b>Immunhistochemie/ Immuncytochemie</b>	
Fixierlösung Organe (3 % PFA)	5,37 g/l NaCl; 3,42 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,38 g/l EGTA; 0,41 g/l MgCl <sub>2</sub> ; 34,2 g/l Glucose; 30 g/l Paraformaldehyd; pH 7,4 (NaOH)
Fixierlösung Zellen (2 % PFA)	Fixierlösung Organe mit H <sub>2</sub> O verdünnt auf 2 % PFA-Gehalt
PBS-Puffer	Lösung A: 4,56 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 16,36 g NaCl; ad 1,5 l H <sub>2</sub> O; Lösung B: 1,36 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; ad 1,0 l H <sub>2</sub> O; Lösung A mit Lösung B titrieren (pH 7,5); ad 2 l mit H <sub>2</sub> O
Tris/EDTA (Antigen-Retrieval)	1,2 g/l Tris; 0,372 g/l EDTA; pH 8,5
Blockierlösung	10 % (w/v) Horseseerum, 1 % (w/v) BSA in PBS-Puffer
<b>Pikro-Siriusrot-Färbung</b>	
Bouin-Lösung	1,3 % (w/v) Pikrinsäure, 37 % (v/v) Formaldehyd, 5 % (v/v) Essigsäure
Pikro-Siriusrot Färbelösung	0,1 % (w/v) Direct Red80, 1,3 % (w/v) Pikrinsäure
<b>Isolierung Mesangialzellen</b>	
PBS (MC)	8,0 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 3,63 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O; 0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
Puffer A1	2,62 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O; 29,0 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O; pH 8,0
Blockierlösung Beads	5 mg BSA / 1 ml Puffer A1
Zellkulturmedium für MCs	RPMI 1640 ohne L-Gln; 10 % (v/v) FBS; 330 U Insulin; 1 mM Natrium-Pyruvat; 1 mM L-Glutamin; 1 % (v/v) Pen/Strep
NG-Medium	RPMI 1640 ohne Glucose; 8 mM D-Glucose; 1 mM Natrium-Pyruvat; 1 % (v/v) Pen/Strep
HG-Medium	RPMI 1640 ohne Glucose; 25 mM D-Glucose; 1 mM Natrium-Pyruvat; 1 % (v/v) Pen/Strep
<b>Kreatinin-Bestimmung</b>	
Mobile Phase	5 mM Natriumacetat (pH 5,1 mit Essigsäure)/ Acetonitril 80:20 (v/v)
<b>PCR und Agarosegelelektrophorese</b>	
TAE-Puffer (50×)	242 g/l Tris; 57,1 ml Essigsäure; 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); ad 1 l MQ-H <sub>2</sub> O
DEPC-H <sub>2</sub> O	1 l Wasser; 1 ml DEPC; 24 h inkubieren, dann autoklavieren

### 2.1.5 Primer

Die für die RT-qPCR benötigten Primer wurden von den Firmen Eurofins, DE oder Metabion, DE bezogen. Die jeweiligen Nukleotidsequenzen sind in Tabelle 2-6 aufgelistet.

**Tabelle 2-6: Primer für RT-qPCR-Analyse.**

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
18S-rRNA	5'-AAATCAGTTATGGTTCCTTTGGTC-3'	5'-GCTCTAGAATTACCACAGTTATCCAA-3'
β-Aktin	5'-CGCAGCCACTGTCGAGTC-3'	5'-CCATCACACCCTGGTGCC-3'
Col 1a1	5'-CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT-3'	5'-GCAGCTGACTTCAGGGATGT-3'
Col IV	5'-GCGTAAGTTCAGCACCATGC-3'	5'-CAAACCGCACACCTGCTAATG-3'
Fibronektin	5'-TGCCGCTCTAGCTTCTTCC-3'	5'-GGAATTTCTTGCTTATGCAGAGTC-3'
MMP2	5'-ACAAGTGGTCCGCGTAAAGT-3'	5'-GTAAACAAGGCTTCATGGGGG-3'
Nephrin	5'-CTGGGGGACAGTGGATTGAC-3'	5'-AAGACCACCAACCGCAAAGA-3'
sGC <sub>β1</sub>	5'-TGCAAGCAAAGTCCTCAACCT-3'	5'-ATCCCAGGACACGCAAGATG-3'
TGFβ	5'-TGACGTCCTGAGTTGTACG-3'	5'-GGTTCATGTCATGGATGGTGC-3'
TIMP1	5'-GAGACACACCAGAGCAGATACC-3'	5'-AGGTGGTCTCGTTGATTTCTGG-3'
TSP1	5'-CTGCCAGAACTCGGTTACCA-3'	5'-GAAGAGCCCTCGCATCTGTT-3'

## 2.2 Tierexperimentelle Methoden

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden gemäß deutscher Tierschutzbestimmungen/ FEL-ASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Association*) durchgeführt und von der zuständigen Behörde (Regierung von Unterfranken; #RUF-55.2-2532-2-400; #RUF-55.2.2-2532-2-515) genehmigt. In dieser Arbeit wurde neben genetisch unveränderten Wildtyp (WT)-Mäusen auch mit verschiedenen Knockout-Mutanten gearbeitet. Für die Isolation primärer Mesangialzellen wurden Tiere mit selektiv ausgeschalteter Proteinkinase PKGI (PKGI-KO) (127) oder PKGII (PKGII-KO) (128) sowie WT-Tiere verwendet, die einen Sv129-Hintergrund aufwiesen und aus einer Eigenzucht der Universität Regensburg stammten.

Für die Versuche zur diabetischen Nephropathie wurden eNOS-KO- (129) und Wildtyp-Tiere mit einem gemischten genetischen Hintergrund Sv129/ C57BL/6J verwendet. Jeweils zwei eNOS-KO-Elternpaare (Stamm C57BL/6J; Linie B6.129P2-Nos3/J) wurden von der Firma Jackson Laboratories bezogen und mit den vorhandenen Sv129 -Tieren weiterverpaart.

Alle Tiere wurden in der SPF (Spezifiziert-Pathogenfrei)-Tierhaltung der Universität Regensburg gezüchtet und gehalten. Die Haltung erfolgte unter konstanter Umgebungstemperatur, 12 h-Hell-Dunkel-Rhythmus und *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter.

Um PKGI-KO bzw. PKGII-KO Tiere zu erhalten, wurden heterozygote Elterntiere (ein Männchen und zwei Weibchen) miteinander verpaart. Für die Zucht von eNOS-KO-Mäuse wurden homozygote Elterntiere verwendet. Die Genotypisierung der Nachkommen erfolgte mittels PCR von Ohrbiopsien.

### **2.2.1 Mausmodell zur Untersuchung der diabetischen Nephropathie**

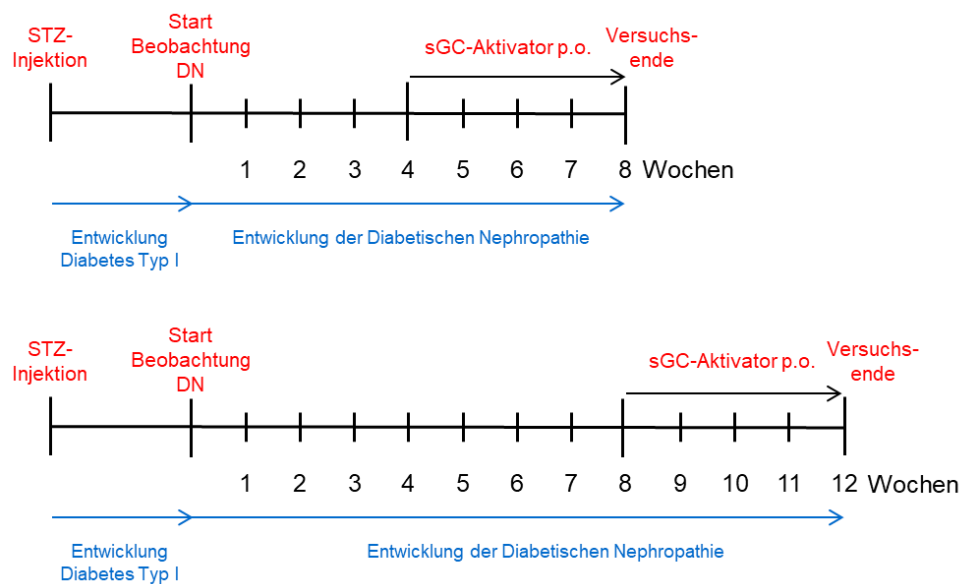
An fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurden männlichen WT- und eNOS-KO-Mäusen im Alter von 8 bis 12 Wochen intraperitoneal STZ (50 mg/kg/Tag Streptozotocin) injiziert, um einen Diabetes mellitus Typ-1 zu induzieren (113, 119). Dafür wurde das STZ vor der Injektion frisch in sterilfiltriertem Citratpuffer (50 mM, pH 4,5) gelöst und innerhalb von 30 min verabreicht. Das STZ wirkt selektiv zytotoxisch auf die  $\beta$ -Zellen des Pankreas, die daraufhin kein Insulin mehr produzieren können. Als Folge des Insulinmangels entwickeln die Versuchstiere typische Charakteristika eines Typ-1-Diabetes, wie Hyperglykämie, Polydipsie oder Polyurie (113). Da männliche Tiere deutlich sensitiver auf das STZ reagieren als weibliche Tiere und dadurch auch höhere Blutglukosekonzentrationen entwickeln, wurden nur männliche Tiere in die Studie eingeschlossen (130). Vor der Erstinjektion wurden die Mäuse 4 h entfüttert. Um eine Hypoglykämie durch die STZ-Gabe zu vermeiden, wurde den Tieren in der ersten Woche zusätzlich Saccharose über das Trinkwasser (10 %-ige Lösung) verabreicht.

Zehn Tage nach der letzten STZ-Injektion wurde der Blutzuckerspiegel der Tiere bestimmt, um sicherzustellen, dass sich ein Diabetes mellitus entwickelt hat. Dazu wurde den Tieren ein Tropfen Blut aus der Schwanzvene entnommen, der mit einem Standardblutzuckermessgerät analysiert wurde. Tiere mit einem Blutzuckerspiegel  $>280$  mg/dl wurden in den Versuch eingeschlossen. Es folgte ein Beobachtungszeitraum von 8 bzw. 12 Wochen, in dem sich eine diabetische Nephropathie entwickelte.

Die Hälfte der Tiere erhielt in den letzten vier Wochen des jeweiligen Beobachtungszeitraums den sGC-Aktivator Cinaciguat oral über das Futter (15 mg Cinaciguat/ kg Standardfutter). Das entspricht, bei einer durchschnittlichen Futteraufnahme von 4,5 g Futter am Tag pro Maus, einer täglichen Cinaciguataufnahme von etwa 3 mg/kg. Der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 2-1 dargestellt.



Die Belastung der Tiere während des Versuchs durch einen unbehandelten Diabetes mellitus Typ 1 wurde als mäßig eingestuft. Der gesundheitliche Zustand der Tiere wurde während des Versuchs durch tägliche Inaugenscheinnahme und regelmäßige Bestimmung des Körpergewichts kontrolliert. Außerdem wurden die Käfige aufgrund der ausgeprägten Polyurie häufiger ausgetauscht. Starker Gewichtsverlust (mehr als 20 % im Vergleich zum Versuchsbeginn), Verweigerung der Futter oder Wasseraufnahme oder anderes auffälliges Verhalten wurden unter anderem als Abbruchkriterien festgelegt.



**Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.**

### 2.2.2 Blutdruckmessung

Mit Hilfe der sogenannten *Tail-Cuff*-Plethysmografie wurde der systolische Blutdruck der Versuchstiere bestimmt. Dazu wurden die Tiere in eine Fixiereinheit aus Plexiglas gesetzt und der Schwanz dabei durch eine Sensormanschette gefädelt. Die anschließenden Messungen wurden in einer auf 38 °C vorgewärmten Kammer durchgeführt. Über die Manschette wird Druck auf die Schwanzvene ausgeübt, der über eine bestimmte Zeit nachlässt. Dabei fließt das Blut zurück in die Vene. Die resultierenden Volumenänderungen der Schwanzvene werden photoelektrisch detektiert und sind abhängig vom Blutdruck.

Um den Einfluss von Stress auf den Blutdruck zu minimieren, wurden die Mäuse vor der eigentlichen Messung drei Tage lang an das Vorgehen gewöhnt. Für die eigentliche Blutdruckmessung wurden i. d. R. mindestens 60 Einzelmessungen durchgeführt, davon wurden

mindestens 5–10 Messungen für die Ermittlung des Blutdrucks herangezogen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software „BpMonWin monitor“ (Version 1.35).

### 2.2.3 Ermittlung der Stoffwechselfparameter

Mit Hilfe eines Stoffwechselkäfigs (Abbildung 2-2) können Urin und Faeces sauber voneinander getrennt und gesammelt werden und damit die tägliche Wasseraufnahme und Urinausscheidung eines Versuchstieres ermittelt werden. Diese Daten sind notwendig, um die Kreatinin-Clearance bestimmen zu können und um Symptome wie Polyurie oder Polydypsie zu untersuchen. Das Tier kann sich in dem Käfig frei auf einem Gitterboden bewegen und hat freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Versuchstiere wurden jeweils einzeln für 24 h in einen Stoffwechselkäfig gesetzt und anschließend die in diesem Zeitraum aufgenommene Wassermenge und die ausgeschiedene Urinmenge ermittelt. Der gesammelte Urin wurde bis zur nachfolgenden Kreatinin-Bestimmung bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.



**Abbildung 2-2: Darstellung eines Stoffwechselkäfigs.**

Abbildung freundlicherweise von der Firma Tecniplast Deutschland GmbH zur Verfügung gestellt.

### 2.2.4 Retrograde Perfusion und Organentnahme

Für die Blutentnahme wurden die Tiere zunächst mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran (3–4 % Isofluran in Sauerstoff mit einem Fluss von 60 ml/min) anästhesiert. Anschließend wurde mittels Mikrohämatokrit-Kapillaren ca. 0,5 ml Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Nach der Zentrifugation (20 min, 2000 g) wurde das Serum abpipettiert und bis zur weiteren Analyse bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

Im Anschluss wurden die betäubten Versuchstiere durch zervikale Dislokation getötet, um die Nieren zu entnehmen. Zunächst wurde das Abdomen geöffnet und Urin durch Punktion der Blase entnommen. Für die folgende retrograde Perfusion der Niere wurde die Bauchaorta zügig frei präpariert, unterhalb der Abgänge der *Arteria renalis* abgeklemmt und distal zur Klemme angeschnitten. Durch diesen kleinen Schnitt wurde der Perfusionskatheter in die Aorta eingeführt und mit einer weiteren Klemme fixiert. Nun wurde die linke Niere entfernt,

von der eine Hälfte für die spätere Western Blot-Analytik direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und die andere Hälfte für die spätere RT-qPCR-Analytik über Nacht in *RNAlater*<sup>®</sup> inkubiert wurde. Beide Organhälften wurden anschließend bei -80 °C gelagert. Die rechte Niere wurde erst mit 25 ml isotoner Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) mit 10 I.E./ml Heparin und anschließend mit 25 ml 3 %-iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung infundiert. Das PFA dient zur Fixierung des Gewebes, um die ursprüngliche Gewebestruktur zu konservieren. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde diese Niere in 70 %-igen Methanol bei 4 °C gelagert.

## 2.3 Urin- und Serumanalysen

### 2.3.1 Bestimmung des Glukosegehalts im Urin

Die vermehrte Ausscheidung von Glucose über den Urin ist ein typisches Symptom bei DM. Mittels spezieller Harnteststreifen, kann der Glukosegehalt im Urin semiquantitativ bestimmt werden. Der Teststreifen wurde dazu kurz in den zu untersuchenden Urin getaucht. Nach 30 Sekunden wurde der Teststreifen mit der beiliegenden Farbskala (Abbildung 2-3) abgeglichen und die ungefähre Glukosekonzentration ermittelt (131).

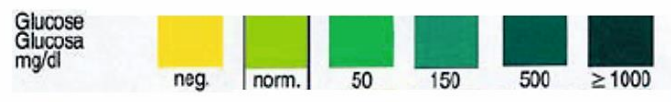


Abbildung 2-3: Farbskala zur Auswertung des Urinteststreifens.

### 2.3.2 Bestimmung der Kreatininkonzentration und Kreatinin-Clearance

Die Kreatininkonzentration in Serum und Urin wurde mittels HPLC analysiert. Als Grundlage für die verwendete Methode diente ein bereits in der Literatur beschriebenes Verfahren (132–134), welches durch Prof. Dr. Frieder Kees (Universität Regensburg) weiterentwickelt und optimiert wurde.

Bei Serumproben müssen vor der Analyse störende Proteine entfernt werden. Dazu wurden 10 µl Serum mit 50 µl Perchlorsäure (7 %-ig) gemischt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Die so ausgefallten Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 10 800 g, RT) und der Überstand in ein HPLC-Fläschchen überführt. Urinproben wurden entsprechend in der mobilen Phase vorverdünnt. Jeweils 5 µl der zu untersuchenden Proben wurden injiziert, auf einer sauren Kationenaustauschersäule (Säulentemperatur 35 °C) aufgetrennt und mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 234 nm detektiert. Bei einer Flussrate von

1,0 ml/min betragen die Retentionszeiten von Kreatinin bei Serumproben 6,3–6,5 min, bei Urinproben 5,3–5,5 min. Ursache für die verschiedenen Retentionszeiten ist der unterschiedliche pH-Wert der Proben aufgrund der Probenvorbereitung. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels externen Standard (Kreatinin 2 mg/l in 5 % bovinem Serumalbumin (BSA)) über die Peakfläche.

Die anschließende Berechnung der Kreatinin-Clearance als Maß für die glomeruläre Filtrationsrate erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Kreatinin Clearance} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{min} \times \text{g}} \right] = \frac{V(\text{Urin}) [\text{mg}] \times c(\text{Kreatinin Urin}) \left[ \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right]}{c(\text{Kreatinin Serum}) \left[ \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] \times 1440 \text{ min} \times \text{KG} [\text{g}]}$$

### 2.3.3 Bestimmung der Proteinurie

Für die Bestimmung der im Urin ausgeschiedenen Proteinmenge wurde der kommerziell erhältliche Test, *DC Protein Assay*, verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Es handelt sich um ein kolorimetrisches Messverfahren, das auf der Lowry-Proteinbestimmung beruht und kompatibel mit eventuell in der Probe enthaltenen Detergenzien ist. Die Proben wurden an einem Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine Standardgerade mit BSA. Da die Urinkonzentrationen stark variieren, wurden die erhaltenen Werte auf die entsprechende Kreatininkonzentration im Urin normiert. Die Proteinbestimmung wurde nur mit Urinproben durchgeführt, die direkt aus der Blase der Versuchstiere entnommen wurden.

### 2.3.4 Bestimmung der Albuminurie

Die Albuminkonzentration im Urin stellt einen wichtigen Marker für die glomeruläre Schädigung dar. Für die Bestimmung der Albuminurie wurde ein kommerziell erhältliches Albumin-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) Kit verwendet. Die Durchführung der Analyse erfolgte gemäß der Herstellerangaben. Die zu untersuchenden Urinproben wurden ebenfalls entsprechend des Herstellerprotokolls vorbereitet. Die Absorptionsmessung wurde an einem Absorptions-Mikroplatten-Reader bei 450 nm durchgeführt. Durch Logarithmieren der Extinktion (y-Achse) und Konzentration (x-Achse) wurde eine lineare Standardkurve zur Berechnung der Albuminkonzentration erhalten. Anders als vom Hersteller angegeben, erfolgte die Auswertung der Albuminkonzentration nicht mit einer 5-Punkt- sondern nur mit einer 4-Punkt-Kalibrierung, da der fünfte Standard mit einer Konzentration von 200 ng/ml

bereits offensichtlich außerhalb des linearen Bereichs lag. Die Urinproben wurden entsprechend so verdünnt, dass die zu erwartenden Absorptionswerte unterhalb des vierten Standards lagen. Die ermittelten Albuminkonzentrationen wurden anschließend zur besseren Vergleichbarkeit auf die Kreatininkonzentration normiert.

### **2.3.5 Bestimmung der cNMP-Konzentration im Urin**

Die Bestimmung der zyklischen Nukleotide, cGMP, cAMP, cCMP und cUMP wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Roland Seifert und Annette Garbe (Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt. Hierfür wurde eine bereits in der Literatur beschriebene LC-MS/MS-Methode verwendet (135). Die Konzentrationen von cCMP und cUMP waren teilweise so niedrig, dass diese nicht detektiert und somit auch nicht ausgewertet werden konnten. Die cGMP- und cAMP- Konzentrationen wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf den Kreatiningehalt im Urin normiert.

## **2.4 Histochemische Untersuchung der Nieren**

Die Histochemie ermöglicht es mit verschiedenen Färbetechniken, den detaillierten Aufbau von Zell- und Gewebestrukturen zu analysieren. Die vorhergehende Fixierung des Gewebes erhält dabei die natürliche Struktur der Organe.

Die perfundierten und in 70 %-igen Methanol gelagerten Nieren wurden für die weiteren Untersuchungen zunächst in Paraffin eingebettet. Dazu wurden die Organe schrittweise in einer aufsteigenden Methanolreihe dehydriert (75–100 % Methanol, jeweils 30 min bei RT) und anschließend zweimal 30 min in 100 % Isopropanol bei RT, und noch einmal in 100 % Isopropanol bei 60 °C inkubiert. Danach wurden die Nieren für weitere 30 min bei 60 °C in einer Mischung aus Isopropanol/Paraffin 50:50 (v/v) gegeben. Um eine vollständige Diffusion des Paraffins in das Gewebe zu gewährleisten, wurden die Organe anschließend für zweimal 24 h in 60 °C warmen Paraffin inkubiert. Schließlich wurden die Nieren in Einbettkassetten mit reinem Paraffin eingebettet. Das Paraffin ließ man bei 4 °C für mindestens 24 h aushärten, bevor am Rotationsmikrotom 2,5 µm dicke Schnitte angefertigt wurden. Die Schnitte wurden in einem 38 °C warmen Wasserbad gestreckt, anschließend auf beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 37 °C über Nacht getrocknet.

Für die weitere histochemische Analytik wurden die Schnitte wieder entparaffiniert und rehydriert. Dazu wurden diese zunächst zweimal für 10 min in 100 % Xylol, dreimal für 5 min

in 100 % Isopropanol und schließlich zweimal für 5 min in 100 % Methanol inkubiert. Zuletzt wurden die Schnitte kurz in destilliertes Wasser getaucht.

#### **2.4.1 Immunhistochemie**

Bei der Immunhistochemie werden Antikörper genutzt, um bestimmte Antigene im Gewebe spezifisch zu detektieren und so die Expression von Proteinen *in situ* sichtbar zu machen. Zunächst wurden die entparaffinierten Schnitte 35 min in Tris/EDTA-Puffer gekocht. Dieser Schritt dient der Antigendemaskierung, um die durch die Fixierung verlorene Immunreaktivität der Proteine zumindest teilweise wiederherzustellen. Nachdem die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden diese zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend für 2 h mit 10 % Horse Serum (in 1 % BSA in PBS) blockiert. Anschließend wurde der Primär-Antikörper (siehe Tabelle 2-3) in 1 % BSA in PBS verdünnt, auf die Gewebeschnitte verteilt und über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Schnitte anschließend im Dunkeln für 2 h mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung in 1 % BSA in PBS, siehe Tabelle 2-4) inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte erneut dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und nach Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit mit Eindeckmedium und Deckgläschen konserviert.

Für die mikroskopische Auswertung der Präparate und die Bildaufnahme wurde ein Fluoreszenzmikroskop verwendet. Die Bildverarbeitung erfolgte mit der AxioVision Rel. 4.8 Software (Zeiss, DE). Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit der Software MetaMorph® Version 7.7. (Molecular Devices, USA; RRID: SCR\_002368).

Die immunhistochemische Untersuchung von CD31 wurde freundlicherweise von Sally Prüschenk (Universität Regensburg) unterstützt, die dafür die Bildaufnahme am Mikroskop übernahm.

#### **2.4.2 Pikro-Siriusrot-Färbung**

Die Pikro-Siriusrot-Färbung ist eine histologische Methode um Kollagene in Geweben anzufärben (136). Unter dem Lichtmikroskop sind Kollagene rot dargestellt, während der Hintergrund und das Cytoplasma hellgelb erscheinen.

Die entparaffinierten und dehydrierten Schnitte wurden zunächst für 24 h in Bouin-Lösung und anschließend für 1 h in Siriusrot-Färbelösung inkubiert. Dann wurden die Schnitte viermal kurz in 0,01 M Salzsäure gewaschen, mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert

(50 %, 70 %, 90 %, 3×100 %) und zweimal für 2 min in 100 % Xylol inkubiert. Nachdem das Lösungsmittel abgedampft war, wurden die Schnitte mit DePeX konserviert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte lichtmikroskopisch. Für die Bildverarbeitung wurde die der Axio-Vision Rel. 4.8 Software (Zeiss, DE) verwendet. Die Quantifizierung des rotgefärbten Kollagenanteils im Gewebe wurde mittels Threshold-Analyse mit ImageJ (RRID: SCR\_00370) (137) durchgeführt.

## **2.5 Zellkulturversuche mit Mesangialzellen**

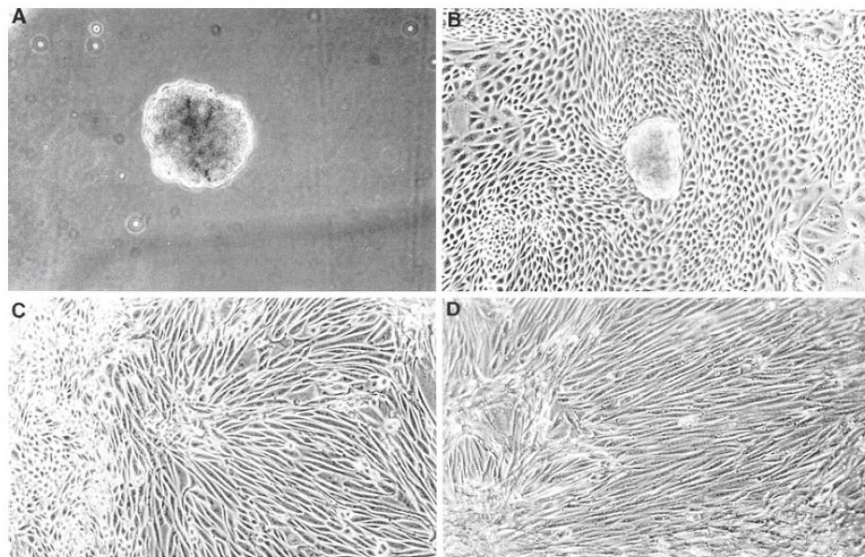
Alle Zellkulturversuche wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Alle benötigten Materialien wurden zuvor autoklaviert oder steril bezogen. Lösungen und destilliertes Wasser wurden ebenfalls vor Gebrauch autoklaviert. Die Kultivierung der primären Mesangialzellen erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Inkubator.

### **2.5.1 Isolierung von primären Mesangialzellen**

Mesangialzellen sind Bestandteil des glomerulären Filterapparats der Niere und können durch Isolation von Glomeruli für die Zellkultur gewonnen werden. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur Aufreinigung der Glomeruli handelte es sich um ein optimiertes Protokoll, das ursprünglich von Takemoto et al. (138) publiziert wurde.

Zunächst wurden die Nieren einer Maus wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben mit 40 ml einer Suspension aus 4,5 µm großen superparamagnetischen Mikrokügelchen, sogenannten Beads, in PBS (MC)-Puffer (40 °C) retrograd perfundiert. Die verwendeten Beads wurden zuvor mit einer BSA-Lösung (5 mg BSA pro 1 mL Puffer A1) über Nacht blockiert. Die perfundierten Nieren wurden entnommen und nach Entfernung der Nierenkapsel mit einem scharfen Skalpell fein zerkleinert. Anschließend wurde das Gewebe für 30 min bei 37 °C unter Schütteln in 1 mg/ml Collagenase A gelöst in HBBS-Puffer inkubiert und die so erhaltene Suspension über ein feinmaschiges Zellsieb filtriert. Das immer noch trübe Filtrat wurde mit PBS (MC)-Puffer in ein passendes 10 ml-Röhrchen überführt und an einem starken Magneten inkubiert. Aufgrund der Größe der magnetischen Beads, wurden diese in der Niere nicht frei filtriert, sondern reicherten sich in den Glomeruli an. Die Glomeruli hafteten somit an der dem Magneten zugewandten Röhrchenseite, wodurch der Puffer mit den Geweberesten einfach mit einer Pipette entfernt werden konnte. Die zurückbleibenden Glomeruli wurden dann in frischem PBS (MC) aufgenommen, suspendiert und erneut am Magneten inkubiert, um weitere Gewebereste zu entfernen. Dieser Waschvorgang wurde ca. 10 bis 12-mal

wiederholt, bis die reinen Glomeruli erhalten wurden. Diese wurden schließlich in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen, in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Wärmeschrank inkubiert. Nach etwa ein bis zwei Wochen haben sich die Glomeruli vollständig am Boden der Zellkulturflasche abgesetzt. Zu Beginn wuchsen in der Kultur sowohl Endothelzellen als auch Mesangialzellen. Nach drei bis vier Wochen jedoch dominierten aufgrund der gewählten Kulturbedingungen die Mesangialzellen (139). In Abbildung 2-4 sind die morphologischen Veränderungen der Mesangialzellen während der Kultivierung dargestellt. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mittels Immunocytochemie (Kapitel 2.5.4) überprüft.



**Abbildung 2-4: Mesangialzellwachstum in Zellkultur.**

**A:** Entkapselte Glomeruli (Tag 0). **B:** Zellwachstum an Tag 7; die polygonale Form ist charakteristisch für Epithelzellen. **C:** Sternförmiges Wachstum ist typisch für Mesangialzellen (Tag 14); es sind noch wenige Epithelzellen vorhanden. **D:** Reine Mesangialzellkultur nach 28 Tagen.

Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature Customer Service Centre GmbH (139).

### 2.5.2 Subkultivierung der Mesangialzellen

Mesangialzellen sind adhärent wachsende Zellen, d. h. sie heften sich fest an die Oberfläche der Zellkulturflasche an. Für die Subkultivierung mussten die Zellen deshalb zunächst von der Oberfläche abgelöst werden. Dazu wurden die Zellen erst mit 5–10 ml PBS gewaschen und dann etwa 10 min bei 37 °C im Wärmeschrank mit Trypsin (3–6 ml, 5× Trypsin/EDTA) inkubiert, bis sich die Zellen möglichst vollständig abgelöst haben. Anschließend wurde der Zellsuspension die gleiche Menge serumhaltiges Medium zugesetzt, um den Trypsinverdau abzustoppen. Die Zellen wurden bei 1000 g, RT abzentrifugiert, das Zellpellet in frischem



Medium suspendiert und auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Für immuncytochemische Experimente wurden die suspendierten Zellen mit einer Neubauerzählkammer ausgezählt und entsprechend ausgesät. Die Zellen wurden nur zwischen Passage zwei und vier verwendet.

### 2.5.3 Stimulation der Mesangialzellen

Um untersuchen zu können, wie sich erhöhte Glukosekonzentrationen und die zusätzliche Aktivierung der sGC/cGMP Signalkaskade auf die mRNA- oder Proteinexpression in Mesangialzellen auswirken, wurde ein entsprechendes Behandlungsschema etabliert. Zunächst wurden die Zellen für 24 h in einem FBS- und Insulin-freien Zellkulturmedium inkubiert. Um den erhöhten Blutzuckerspiegel bei Diabetes mellitus zu simulieren, wurden die Zellen anschließend mit 25 mM D-Glukose (*High Glucose* (HG)-Medium) inkubiert. Zur Simulation von normalen Blutzuckerkonzentrationen wurden die Zellen mit 8 mM D-Glukose (*Normal Glucose* (NG)-Medium) stimuliert, dies entspricht den Nüchternblutzuckerwerten bei Mäusen (140). Dieses Medium enthielt zudem 17 mM D-Mannitol, um auszuschließen, dass etwaige Effekte durch osmotischen Stress verursacht wurden. Des Weiteren wurde analysiert, welchen Einfluss die Aktivierung der sGC/cGMP Signalkaskade auf die unter hohen Glukosekonzentrationen veränderte Proteinexpression hat. Dazu wurde dem HG-Medium entweder 1,0 mM 8-Br-cGMP oder 20  $\mu$ M Cinaciguat zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug insgesamt 48 h, wobei das Nährmedium nach 24 h gewechselt wurde.

### 2.5.4 Immuncytochemie

Die Immuncytochemie ähnelt im Prinzip der Immunhistochemie. Hier werden Antikörper genutzt, um bestimmte Proteine in intakten, fixierten Zellen zu detektieren.

Für die immuncytochemische Untersuchung wurden zunächst 120 000 Zellen pro Well auf einem sogenannten Kammerobjektträger ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium durch ein Nährmedium ohne FBS und Insulin ersetzt und die Zellen damit 24 h inkubiert. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen wurden, wurden diese mit einer 2 %-igen Paraformaldehydlösung (15 min, 4 °C) fixiert und dann erneut dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Mit dem Detergens Triton-X 100 (0,2 % in PBS, 10 min) wurden die Zellmembranen permeabilisiert, um die Diffusion der Antikörper in das Zytoplasma zu erleichtern. Nach einem Blockierschritt mit 10 % Horse Serum in einer Lösung aus 1 % BSA in PBS

(2 h, RT), wurden die Zellen mit dem entsprechend verdünnten primären Antikörper (Tabelle 2-3) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde zunächst der überschüssige Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen für 2 h im Dunkeln bei RT mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 2-4) und DAPI (Verdünnung 1:200) inkubiert. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert und so den Zellkern sichtbar macht. Nach drei weiteren Waschstufen mit PBS (jeweils 5 min) wurden die Kammern vom Objektträger entfernt und die Zellen mit Glycergel<sup>®</sup> konserviert.

Für die mikroskopische Auswertung der Präparate und die Bildaufnahme wurde ein Fluoreszenzmikroskop verwendet. Die Bildverarbeitung erfolgte mit der AxioVision Rel. 4.8 Software (Zeiss, DE).

## 2.6 RT-qPCR

### 2.6.1 Extraktion der Gesamt-RNA

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus Nierengewebe und Mesangialzellen wurde nach einem optimierten Protokoll von Chomczynski und Sacchi (141) durchgeführt. Bei der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion handelt es sich um eine Flüssig-Flüssig-Extraktion, die die unterschiedlichen Löslichkeiten der Nukleinsäuren in wässriger und organischer Phase ausnutzt, um RNA von den restlichen Zellbestandteilen abzutrennen. Im leicht sauren Milieu löst sich DNA leicht in der organischen Phase, während sich die RNA in der wässrigen Phase anreichert.

Für die RNA-Extraktion aus Nieren, wurden diese zunächst mit 1,5 ml TriFast<sup>®</sup> unter Eiskühlung mit Hilfe eines Dispergiergeräts homogenisiert und bei RT 5 min inkubiert.

Mesangialzellen wurden nach der Stimulation mit Glucose (siehe Punkt 2.5.3) zunächst mit 10 ml kaltem PBS gewaschen, dann mit 500–1000 µl PBS abgeschabt und bei 2000 g für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 300 µl TriFast<sup>®</sup> aufgenommen und mittels Vortexmischer homogenisiert.

Zu der Trizol-Suspension wurden 100 µl (bei MCs) oder 300 µl (bei Nierengewebe) Chloroform gegeben und die Proben anschließend gründlich mit einem Vortexmischer durchmischt. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 3 min bei RT, wurden die Proben zentrifugiert (15 min; 12000 g; 4 °C), um eine optimale Trennung von wässriger und organischer Phase zu erreichen. Anschließend wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit der entsprechenden Menge Isopropanol (500 µl Isopropanol je 1 ml

verwendetes TriFast<sup>®</sup>) versetzt und nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4 °C zentrifugiert (15 min; 12000g; 4 °C). Das erhaltende RNA-Pellet wurde nach vollständigem Entfernen des Überstands anschließend mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen, nochmals abzentrifugiert (5 min; 7500 g; 4 °C) und der Überstand vollständig entfernt. Das RNA-Pellet wurde 5–10 min bei RT getrocknet und mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Mittels Photometer wurde die Konzentration ( $A_{260}$ ) und die Reinheit (Quotient  $A_{260}/A_{280} \approx 2,0$ ) der isolierten RNA ermittelt.

### 2.6.2 Reverse Transkription

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, kann RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Auf diese Weise kann auch RNA mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) analysiert werden. Da DNA-Polymerasen nur bestehende DNA-Stränge verlängern können, werden sogenannte Primer benötigt. Oligo (dT)-Primer binden an den Poly-A-Schwanz eukaryotischer mRNA und ermöglicht so, dass möglichst viel mRNA unspezifisch umgeschrieben werden kann. In Tabelle 2-7 sind die einzelnen Schritte der cDNA-Synthese beschrieben.

**Tabelle 2-7: Einzelne Schritte der cDNA-Synthese.**

Schritt	Ansatz	Zeit	Temperatur
1) Denaturieren	2 µg RNA 1,0 µl <i>oligo(dT)18</i> -Primer ad 9,0 µl DEPC-H <sub>2</sub> O	5 min	65 °C
2) Zugabe Mastermix auf Eis	4,0 µl 5× RT-Reaktionspuffer 4,0 µl dNTPs (je 2,5 mM) 0,5 µL RNasin <sup>®</sup> 2,5 µl DEPC-H <sub>2</sub> O 1,0 µl RT (M-MLV)	----	0 °C
3) cDNA-Synthese	-----	60 min	37 °C
4) Hitzeinaktivierung	-----	2 min	95 °C

### 2.6.3 Quantitative PCR

Eine PCR ermöglicht die *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten mit Hilfe einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nur wenig von dem zu kopierenden Ausgangsmaterial, dem Templat, benötigt wird, da jede Kopie wiederum als Vorlage genutzt werden kann. Mit einer quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) kann die DNA bzw. cDNA nicht nur vervielfältigt, sondern auch quantifiziert werden. Mit

Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I wird nach jedem PCR-Zyklus die Menge an DNA ermittelt. Der Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA (dsDNA), wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffs um das 100-fache verstärkt wird. Je mehr dsDNA vorhanden ist, desto höher ist die detektierbare Fluoreszenz. Der PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenzintensität erstmals deutlich vom Hintergrund unterschieden werden kann, wird als Ct-Wert (Threshold-Cycle) bezeichnet und dient als Grundlage für die spätere Auswertung (142).

In Tabelle 2-8 ist die Zusammensetzung eines qPCR Ansatzes beschrieben, der für jede zu untersuchende cDNA in einer 96-well-Platte pipettiert wurde. Die eingesetzten Primer für die jeweilig untersuchte mRNA sind in Tabelle 2-6 aufgelistet. Das zugrundeliegende PCR-Programm ist in Tabelle 2-9 beschrieben.

**Tabelle 2-8: Zusammensetzung eines qPCR Ansatzes..**

Komponente	Einsatzmenge
cDNA	2,0 µl
SYBR Green I Master (2x)	10,0 µl
Primermix (5 µM rev, fwd)	2,0 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	6,0 µl

**Tabelle 2-9: qPCR-Programm.**

Stufe	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
1) Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1
2) Amplifizierung	95 °C	15 sec	45
	58 °C	15 sec	
	72 °C	20 sec	
3) Aufnahme der Schmelzkurve			1
4) Abkühlen	40 °C	10 sec	1

Die Auswertung der erhaltenen qPCR-Daten erfolgt häufig mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode nach Schmittgen und Livak (143). Bei dieser Berechnungsmethode wird davon ausgegangen, dass die PCR-Produkte nach jedem Zyklus verdoppelt werden, die Effizienz der PCR also 100 % ist. In der Realität wird eine PCR von verschiedenen Einflussfaktoren beeinflusst, weshalb die tatsächliche Effizienz meist zwischen 90–110 % liegt. Besonders kritisch wird es, wenn

sich die Amplifikationseffizienz des zu untersuchenden Gens von der des Referenzgens unterscheidet. In der Arbeitsgruppe von M. Pfaffl wurde deshalb eine effizienzkorrigierte  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode entwickelt (144):

$$R = \frac{(E_{Target})^{\Delta\text{Ct}_{Target}(\text{unbehandelt}-\text{behandelt})}}{(E_{Ref})^{\Delta\text{Ct}_{Ref}(\text{unbehandelt}-\text{behandelt})}}$$

Der Amplifikationsfaktor E kann einfach über eine Standardgerade für das jeweilige Gen ermittelt werden. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe (unverdünnt; 1:10; 1:100, 1:1000) von einer Kontroll-cDNA in DEPC-H<sub>2</sub>O hergestellt und für alle untersuchten Gene mittels qPCR analysiert. Die Ct-Werte wurden logarithmisch aufgetragen und die Steigung der daraus resultierenden Gerade ermittelt. Mit Hilfe eines Online-Rechners (qPCR Efficiency Calculator, Thermo Fisher) wurde mit der Steigung anschließend der Amplifikationsfaktor berechnet.

Als Referenzgene wurden 18S rRNA oder  $\beta$ -Aktin verwendet. Bei der Auswertung der Daten wurden immer behandelte Diabetestiere mit oder ohne Cinaciguat auf unbehandelte gesunde Kontrollen bezogen, die gleich 1 gesetzt wurden.

## 2.7 Nachweis der PKGII-mRNA mittels PCR

Um zu überprüfen, ob die PKGII-mRNA in Mesangialzellen vorkommt, wurde eine konventionelle PCR mit spezifischen Primern (Primer fwd: 5'-TGGATGTTCCACCGCAAGACC-3'; Primer rev: 5'-AAGTCTACCCTCGGCCAGC-3') durchgeführt. Zuerst wurde die aus Mesangialzellen isolierte RNA in cDNA umgeschrieben (siehe Abschnitt 2.6.2), die dann als Templat für die PCR eingesetzt wurde. Die Zusammensetzung des PCR-

**Tabelle 2-10: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes.**

Komponente	Einsatzmenge
cDNA	3,0 $\mu\text{l}$
Red Taq Polymerase (1U/ $\mu\text{l}$ )	1,5 $\mu\text{l}$
Primer fwd	0,15 $\mu\text{l}$
Primer rev	0,15 $\mu\text{l}$
dNTP (10 mM)	0,5 $\mu\text{l}$
10 x Red PCR Puffer	2,5 $\mu\text{l}$
DEPC-H <sub>2</sub> O	17,2 $\mu\text{l}$

Ansatzes ist in Tabelle 2-10 und das verwendete PCR-Programm in Tabelle 2-11 beschrieben.

**Tabelle 2-11: PCR-Programm.**

Stufe	Temperatur	Zeit	Zyklen
1) Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1
2) Amplifizierung	94 °C	30 sec	30
	60 °C	30 sec	
	72 °C	60 sec	
3) Finale Elongation	72 °C	10 min	1
4) Abkühlen	4 °C	∞	

Die Größe des PCR-Produkts wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurde der PCR-Ansatz mit der entsprechenden Menge DNA-Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Größenstandard auf ein 2 %-iges Agarosegel (2 % Agarose in 1× TAE-Puffer) aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 150 V, 30 min lang. Durch den im Gel enthaltenen Farbstoff Midori Green, konnten die DNA-Banden danach auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und detektiert werden. Die Gelfotos wurden mit Hilfe einer Spiegelreflexkamera aufgenommen.

## 2.8 SDS-PAGE und Western Blot

### 2.8.1 Probenvorbereitung

1/3 der bei -80 °C gelagerten Niere wurde für die Western Blot-Analyse verwendet. Die noch gefrorene Niere wurde mit 750 µl Lyse-Puffer versetzt und unter Eiskühlung mit einem Dispergiergerät homogenisiert. Die unlöslichen Gewebebestandteile wurden durch Zentrifugation (20 min; 4 °C; 18000 g) abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Mesangialzellen wurden wie unter 2.5.3 beschrieben in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen stimuliert. Für die Zellernte wurden diese erst mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und die überschüssige Flüssigkeit gründlich entfernt. Dann wurden die Zellen mit 250–300 µl Lyse-Puffer möglichst vollständig abgeschabt und mittels Ultraschall homogenisiert. Durch Zentrifugation (20 min; 4 °C; 18000 g) wurden die unlöslichen Zellbestandteile abgetrennt und das Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Im nächsten Schritt wurde die Proteinkonzentration der Nieren- und Zelllysate bestimmt. Dazu wurde ein kommerziell erhältlicher Test verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt (siehe Abschnitt 2.3.3).

Die Lysate wurden dann mit 6×-Laemmli-Puffer versetzt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O so verdünnt, dass eine entsprechende Menge Protein pro Volumen aufgetragen werden konnten. Nierenlysate wurden so verdünnt, dass bei Gelen mit 10er-Taschen 50 µg Protein und bei 15-er Taschen 35 µg Protein je Probe aufgetragen werden konnten. Bei den Zelllysaten wurden jeweils 45 µg Protein pro Probe aufgetragen. Die Proben wurden schließlich für 5 min bei 95 °C denaturiert.

### **2.7.1 SDS-PAGE**

Die Abkürzung SDS-PAGE steht für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Mit dieser Technik können komplexe Proteingemische der Größe nach aufgetrennt und anschließend detektiert werden. Elektrophorese bezeichnet allgemein die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Bei der PAGE findet diese Wanderung in einer Polyacrylamid-Gelmatrix statt. Da die Bewegung der Proteine im Gel nicht nur von ihrer Größe, sondern auch von ihrer Eigenladung beeinflusst wird, wird dem Gel und dem Laufpuffer SDS zugesetzt. Bei SDS handelt es sich um ein anionisches Detergens, das die Ladung des Proteins überdeckt indem es Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseinheit bildet. Die einzelnen Proteine bewegen sich nun gemäß ihrer Größe mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und werden so aufgetrennt (145).

Die verwendeten Polyacrylamid-Gele wurden selbst hergestellt, die Zusammensetzung ist in Tabelle 2-12 aufgelistet. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und nach der vollständigen Polymerisation mit dem Sammelgel überschichtet. Mit Hilfe eines Kamms, der in das Sammelgel eingesetzt wurde, wurden entsprechend 10 oder 15 Geltaschen erhalten. Gele für die Analyse von Proben, die später auf die Totalproteinmenge normiert wurden, enthielten zusätzlich 1,5 % Trichlorethanol. Unter UV-Licht reagieren die Tryptophan-Reste der Proteine mit dem Trichlorethanol und bilden ein Fluorophor aus (146). Auf diese Weise lassen sich anschließend die einzelnen Proteinbanden unter UV-Licht sichtbar machen.

Die fertigen Gele wurden in eine Gelelektrophorese-Kammer eingesetzt und die Kammer mit 1× Elektrophoresepuffer befüllt. Anschließend wurden die Taschen mit den vorbereiteten Proben beladen und zusätzlich ein Größenstandard (PageRuler Plus Protein Ladder Prestained oder Unstained) mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 130 V für etwa 1,5 h durchgeführt. Die Trichlorethanol-haltigen Gele wurden anschließend mit Hilfe des

Geldokumentationssystem für 5 min mittels UV-Licht aktiviert, wodurch die aufgetrennten Proteinbanden sichtbar gemacht wurden.

**Tabelle 2-12: Zusammensetzung der Polyacrylamidgelen.**

	<b>Trenngel (11,5 %)</b>	<b>Sammelgel (5 %)</b>
Acrylamidlösung	6,50 ml	0,83 ml
Wasser	6,50 ml	3,60 ml
Tris-HCl Puffer 1,8 M	3,60 ml	-----
Tris-HCl Puffer 0,6 M	-----	0,50 ml
10 %-ige SDS-Lösung	167 µl	50 µl
TEMED	20 µl	10 µl
10 %-ige APS-Lösung	200 µl	50 µl
Trichlorethanol *	255 µl	-----

\* nur bei Gelen für die Totalproteinbestimmung

### 2.8.2 Western Blot

Mit Western-Blot oder auch Immunoblot wird ein Verfahren bezeichnet, bei dem die mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen und so fixiert werden. Anschließend können einzelne Proteine mithilfe von spezifischen Antikörpern detektiert und quantifiziert werden.

Dazu wurden die Proteine zunächst durch Elektroblothing, genauer *semidry*-Blotting, auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Beim *semidry*-Blotting befindet sich das Gel mit der Membran zwischen mit Anoden- bzw. Kathodenpuffer-getränkten Filterpapieren, und diese wiederum zwischen zwei Plattenelektroden. Beim Anlegen einer Spannung wandern die durch das angelagerte SDS negativ geladenen Proteine zur Anode. Durch hydrophobe Wechselwirkungen bleiben die Proteine an der Membranoberfläche haften (147). Der Transfer erfolgte bei 0,06 A pro Gel im Blotter für 65 min.

Nach dem Blotten wurde die Membran zunächst reversibel mit Ponceau S angefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen und so die Membranen entsprechend zuschneiden zu können. Im nächsten Schritt wurden die Membranen für 2 h in Blockierlösung (5 % Milchpulver in TBST oder 1 % BSA in TBST) inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen und unspezifische Bindung des Antikörpers zu vermeiden. Nachdem die Membranstreifen dreimal für 5 min in TBST-Puffer gewaschen wurden, wurden diese über



Nacht bei 4 °C in dem entsprechenden Primärantikörper (Tabelle 2-3) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer die Inkubation im Sekundärantikörper (Tabelle 2-4) für 2 h bei RT. An dem Sekundärantikörper war kovalent eine Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*; HRP) gebunden. Durch Zugabe der sogenannten ECL-Lösung (*enhanced chemiluminescence*), die Luminol und Wasserstoffperoxid enthielt, wurde eine Chemilumineszenz-Reaktion gestartet, die mittels Geldokumentationssystem detektiert werden konnte. Die densitometrische Auswertung der Blots erfolgte mit der Software Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad, USA; RRID:SCR\_014210).

Für die Detektion weiterer Proteine auf derselben Membran wurde diese zunächst zweimal für 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und anschließend für 20 Minuten in Stripping-Lösung inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (dreimal 5 min in TBST-Puffer) wurde die Membran, wie bereits beschrieben, blockiert und mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert.

## 2.9 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Jeder angegebene Wert repräsentiert eine Gruppe von unabhängigen, biologischen Replikaten. Die exakte Anzahl (n) ist bei den jeweiligen Abbildungen und Tabellen angegeben. Die Gruppengröße der *in vivo*-Experimente wurde mit Hilfe des Programms G\*Power 3.1 (RRID: SCR\_013726) ermittelt (148).

Für die statistische Auswertung und die Erstellung der Graphen wurde das Programm GraphPad Prism 9 (Version 9.0.1, GraphPad software Inc., USA; RRID: SCR\_002798) verwendet. Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurde die Normalverteilung der jeweiligen Werte überprüft. Zur Berechnung signifikanter Unterschiede zwischen mehreren Gruppen wurde bei normalverteilten Ergebnissen eine einfaktorische Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) und nachfolgendem Bonferroni's Post-hoc-Test durchgeführt. Der Post-hoc-test wurde nur durchgeführt wenn bei ANOVA der Wert  $F < 0.05$  war.

Nicht-normalverteilte Ergebnisse wurden mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Dunn's Post-hoc Test analysiert.

Statistische Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mittels ungepaarten Student's-t-Test (two-tailed, Konfidenz-Intervall 95%) berechnet.

Bei einem  $p$ -Wert  $< 0.05$  wurde das Ergebnis als statistisch signifikant gewertet und wie folgt gekennzeichnet: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Cinaciguat als Therapieoption in einem Mausmodell der DN

#### 3.1.1 Einfluss von Cinaciguat auf Krankheitszeichen des Diabetes mellitus

Um in den Versuchstieren einen Diabetes mellitus Typ I zu induzieren, wurde den Mäusen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen STZ (50 mg/kg KG/ Tag) i. p. injiziert. Zehn Tage nach der letzten STZ-Injektion wurde der Blutzuckerspiegel der Tiere bestimmt. Nur Tiere, die eine Blutglukosekonzentration von  $\geq 280$  mg/dl aufwiesen, wurden in die Studie eingeschlossen. Es wurden sowohl WT- als auch eNOS-KO-Mäuse in zwei Untersuchungszeiträumen von acht bzw. zwölf Wochen untersucht. Der sGC-Aktivator Cinaciguat (Cin) wurde jeweils in den letzten vier Wochen des Untersuchungszeitraums über das Futter verabreicht. In Tabelle 3-1 sind die Blutzuckerspiegel und das Körpergewicht der Versuchstiere am Ende des jeweiligen Versuchszeitraums beschrieben.

**Tabelle 3-1: Blutzuckerspiegel und Körpergewicht der Versuchstiere.**

Versuchsgruppe		Blutglukose [mg/dl]	Körpergewicht [g]
WT	Kontrolle n =	126 ± 4 13	28,1 ± 1,0 9
	8 Wo. DM n =	420 ± 23**** 11	24,1 ± 0,6* 12
	8 Wo. DM + Cin. n =	444 ± 39**** 7	23,9 ± 0,8* 9
	12 Wo. DM n =	483 ± 17**** 9	23,9 ± 0,7** 12
	12 Wo. DM + Cin. n =	494 ± 29**** 8	22,7 ± 1,1*** 11
eNOS-KO	Kontrolle n =	133 ± 7 13	29,0 ± 0,6 11
	8 Wo. DM n =	514 ± 14**** 10	22,7 ± 0,6**** 12
	8 Wo. DM + Cin. n =	366 ± 53****.# 9	21,7 ± 1,0**** 10
	12 Wo. DM n =	496 ± 14**** 12	23,1 ± 0,7**** 12
	12 Wo. DM + Cin. n =	513 ± 26**** 6	22,0 ± 1,0**** 10



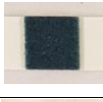







Mittelwerte ± S.E.M.; \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*\*:  $p < 0,05$ ; 0,01; 0,001; 0,0001 versus Kontrolle; #.  $p < 0,01$  versus 8 Wo. DM; (One-way ANOVA mit Bonferroni's Post-hoc-Test) DM – Diabetes mellitus; Cin. – Cinaciguat

Alle mit STZ behandelten Tiere wiesen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe einen hoch signifikanten Anstieg der Blutglukosespiegel auf, was auf die erfolgreiche Induktion eines Diabetes hinweist. Die zusätzliche Behandlung mit Cinaciguat zeigte dabei keinen Einfluss auf die Blutzuckerwerte. Zu beachten ist hierbei, dass aufgrund des limitierten Messbereichs des verwendeten Blutzuckermessgerätes, einzelne Messwerte  $> 600$  mg/dl in der Statistik nicht berücksichtigt werden konnten.

Des Weiteren führte die Induktion des Typ-1-DM bei allen behandelten WT- und eNOS-KO Tieren zu einer deutlichen Reduktion des Körpergewichts. Im Vergleich zu den gleichaltrigen gesunden Mäusen war das Körpergewicht der erkrankten WT-Tiere im Durchschnitt um 16 % und das der diabetischen eNOS-KO-Tiere um 23 % verringert. Die Gabe von Cinaciguat hatte auch auf das Körpergewicht keinen erkennbaren Einfluss.

Ein weiteres typisches Symptom eines Diabetes mellitus ist die übermäßige Ausscheidung von Glukose über den Urin. Diese sogenannte Glukosurie wurde semiquantitativ mit Hilfe von Harnteststreifen untersucht. Alle STZ-behandelten WT- und eNOS-KO-Tiere wiesen eine deutlich ausgeprägte Glukosurie auf, die ebenfalls nicht durch den sGC-Aktivator Cinaciguat beeinflusst wurde (Tabelle 3-2).

**Tabelle 3-2: Untersuchung der Glukosurie mittels Harnteststreifen.**

Versuchsgruppe	Teststreifen	Glukose [mg/dl]	Teststreifen	Glukose [mg/dl]
	WT		eNOS-KO	
<b>Kontrolle</b>		negativ		negativ
<b>8 Wo. DM</b>		$\geq 1000$		$\geq 1000$
<b>8 Wo. DM + Cin.</b>		$\geq 1000$		$\geq 1000$
<b>12 Wo. DM</b>		$\geq 1000$		$\geq 1000$
<b>12 Wo. DM + Cin.</b>		$\geq 1000$		$\geq 1000$

DM – Diabetes mellitus; Cin. – Cinaciguat

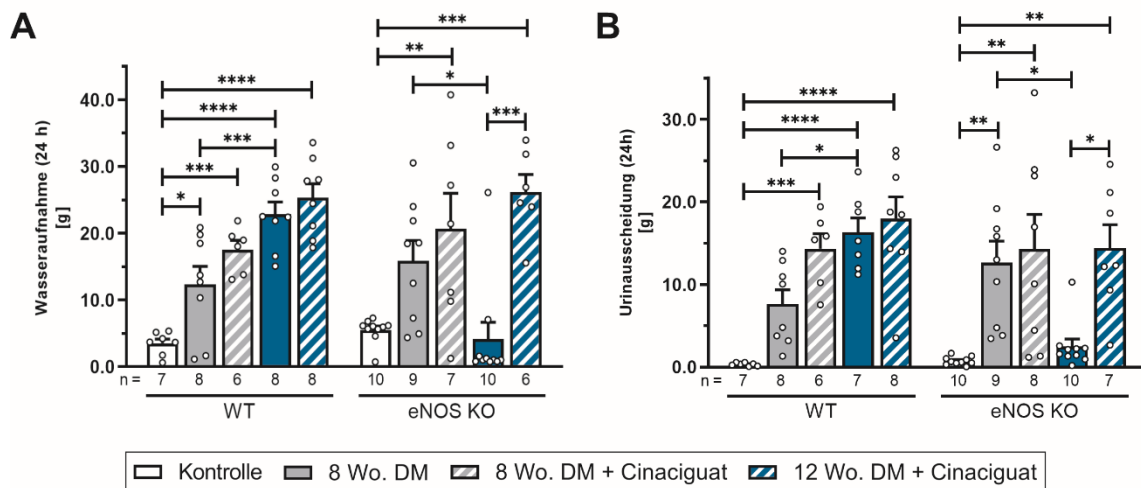
Polyurie und Polydipsie sind ebenfalls typische Charakteristika eines Diabetes mellitus. Um zu klären, ob die tägliche Urinausscheidung und Wasseraufnahme auch bei den STZ-behandelten Versuchstieren erhöht ist, wurden diese für 24 h in einen Stoffwechsellkäfig gesetzt, der es ermöglicht den ausgeschiedenen Urin separat zu sammeln und die Trinkmenge zu bestimmen. In der Tabelle 3-3 und der Abbildung 3-1 sind die so erhaltenen Daten numerisch und grafisch dargestellt.

Die Wasseraufnahme der WT-Mäuse war bereits nach acht Wochen Diabetes im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erhöht (3,5-fache Menge) und steigerte sich nochmals signifikant nach zwölf Wochen (6,5-fache Menge). Die Trinkmenge der mit Cinaciguat behandelten WT-Mäuse war im Vergleich zu den unbehandelten Diabetes-Tieren leicht, aber nicht signifikant erhöht. Auch die ausgeschiedene Urinmenge war bei den WT-Mäusen durch den DM deutlich erhöht. Nach acht Wochen wurde das Urinvolumen um das 22-fache, nach zwölf Wochen signifikant um das 53-fache gesteigert. Auch die Urinmenge war durch die Gabe von Cinaciguat leicht, aber nicht statistisch signifikant erhöht.

**Tabelle 3-3: Untersuchung der täglichen Wasseraufnahme und Urinausscheidung.**

Versuchsgruppe		Wasseraufnahme [g]	Urinausscheidung [g]
WT	Kontrolle n =	3,50 ± 0,66 7	0,34 ± 0,07 7
	8 Wo. DM n =	12,34 ± 2,71* 8	7,63 ± 1,73 8
	8 Wo. DM + Cin. n =	17,55 ± 1,40*** 6	14,33 ± 1,84*** 6
	12 Wo. DM n =	22,84 ± 1,85****, ### 8	16,32 ± 1,73****, # 7
	12 Wo. DM + Cin. n =	25,37 ± 2,04**** 8	17,98 ± 2,64**** 8
eNOS-KO	Kontrolle n =	5,51 ± 0,58 10	0,76 ± 0,16 10
	8 Wo. DM n =	15,84 ± 3,04 9	12,64 ± 2,62** 9
	8 Wo. DM + Cin. n =	20,68 ± 5,32** 7	14,29 ± 4,21** 8
	12 Wo. DM n =	4,15 ± 2,51# 10	2,50 ± 0,89# 10
	12 Wo. DM + Cin. n =	26,12 ± 2,67***, §§§ 6	14,40 ± 2,84**, § 7

Mittelwerte ± S.E.M.; \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*: p < 0,05; 0,01; 0,001; 0,0001 versus Kontrolle; #, ###: p < 0,05; 0,001 versus 8 Wo. DM; §, §§§: p < 0,05; 0,001 versus 12 Wo. DM; (One-way ANOVA mit Bonferroni's post-Test) DM – Diabetes mellitus; Cin. – Cinaciguat



**Abbildung 3-1: Tägliche Wasseraufnahme und Urinausscheidung.**

Zur Bestimmung der **A** täglichen Wasseraufnahme und **B** der täglichen Urinausscheidung wurden die Versuchstiere einzeln für 24 h in einen Stoffwechselkäfig gesetzt.

\*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*:  $p < 0,05$ ;  $0,01$ ;  $0,001$ ;  $0,0001$  (*One-way* ANOVA mit Bonferroni's Post-hoc-Test).

Die Stoffwechselfparameter der eNOS-KO-Tiere nach acht Wochen Diabetes ähneln denen der WT-Mäuse. Im Vergleich zu gesunden Mäusen war die Wasseraufnahme um das 2,9-fache und das ausgeschiedene Urinvolumen signifikant um das 16,6-fache erhöht. Die zusätzliche Gabe von Cinaciguat erhöhte die beiden Volumina jeweils leicht, aber nicht statistisch signifikant. Bei den eNOS-KO-Tieren nach zwölf Wochen DM hingegen waren die aufgenommene Wassermenge und die Urinausscheidung signifikant niedriger als bei den Tieren nach acht Wochen DM und entsprachen in etwa den Daten der gesunden Kontrolltiere. Bei den Tieren, die zusätzlich Cinaciguat erhielten, waren Wasseraufnahme und Urinausscheidung im Vergleich zu den Mäusen, die keinen sGC-Aktivatoren erhielten, stark erhöht.

### 3.1.2 Einfluss von Cinaciguat auf den Blutdruck

Bluthochdruck ist eine häufige Begleiterscheinung des Diabetes mellitus und der diabetischen Nephropathie. Deshalb wurde bei den Versuchstieren mit Hilfe der nicht-invasiven *Tail-Cuff*-Plethysmografie der systolische Blutdruck bestimmt. Sowohl bei den WT-Tieren als auch bei den eNOS-KO-Mäusen führte die Diabeteserkrankung, insbesondere nach zwölf Wochen, zu erhöhten systolischen Blutdruckwerten (Tabelle 3-4 und Abbildung 3-2 A).

Bei den WT-Mäusen stieg der Blutdruck nach acht Wochen Diabetes im Schnitt um 22 mmHg, nach zwölf Wochen um 32 mmHg. Die eNOS-KO-Tiere wiesen nach acht Wochen einen um etwa 10 mmHg höheren Blutdruck als die gesunden Mäuse auf und zeigten nach zwölf Wochen Diabetes eine signifikante Erhöhung um etwa 24 mmHg.

Tabelle 3-4: Bestimmung des systolischen Blutdrucks.

Versuchsgruppe		Systolischer Blutdruck [mmHg]
WT	Kontrolle n = 8	117 ± 3
	8 Wo. DM n = 4	139 ± 8
	8 Wo. DM + Cin. n = 5	131 ± 9
	12 Wo. DM n = 9	149 ± 6**
	12 Wo. DM + Cin. n = 7	142 ± 6*
eNOS-KO	Kontrolle n = 8	131 ± 5
	8 Wo. DM n = 9	141 ± 5
	8 Wo. DM + Cin. n = 6	139 ± 7
	12 Wo. DM n = 11	155 ± 4**
	12 Wo. DM + Cin. n = 9	145 ± 3

Mittelwerte ± S.E.M.; \*, \*\*: p < 0,05; 0,01 versus Kontrolle (*One-way* ANOVA mit Bonferroni's post-Test)  
DM – Diabetes mellitus; Cin. – Cinaciguat

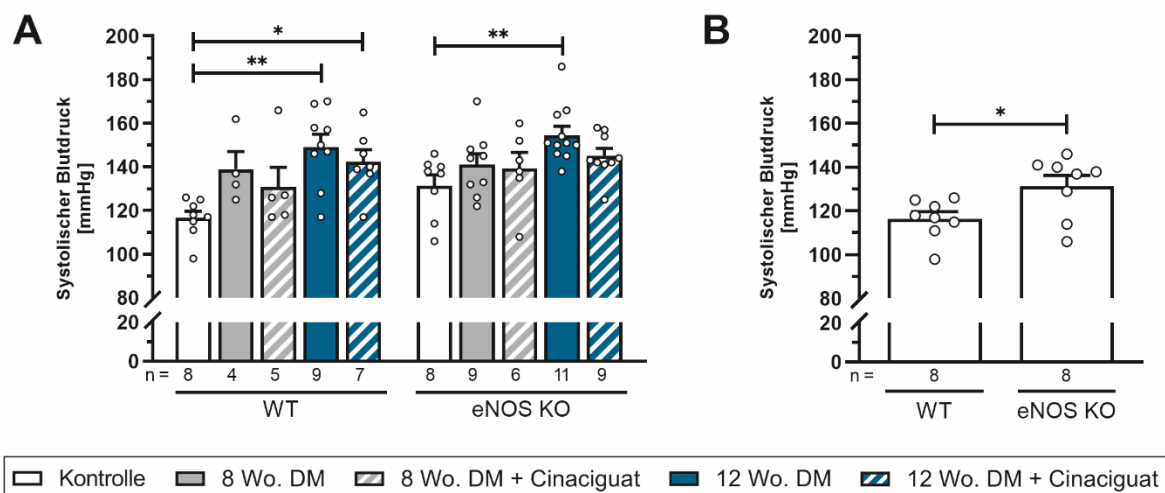


Abbildung 3-2: Grafische Darstellung der systolischen Blutdruckwerte.

**A** Blutdruck der einzelnen Versuchsgruppen im Vergleich. **B** Vergleich der Blutdrücke von WT- und eNOS-KO-Kontrolltieren.

\*, \*\*: p < 0,05; 0,01; (**A** *One-way* ANOVA mit Bonferroni's Post-hoc-Test; **B** Student's t-Test)

Die Blutdrucksteigerungen bei den WT-Tieren sind also deutlich ausgeprägter, als bei den eNOS-KO-Mäusen. Der direkte Vergleich von WT- und eNOS-KO-Kontrolltieren zeigt jedoch, dass alleine der Verlust der eNOS bereits zu einer Hypertonie führt (Abbildung 3-2 B). Die Behandlung mit Cinaciguat führte in beiden untersuchten Genotypen nur zu einer sehr geringen und nicht signifikanten Erniedrigung des Blutdrucks.

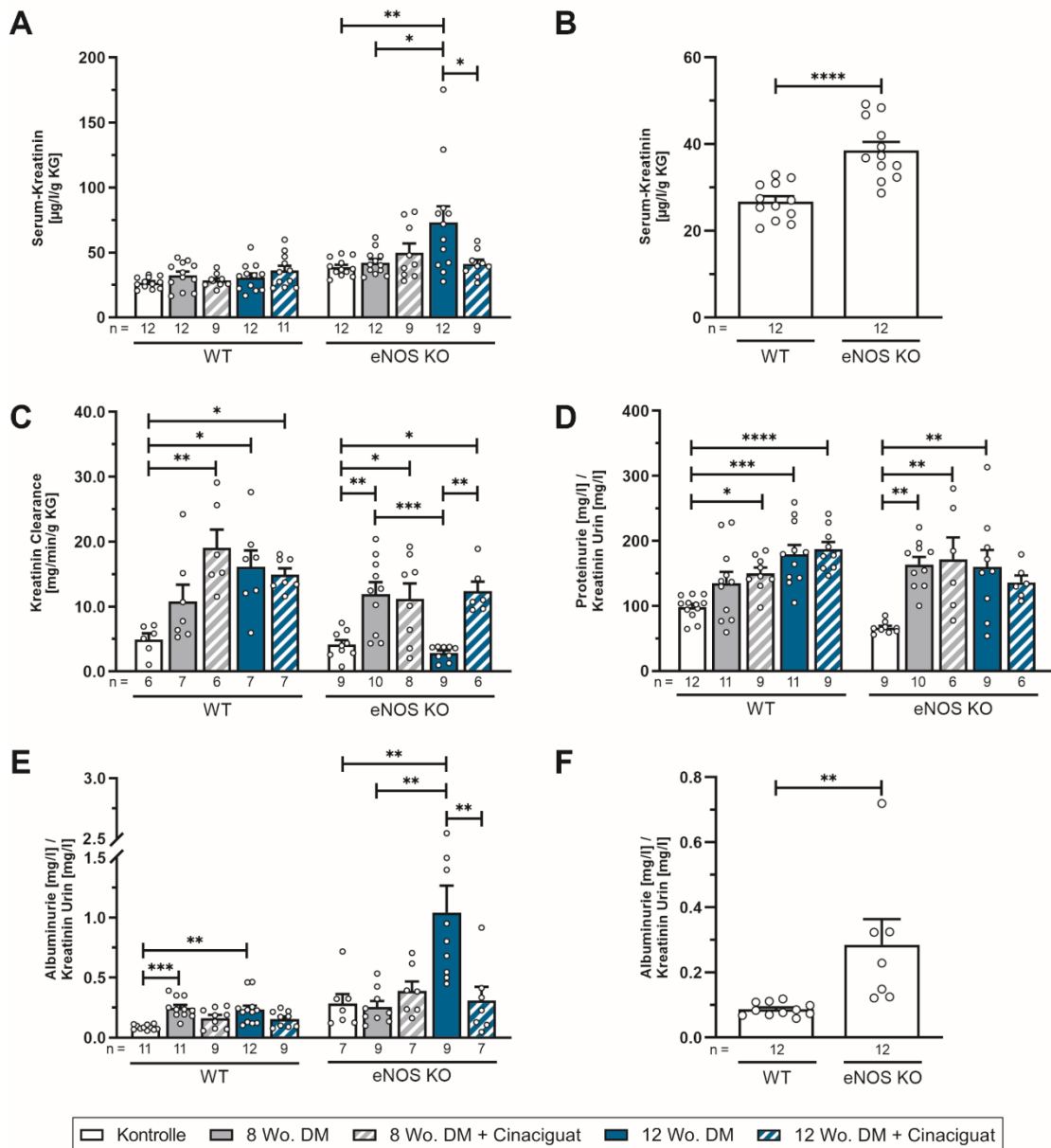
### 3.1.3 Einfluss von Cinaciguat auf verschiedene Nierenparameter

Mit Hilfe verschiedener Nierenparameter kann beurteilt werden, inwieweit die Nierenfunktion aufgrund des Diabetes mellitus eingeschränkt ist. Die Serum-Kreatininkonzentration ist dabei einer der wichtigsten Laborparameter für die Untersuchung der Nierenfunktion. Kreatinin ist das Abbauprodukt von Kreatin und wird über die Nieren ausgeschieden. Bei einer beeinträchtigten Nierenfunktion kommt es deshalb zu einem deutlichen Anstieg der Kreatininspiegel im Blut. Bei den WT-Tieren konnte aufgrund des DM weder nach acht noch nach zwölf Wochen eine signifikante Zunahme der Kreatininwerte festgestellt werden (Tabelle 3-5, Abbildung 3-3 A).

**Tabelle 3-5: Untersuchung verschiedener Nierenparameter.**

Versuchsgruppe		Serum-Kreatinin [µg/l/g KG]	Kreatinin-Clearance [mg/min/g KG]	Proteinurie/ Kreatinin (Urin) [mg/l]/[mg/l]	Albuminurie/ Kreatinin (Urin) [mg/l]/[mg/l]
WT	Kontrolle n =	26,73 ± 1,23 12	4,93 ± 0,94 6	98,1 ± 5,1 12	0,09 ± 0,01 11
	8 Wo. DM n =	32,20 ± 3,02 12	10,75 ± 2,60 7	135,1 ± 17,6 11	0,25 ± 0,03***
	8 Wo. DM + Cin. n =	28,45 ± 1,73 9	19,08 ± 2,79** 6	149,9 ± 9,0* 9	0,16 ± 0,03
	12 Wo. DM n =	30,80 ± 3,03 12	16,09 ± 2,59* 7	179,3 ± 14,5*** 11	0,22 ± 0,04**
	12 Wo. DM + Cin. n =	35,90 ± 3,82 11	14,94 ± 0,95* 7	187,4 ± 10,9**** 9	0,16 ± 0,02
eNOS-KO	Kontrolle n =	38,54 ± 1,96 12	4,15 ± 0,70 9	66,6 ± 3,0 9	0,28 ± 0,08 7
	8 Wo. DM n =	42,12 ± 2,75 12	11,94 ± 1,82** 10	163,8 ± 11,6** 10	0,26 ± 0,05 9
	8 Wo. DM + Cin. n =	49,90 ± 7,00 9	11,20 ± 2,35* 7	171,8 ± 33,4** 6	0,39 ± 0,08 7
	12 Wo. DM n =	73,13 ± 12,30***# 12	2,85 ± 0,38### 9	159,9 ± 26,2** 9	1,04 ± 0,23***## 9
	12 Wo. DM + Cin. n =	41,08 ± 3,34§ 9	12,35 ± 1,50*.§§ 6	136,4 ± 10,5 6	0,38 ± 0,12§§ 8

Mittelwerte ± S.E.M.; \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*: p < 0,05; 0,01; 0,001; 0,0001 versus Kontrolle; #, ##, ###: p < 0,05; 0,01; 0,001 versus 8 Wo. DM; §, §§: p < 0,05; 0,01 versus 12 Wo. DM; (One-way ANOVA mit Bonferroni's Post-hoc-Test) DM – Diabetes mellitus; Cin. – Cinaciguat; KG – Körpergewicht.



**Abbildung 3-3: Grafische Darstellung der untersuchten Nierenparameter.**

**A** Serum-Kreatininkonzentrationen der einzelnen Versuchsgruppen. **B** Vergleich basaler Serum-Kreatininspiegel von WT- und eNOS-KO-Kontrolltieren. **C** Die Kreatinin-Clearance wurde als Maß für die GFR bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach der Formel, die in Abschnitt 2.3.2 beschrieben ist. **D** Die im Urin ausgeschiedene Proteinkonzentration wurde mit der Lowry-Methode bestimmt und anschließend auf die Kreatininkonzentration im Urin normiert. **E** Vergleich der Albuminurie zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Hierfür wurden die Albuminkonzentrationen auf die Kreatininkonzentration im Urin normiert. **F** Vergleich der basalen Albuminkonzentrationen im Urin von WT- und eNOS-KO-Kontrolltieren.

\*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*:  $p < 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001$  (**A, C, D, E** One-way ANOVA mit Bonferroni's Post-hoc-Test; **B, F** Student's t-Test).



---

Die eNOS-KO-Mäuse zeigten nach acht Wochen Diabetes ebenfalls noch keine Erhöhung. Nach dem längeren Untersuchungszeitraum von zwölf Wochen, stiegen die Serumkreatininkonzentrationen der eNOS-KO-Tiere im Vergleich zur Kontroll- und 8-Wochen-Diabetesgruppe jedoch deutlich an und verdoppelten sich nahezu. Die 12-Wochen-Diabetes-Tiere, die zusätzlich mit Cinaciguat behandelt wurden, wiesen hingegen signifikant reduzierte Serum-Kreatininspiegel auf, die in etwa auf dem Niveau der unbehandelten eNOS-KO-Mäuse lagen. Der direkte Vergleich der Serum-Kreatininwerte von unbehandelten WT- und eNOS-KO-Mäusen, zeigte außerdem, dass bereits die basalen Kreatininspiegel im eNOS-KO signifikant erhöht waren (Tabelle 3-5, Abbildung 3-3 B).

Ein weiterer bedeutender Parameter für die Überprüfung der Nierenfunktion ist die GFR. Definitionsgemäß ist die GFR das Volumen Plasmawasser, welches pro Minute in den Nieren filtriert wird. In der frühen Phase eines DM tritt häufig eine glomeruläre Hyperfiltration auf und kann ein Anzeichen für eine beginnende Nierenschädigung sein. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung nimmt die Filtrationsleistung der Niere stetig ab und die GFR sinkt (12, 149). Zur Abschätzung der GFR wird in der Praxis häufig die Kreatinin-Clearance bestimmt. Bei den WT-Tieren verdoppelte sich die Kreatinin-Clearance nach acht Wochen Diabetes und verdreifachte sich nach zwölf Wochen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen. Die zusätzliche Gabe von Cinaciguat hatte bei den WT-Tieren keinen signifikanten Effekt auf die Filtrationsleistung der Niere.

Bei den eNOS-KO-Mäusen nach acht Wochen Diabetes verdoppelte sich die Kreatinin-Clearance ebenfalls, unabhängig davon, ob die Tiere Cinaciguat erhalten haben oder nicht. Nach zwölf Wochen jedoch zeigte sich ein starker, statistisch signifikanter Abfall der Kreatinin-Clearance, verglichen zu den eNOS-KO-Tieren nach acht Wochen Diabetes. Die Filtrationsleistung sank sogar unter den Wert der Kontrolltiere auf durchschnittlich nur noch 56 %. Allerdings war diese Reduktion nicht statistisch signifikant. Die Kreatinin-Clearance der eNOS-KO-Tiere nach zwölf Wochen Diabetes, die zusätzlich Cinaciguat erhielten, lag hingegen durchschnittlich viermal so hoch (Tabelle 3-5, Abbildung 3-3 C).

Normalerweise werden bei Gesunden über den Urin nur sehr geringe Mengen Protein mit niedrigem Molekulargewicht ausgeschieden. Proteine mit hohem Molekulargewicht, wie Albumin, werden aufgrund ihrer Größe und Ladung im glomerulären Filter zurückgehalten. Pathologische Prozesse, wie Entzündungen führen allerdings zu einer Beeinträchtigung der Filtermembran, die dadurch auch für große Proteine durchlässig wird, was sich letztlich als Proteinurie manifestiert. Während mit der Bestimmung der Gesamtproteinkonzentrationen

im Urin Hinweise für eine Nierenschädigung im Allgemeinen erhalten werden können, handelt es sich bei der Albuminurie um einen spezifischen Marker für pathologische Veränderungen der Glomeruli. Da die ausgeschiedenen Urinkonzentrationen je nach Wasseraufnahme der einzelnen Tiere starken Schwankungen unterliegen, wurden die erhaltenen Messwerte auf die jeweiligen Kreatininkonzentration im Urin normiert. Sowohl diabetische WT- als auch eNOS-KO-Tiere zeigten unabhängig vom Versuchszeitraum im Vergleich zu den gesunden Wurfgeschwistern eine deutlich vermehrte Proteinausscheidung im Urin. Die Behandlung mit Cinaciguat verringerte die Proteinurie allerdings in keinem der beiden Genotypen signifikant (Tabelle 3-5, Abbildung 3-3 D). Des Weiteren war eine deutliche Albuminurie bei den diabetischen Tieren beider Genotypen detektierbar (Tabelle 3-5, Abbildung 3-3 E). Die diabetischen WT-Tiere schieden nach acht und zwölf Wochen etwa 2,5-fach höhere Albuminmengen aus, als die gesunden Kontrolltiere. Die Gabe von Cinaciguat verringerte die Albuminurie der WT-Mäuse jedoch nur geringfügig und nicht signifikant. Im Gegensatz dazu zeigten die eNOS-KO-Tiere nach acht Wochen DM, verglichen zur Kontrollgruppe, noch keinen Anstieg der Albuminausscheidung. Nach zwölf Wochen hingegen, stieg die Albuminkonzentration im Urin durchschnittlich um das 3,7-fache. Durch die Gabe des sGC-Aktivators konnte dieser Anstieg jedoch erfolgreich verhindert werden. Anzumerken sind hier außerdem die signifikant erhöhten basalen Albuminlevel im Urin der eNOS-KO-Kontrolltiere gegenüber den gesunden WT-Mäusen (Abbildung 3-3 F).

In der Literatur wurde oftmals eine Nierenhypertrophie bei Diabetes mellitus beschrieben (150), weshalb auch in dieser Arbeit das jeweilige Gesamtgewicht der isolierten Nieren bestimmt wurde (Tabelle 3-6). Sowohl bei den WT- als auch eNOS-KO-Mäusen konnten aufgrund der diabetischen Bedingungen nur geringe und keine statistisch signifikanten Unterschiede der absoluten Nierengewichte festgestellt werden. Der direkte Vergleich der gleichaltrigen WT- und eNOS-Kontrolltiere zeigte jedoch, dass die Nieren von eNOS-KO-Mäusen grundsätzlich deutlich kleiner waren ( $p < 0,01$ ; t-Test).

Beim Vergleich des Nieren-zu-Körpergewicht-Verhältnisses konnten hingegen deutlichere Veränderungen bei den Diabetes-Tieren beider Genotypen festgestellt werden. Bei den WT-Tieren nach zwölf Wochen DM, war die Zunahme des Nieren-zu-Körpergewicht-Verhältnisses am deutlichsten ausgeprägt. Allerdings muss dabei auch beachtet werden, dass die Tiere aufgrund der Erkrankung ein deutlich geringeres Körpergewicht aufwiesen, als gleichaltrige gesunde Mäuse (siehe Tabelle 3-1). Die Gabe von Cinaciguat zeigte bei keinem der Genotypen einen deutlichen Einfluss auf die Größe der Nieren.

Tabelle 3-6: Gesamtgewicht der isolierten Nieren.

Versuchsgruppe		Nierengewicht [g]	Nierengewicht/ KG [%]
WT	Kontrolle n =	0,416 ± 0,017 9	1,54 ± 0,04 9
	8 Wo. DM n =	0,410 ± 0,023 12	1,71 ± 0,09 12
	8 Wo. DM + Cin. n =	0,441 ± 0,021 9	1,84 ± 0,05 9
	12 Wo. DM n =	0,479 ± 0,018 12	2,01 ± 0,06* 12
	12 Wo. DM + Cin. n =	0,461 ± 0,022 11	2,09 ± 0,17** 11
eNOS-KO	Kontrolle n =	0,334 ± 0,015 11	1,15 ± 0,04 11
	8 Wo. DM n =	0,373 ± 0,013 12	1,65 ± 0,07*** 12
	8 Wo. DM + Cin. n =	0,330 ± 0,020 10	1,52 ± 0,07* 10
	12 Wo. DM n =	0,342 ± 0,016 12	1,50 ± 0,08 12
	12 Wo. DM + Cin. n =	0,386 ± 0,014 10	1,80 ± 0,14**** 10

Mittelwerte ± S.E.M.; \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*: p < 0,05; 0,01; 0,001; 0,0001 versus Kontrolle (*One-way* ANOVA mit Bonferroni's Post-hoc-Test) DM – Diabetes mellitus; Cin. – Cinaciguat

### 3.1.4 Einfluss von Cinaciguat auf die renale Ausscheidung zyklischer Nukleotide

Cinaciguat ist in der Lage die sGC zu aktivieren, die dadurch vermehrt cGMP produziert (151). Um zu überprüfen, wie sich die Behandlung der Versuchstiere mit Cinaciguat auf die cGMP-Konzentration im Urin auswirkt, wurde diese mittels LC-MS/MS bestimmt. Da mit der verwendeten Analysemethoden nicht nur cGMP, sondern zeitgleich die Konzentrationen aller vier zyklischen Nukleotide bestimmt werden konnten, wurden zusätzlich cAMP, cCMP und cUMP untersucht. Allerdings lagen die Konzentrationen von cCMP und cUMP im Urin teilweise unterhalb der Nachweisgrenze, weshalb diese nicht ausgewertet werden konnten. In Tabelle 3-7 und Abbildung 3-4 sind die Ergebnisse der Analysen von cGMP und cAMP im Urin numerisch und graphisch dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Konzentrationen jeweils auf die Kreatininkonzentrationen im Urin normiert.

Bei den WT-Tieren führte die Induktion des DM zu einer signifikanten Zunahme der cGMP- und cAMP-Konzentrationen im Urin. Im Vergleich zu den gesunden WT-Mäusen erhöhte

sich die cGMP-Ausscheidung nach acht Wochen Diabetes durchschnittlich um das 2,5-fache, nach zwölf Wochen um das 2,9-fache. Die cAMP-Konzentration wurde nach acht Wochen Diabetes um etwa das 1,4-fache und nach zwölf Wochen um das 1,8-fache gesteigert. Die Behandlung mit Cinaciguat führte zu einer sehr geringen und nicht signifikanten Zunahme der beiden zyklischen Nukleotide.

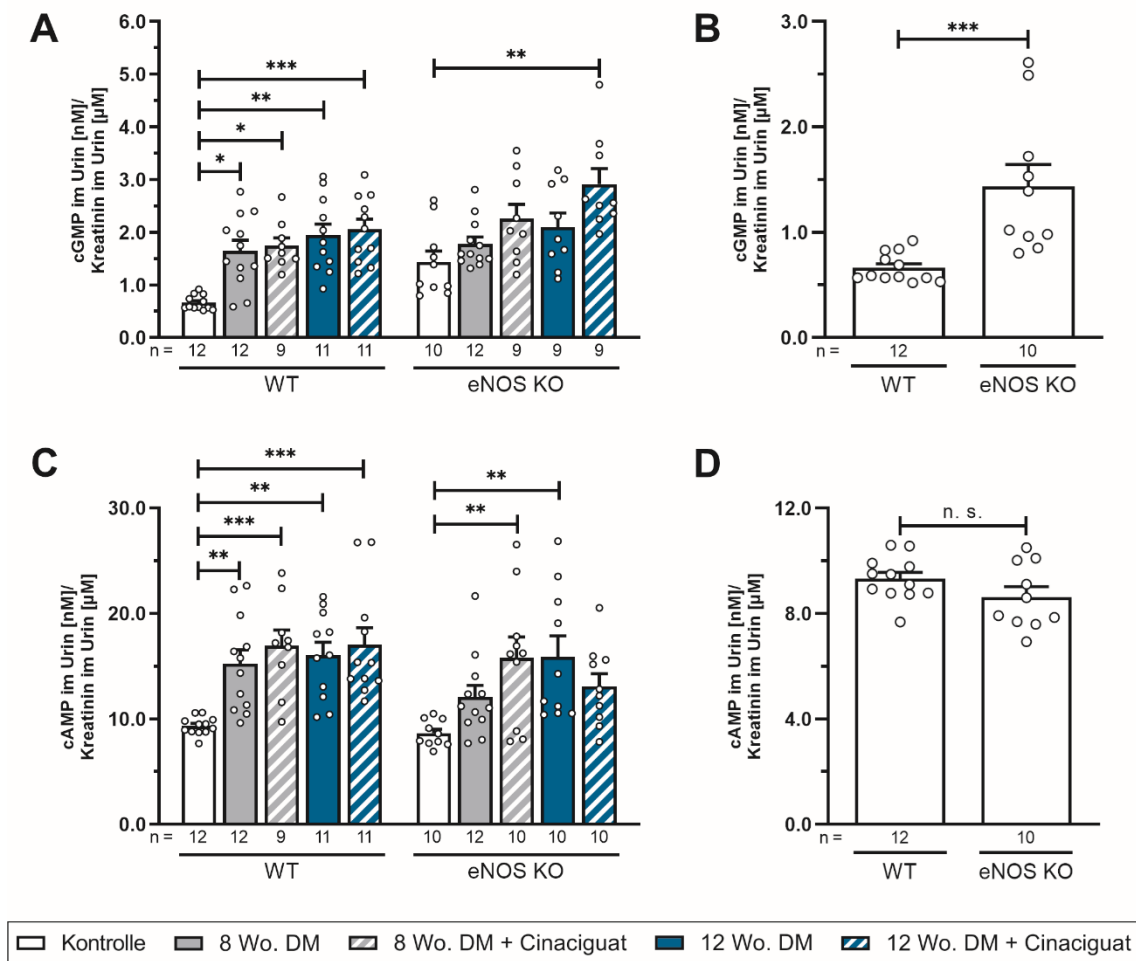
Diabetische eNOS-KO-Tiere zeigten gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren, keine signifikante Zunahme der cGMP-Ausscheidung, hier konnte lediglich eine leichte positive Tendenz beobachtet werden. Die Gabe von Cinaciguat führte zu einer weiteren Erhöhung der cGMP-Konzentrationen im Urin, im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Diabetestieren war diese jedoch nicht signifikant.

Der Einfluss der Hyperglykämie auf die cAMP-Konzentrationen im Urin der eNOS-KO-Tiere war gleich groß, wie bei den WT-Mäusen. Nach acht Wochen Diabetes stiegen die cAMP-Level um das 1,4-fache und nach zwölf Wochen signifikant um das 1,8-fache. Die Behandlung mit Cinaciguat führte zu keinen signifikanten Veränderungen.

**Tabelle 3-7: Bestimmung der cGMP- und cAMP-Ausscheidung im Urin.**

		Versuchsgruppe	cGMP (Urin) [nM]/ Kreatinin (Urin) [µM]	cAMP (Urin) [nM]/ Kreatinin (Urin) [µM]
WT	Kontrolle	n = 12	0,66 ± 0,04	9,32 ± 0,24
	8 Wo. DM	n = 12	1,65 ± 0,20*	15,23 ± 1,32**
	8 Wo. DM + Cin.	n = 9	1,74 ± 0,15*	16,91 ± 1,50***
	12 Wo. DM	n = 11	1,94 ± 0,21**	16,04 ± 1,24**
	12 Wo. DM + Cin.	n = 11	2,06 ± 0,19***	17,06 ± 1,60***
eNOS-KO	Kontrolle	n = 10	1,44 ± 0,21	8,63 ± 0,39
	8 Wo. DM	n = 12	1,78 ± 0,13	12,06 ± 1,10
	8 Wo. DM + Cin.	n = 9	2,25 ± 0,28	15,78 ± 2,00**
	12 Wo. DM	n = 9	2,10 ± 0,26	15,91 ± 1,96**
	12 Wo. DM + Cin.	n = 9	2,91 ± 0,30**	13,08 ± 1,20

Mittelwerte ± S.E.M.; \*, \*\*, \*\*\*: p < 0,05; 0,01; 0,001 (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test) DM – Diabetes mellitus; Cin. – Cinaciguat



**Abbildung 3-4: cGMP- und cAMP-Ausscheidung über den Urin.**

**A** cGMP-Konzentrationen im Urin, normiert auf die Urin-Kreatinin-Konzentration. **B** Vergleich der cGMP-Ausscheidung im Urin von WT- und eNOS-KO-Kontrolltieren. **C** cAMP-Konzentrationen im Urin, normiert auf die Urin-Kreatinin-Konzentration. **D** Vergleich der cAMP-Ausscheidung im Urin von WT- und eNOS-KO-Kontrolltieren.

\*, \*\*, \*\*\*:  $p < 0,05$ ;  $0,01$ ;  $0,001$  (**A, C** Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test; **B, C** Student's-t-Test).

Der direkte Vergleich der beiden Genotypen zeigte zudem, dass bereits die basalen cGMP-Konzentrationen im Urin der eNOS-KO-Tiere deutlich höher lagen als bei den WT-Mäusen. Im Durchschnitt schieden die eNOS-KO-Mäuse mehr als doppelt so viel cGMP über den Urin aus (Abbildung 3-4 B). Die basalen cAMP-Konzentrationen unterschieden sich hingegen nicht (Abbildung 3-4 D).

### 3.1.5 Untersuchung der fibrotischen Veränderungen in der Niere

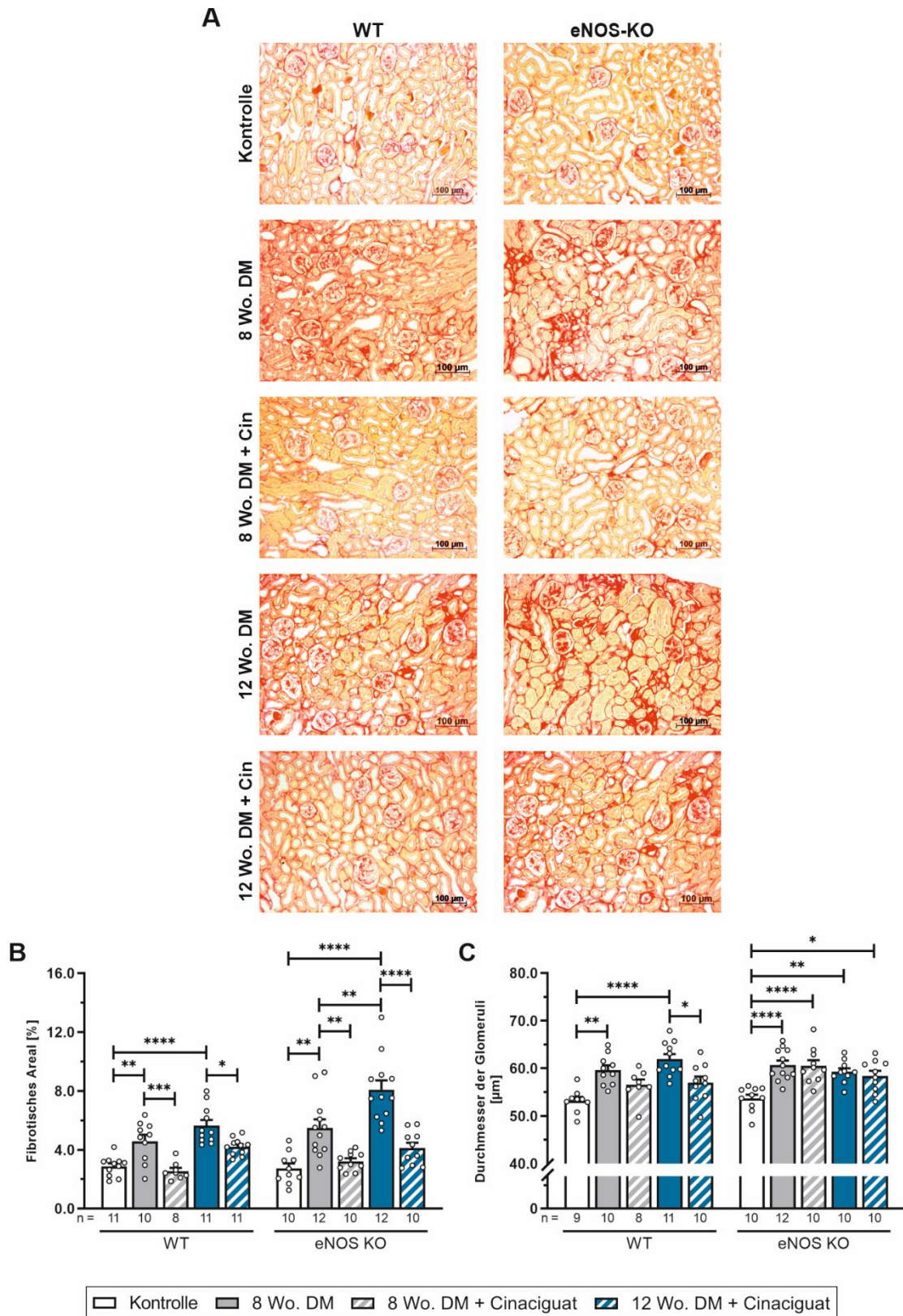
Während der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie kommt es zu fibrotischen Veränderungen in der Niere. Eine Fibrose zeichnet sich in der Regel durch eine überschießende Produktion und Akkumulation von extrazellulärer Matrix aus und ist häufig die Folge von chronischen Entzündungsprozessen. Bestandteil der ECM sind neben Kollagenen auch Hyaluronsäure oder Fibronectin (152).

Mit Hilfe der Pikro-Siriusrot-Färbung wurden diese Kollagene im Nierengewebe angefärbt, um die fibrotischen Veränderungen in den diabetischen Organen zu untersuchen. Mit dem Programm Image J wurde anschließend der prozentuale Anteil des fibrotischen Gewebes ermittelt, wodurch ein direkter Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen ermöglicht wurde. Für eine aussagekräftige Quantifizierung wurden von jeder Niere eines Versuchstiers zwei Paraffinschnitte gefärbt. Von jedem Schnitt wurden drei bis vier mikroskopische Aufnahmen ausgewertet und die Ergebnisse gemittelt.

Die Abbildung 3-5 A zeigt repräsentative Aufnahmen der einzelnen gefärbten Nierengewebe. In der Abbildung 3-5 B und in der Tabelle 3-8 sind die Ergebnisse der *Threshold*-Analyse sowohl grafisch als auch numerisch dargestellt. Sowohl in den WT- als auch in den eNOS-KO-Mäusen führte die STZ-Behandlung nach beiden Untersuchungszeiträumen zu einer signifikanten Zunahme der Kollagenablagerungen in der Niere. Dabei waren diese Effekte in den eNOS-KO-Nieren ausgeprägter, als in den gleich behandelten WT-Nieren. Während sich der fibrotische Anteil im Gewebe der WT-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren nach zwölf Wochen Diabetes fast verdoppelte, wurde dieser in den entsprechenden eNOS-KO-Mäusen beinahe verdreifacht.

Durch die zusätzliche Gabe von Cinaciguat konnte der Kollagenanteil in den Nieren von allen behandelten Tieren signifikant reduziert werden.

Um zu untersuchen, ob sich nach der Induktion des Diabetes eine glomeruläre Hypertrophie entwickelte, wurde auf den mit Pikro-Siriusrot gefärbten Schnitten zusätzlich die Größe der Glomeruli bestimmt. Je Versuchstier wurden die Durchmesser von mindestens 25 Glomeruli ausgemessen und gemittelt (Abbildung 3-5 C; Tabelle 3-8). Nach acht und zwölf Wochen Diabetes wiesen beide Genotypen gleichermaßen eine deutliche Vergrößerung der Glomeruli auf. Die Behandlung mit Cinaciguat hatte bei den eNOS-KO-Tieren keinen und bei den WT-Mäusen nur einen geringen Effekt auf den Durchmesser der Glomeruli.



**Abbildung 3-5: Untersuchung der Nierenfibrose und glomerulären Hypertrophie.**

**A** repräsentative Aufnahmen von Piko-Siriusrot-gefärbten Nierengeweben (Vergrößerung 160×). Die Kollagenablagerungen sind dunkelrot dargestellt. **B** Prozentualer Anteil des fibrotischen Gewebes. **C** Durchschnittliche Durchmesser der Glomeruli.

\*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*:  $p < 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001$  (One-way ANOVA mit Bonferroni's Post-hoc-Test).

Tabelle 3-8: Auswertung der Sirius-Rot-Färbung und glomerulären Hypertrophie.

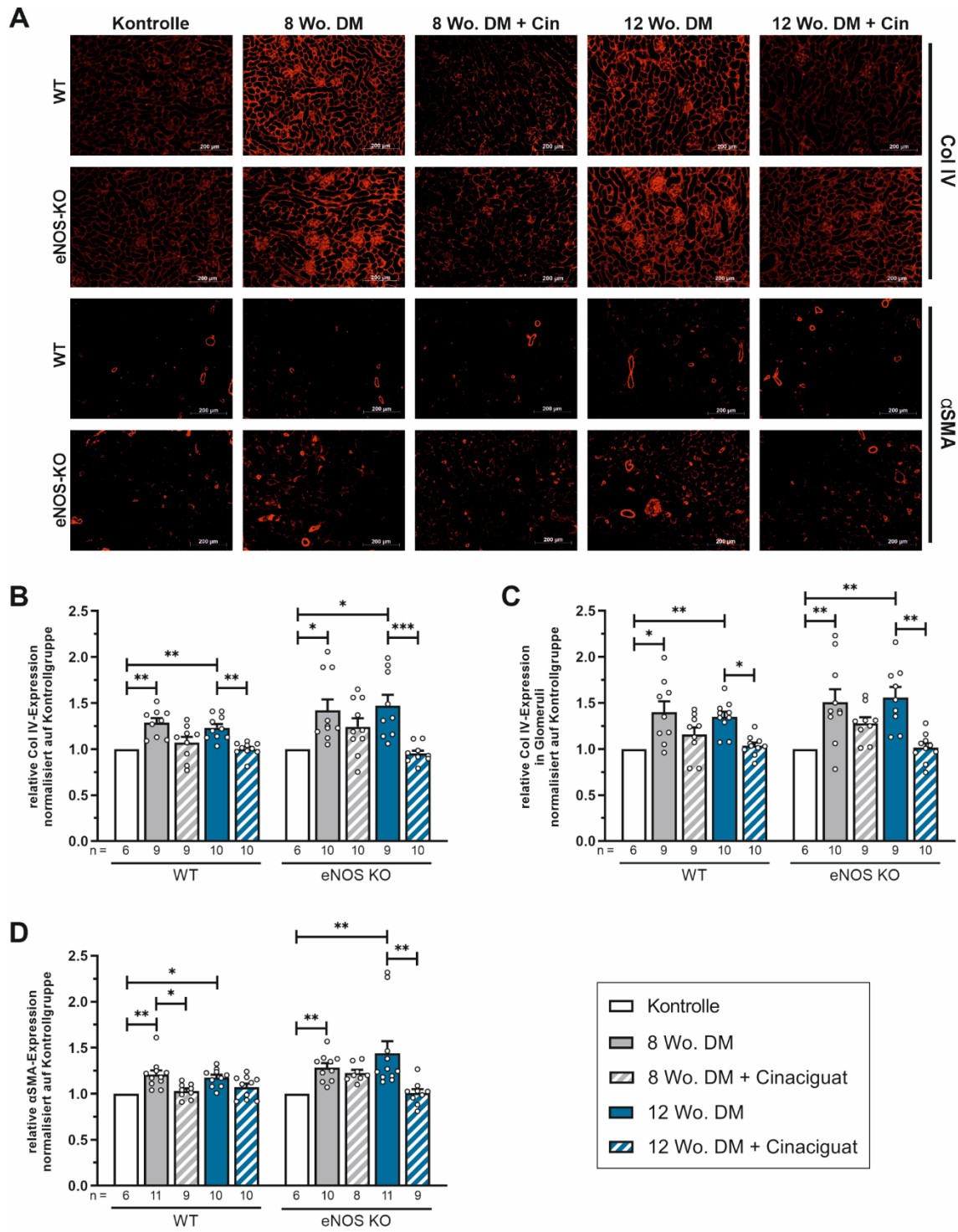
	Versuchsgruppe	Fibrotische Fläche [%]	Durchmesser Glomeruli [ $\mu\text{m}$ ]
WT	Kontrolle n =	2,88 $\pm$ 0,20 11	53,2 $\pm$ 0,8 9
	8 Wo. DM n =	4,59 $\pm$ 0,44** 10	59,6 $\pm$ 1,0** 10
	8 Wo. DM + Cin. n =	2,56 $\pm$ 0,21### 8	56,5 $\pm$ 1,1 8
	12 Wo. DM n =	5,64 $\pm$ 0,38**** 11	61,9 $\pm$ 1,1**** 11
	12 Wo. DM + Cin. n =	4,21 $\pm$ 0,17§ 11	57,0 $\pm$ 1,2§ 10
eNOS-KO	Kontrolle n =	2,74 $\pm$ 0,34 10	53,7 $\pm$ 0,8 10
	8 Wo. DM n =	5,49 $\pm$ 0,58** 12	60,7 $\pm$ 0,9**** 12
	8 Wo. DM + Cin. n =	3,23 $\pm$ 0,20## 10	60,5 $\pm$ 1,2**** 10
	12 Wo. DM n =	8,08 $\pm$ 0,64****.## 12	59,3 $\pm$ 0,7** 10
	12 Wo. DM + Cin. n =	4,11 $\pm$ 0,37§§§§ 10	58,4 $\pm$ 1,1* 10

Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.; \*, \*\*, \*\*\*\*:  $p < 0,05$ ;  $0,01$ ;  $0,001$ ;  $0,0001$  versus Kontrolle; ###,####:  $p < 0,05$ ;  $0,01$ ;  $0,001$  versus 8 Wo. DM; §, §§§§:  $p < 0,05$ ;  $0,0001$  versus 12 Wo. DM (*One-way ANOVA* mit Bonferroni's Post-hoc-Test) DM – Diabetes mellitus; Cin. – Cinaciguat

### 3.1.6 Immunhistochemische Untersuchung von Fibrosemarkern

Fibroblasten sind Zellen des Interstitiums und sind verantwortlich für die Produktion extrazellulärer Matrixproteine. Im fibrotischen Gewebe differenzieren diese zu sogenannten Myofibroblasten, die charakteristischerweise den Marker  $\alpha\text{SMA}$  exprimieren (153). In der gesunden Niere wird  $\alpha\text{SMA}$  nur in den Blutgefäßen exprimiert, während es unter pathologischen Bedingungen auch in den Mesangialzellen und im Interstitium gebildet wird (154). Collagen IV ist ein wichtiger Bestandteil der glomerulären Basalmembran und der extrazellulären Matrix des Interstitiums und spielt eine wichtige Rolle bei der diabetischen Nephropathie (155, 156). Beide Proteine sind demnach geeignete Marker, um fibrotische Veränderungen in der diabetischen Niere zu untersuchen. Mit Hilfe der Immunhistochemie ist es möglich, die Expression dieser Proteine in einem Paraffinschnitt zu detektieren und anschließend zu quantifizieren. In Abbildung 3-6 A sind repräsentative Aufnahmen der Col IV- und  $\alpha\text{SMA}$ -Expression in den Nierengeweben der einzelnen Versuchsgruppen dargestellt.





**Abbildung 3-6: Immunhistochemische Analyse weiterer Fibrosemarker in Nierengewebe nach der Induktion von DM.**

**A** Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Analyse von Col IV und  $\alpha$ SMA (Vergrößerung 160 $\times$ ) **B** Statistische Auswertung der Col IV-Expression in der Gesamtniere. **C** Statistische Auswertung der Col IV-Expression in den Glomeruli. **D** Statistische Auswertung der  $\alpha$ SMA-Expression in der Gesamtniere.

\*, \*\*, \*\*\*:  $p < 0,05$ ;  $0,01$ ;  $0,001$  (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test).

Sowohl in den WT- als auch in den eNOS-KO-Nieren war nach beiden Versuchszeiträumen eine deutliche, statistisch signifikante Zunahme der Col IV-Expression nachweisbar (Abbildung 3-6 B). Bei den WT-Mäusen erhöhten sich die Col IV-Level nach acht Wochen um durchschnittlich das 1,3-fache und nach zwölf Wochen um das 1,2-fache. Bei den eNOS-KO-Tieren steigerte sich die Expression nach acht und zwölf Wochen um etwa das 1,4-fache im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Behandlung mit Cinaciguat führte zu einer deutlichen Reduktion der Col IV-Level bei allen Versuchsgruppen.

Da Col IV auch ein wichtiger Bestandteil des Mesangiums ist, wurde des Weiteren die glomeruläre Col IV-Expression ausgewertet (Abbildung 3-6 C). Hierfür wurde die mittlere Fluoreszenzintensität von mindestens zehn Glomeruli pro Niere bestimmt. Die Ergebnisse ähnelten dabei denen der Gesamtniere. Aufgrund des Diabetes mellitus wurde bei den WT-Nieren nach beiden Untersuchungszeiträumen eine Zunahme der Col IV-Expression in den Glomeruli um durchschnittlich das 1,4-fache beobachtet. Die diabetischen eNOS-KO-Nieren wiesen eine 1,5-fach erhöhte Expression auf. Auch hier konnte durch die Behandlung mit Cinaciguat in beiden Genotypen gegenüber den unbehandelten Diabetes-Mäusen eine signifikante Erniedrigung der Col IV-Expression erreicht werden.

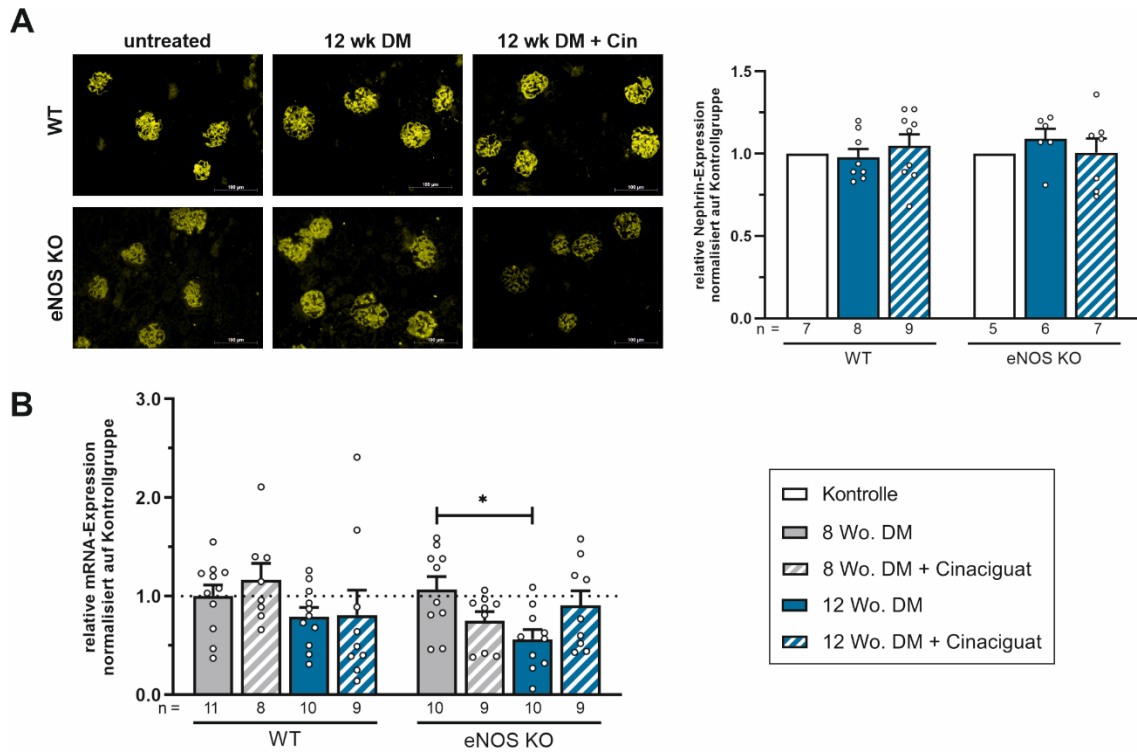
Die Auswertung der  $\alpha$ SMA-Expression zeigte, dass diese in den diabetischen WT-Nieren nach beiden Beobachtungszeiträumen im Mittel um das 1,2-fache gestiegen ist.

Bei den eNOS-KO-Tieren erhöhten sich die  $\alpha$ SMA-Level nach acht Wochen Diabetes um durchschnittlich das 1,3-fache und nach zwölf Wochen um das 1,4-fache im Vergleich zu den gesunden Mäusen. Die Gabe von Cinaciguat führte bei den WT-Mäusen, vor allem bei den Tieren nach acht Wochen Diabetes zu einer deutlichen Reduktion der  $\alpha$ SMA-Expression und bei den eNOS-KO-Tieren vor allem nach zwölf Wochen Diabetes (Abbildung 3-6 D).

### **3.1.7 Untersuchung der Podozytenschädigung**

Podozyten haften an der glomerulären Basalmembran und bilden mit ihren Fußfortsätzen die sogenannte Schlitzmembran aus. Sie sind damit ein wichtiger Bestandteil des glomerulären Filters, der verhindert, dass große Proteine aus dem Blut in den Primärharn gelangen.

Durch eine andauernde Hyperglykämie werden diese Zellen nachhaltig geschädigt. Die ausdifferenzierten Podozyten können dabei nicht regeneriert werden, sie gehen unweigerlich verloren. Bei der diabetischen Nephropathie stellt der Niedergang von Podozyten einen wichtigen Schlüsselmechanismus dar (157, 158). Das Protein Nephrin ist Bestandteil der Schlitzmembran und damit ein geeigneter Podozytenmarker.



**Abbildung 3-7: Analyse der Nephrinexpression in diabetischem Nierengewebe.**

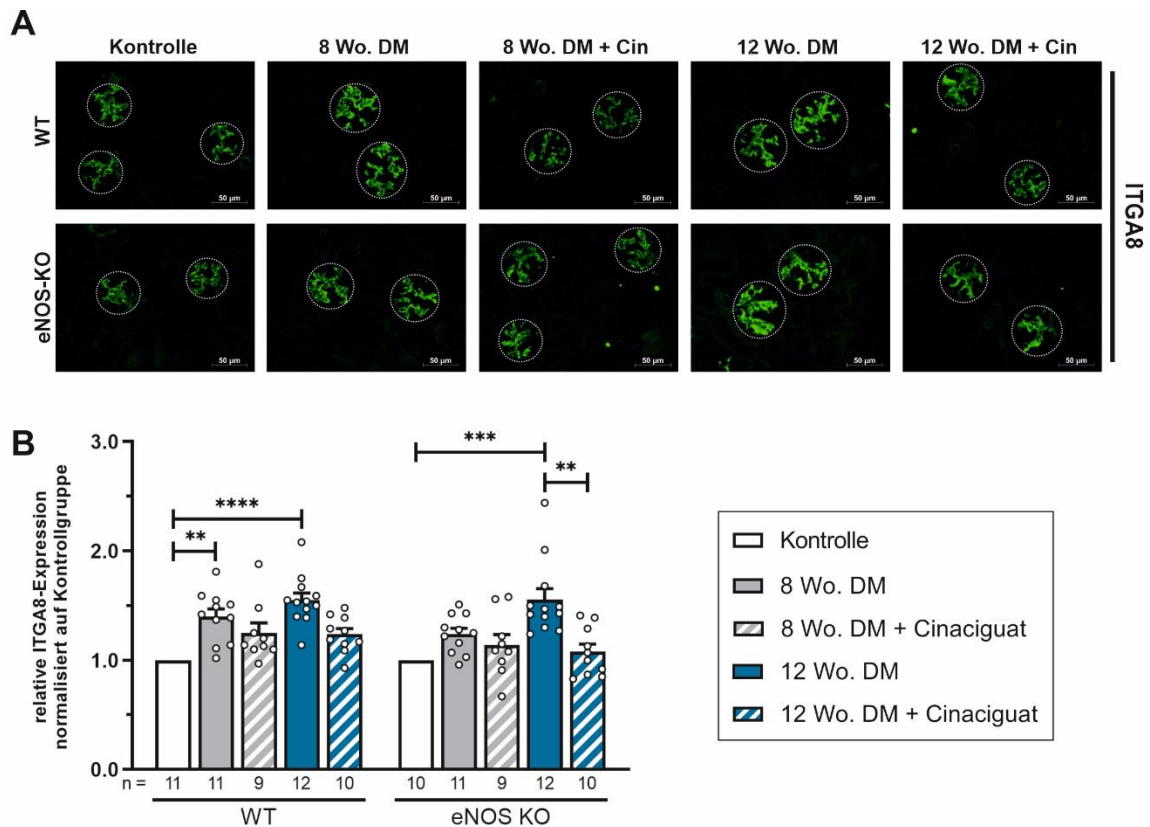
**A** Repräsentative Aufnahmen der Nephrin-Expression in den Glomeruli (Vergrößerung 200×) und statistische Auswertung. **B** RT-qPCR-Analyse der Nephrin mRNA-Expression.

\*:  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test).

In dieser Arbeit wurde die Proteinexpression von Nephrin in diabetischem Nierengewebe mittels Immunhistochemie und die entsprechenden mRNA-Level mittels RT-qPCR untersucht. Für die Expressionsanalyse ist die Fluoreszenzintensität von mindestens 14 Glomeruli pro Niere bestimmt und gemittelt worden. Weder in den WT- noch den eNOS-KO-Nieren konnte nach zwölf Wochen Diabetes im Vergleich zu den Kontrolltieren eine verringerte Nephrinexpression festgestellt werden (Abbildung 3-7 A). Auch die Gabe von Cinaciguat zeigte keinerlei Effekte. Auf mRNA-Ebene hingegen konnte vor allem bei den eNOS-KO-Tieren mit zwölf Wochen DM eine signifikante Reduktion der Nephrin-Level detektiert werden (Abbildung 3-7 B).

### 3.1.8 Analyse der Mesangialzellexpansion

Die Expansion des Mesangiums im Verlauf der diabetischen Nephropathie ist ein typisches Merkmal dieser Erkrankung (18). Bisher konnte kein spezifisches Markerprotein für Mesangialzellen identifiziert werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass der Matrixrezeptor  $\alpha 8$ -Integrin (ITGA8), der unter anderem an der Zelladhäsion beteiligt ist, innerhalb der Glomeruli nur in den Mesangialzellen exprimiert wird (159).



**Abbildung 3-8: Immunhistochemische Analyse von  $\alpha 8$ -Integrin (ITGA8) in diabetischem Nierengewebe von WT- und eNOS-KO-Mäusen.**

**A** Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Analyse von ITGA8 (Vergrößerung 360 $\times$ ). **B** Statistische Auswertung der ITGA8-Expression in den Glomeruli.

\*\*, \*\*\*, \*\*\*\*:  $p < 0,01$ ;  $0,001$ ;  $0,0001$  (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test).

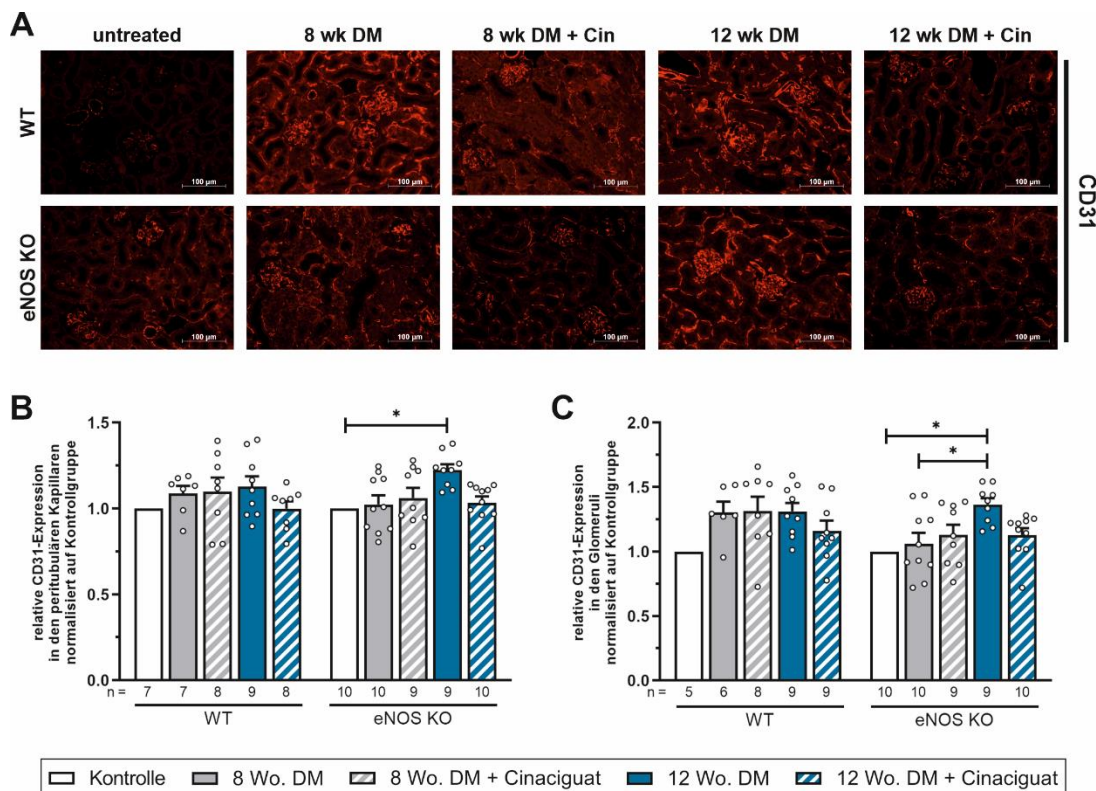
In dieser Arbeit wurde die ITGA8-Expression in den Glomeruli immunhistochemisch analysiert, um das Ausmaß der Mesangialzellerexpansion in den diabetischen Nieren bestimmen zu können. In Abbildung 3-8 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt. Für die Expressionsanalyse wurde die Fluoreszenzintensität von mindestens 20 Glomeruli je Niere ausgewertet und gemittelt. In den WT-Nieren war die ITGA8-Expression im Vergleich zu den Kontrollen sowohl nach acht als auch nach zwölf Wochen Diabetes signifikant um das 1,4- bzw. 1,6-fache erhöht. Die Behandlung mit Cinaciguat führte nach beiden Beobachtungszeiträumen zu einer nicht signifikanten Reduktion von ITGA8.

Bei den eNOS-KO-Mäusen war die Steigerung der ITGA8-Level nach acht Wochen Diabetes um das 1,2-fache gegenüber der Kontrollnieren weniger stark ausgeprägt. Nach zwölf Wochen war jedoch auch hier ein signifikanter Anstieg der Proteinexpression um das durchschnittlich 1,6-fache feststellbar. In den Nieren der Cinaciguat-behandelten eNOS-KO-Mäuse konnte dieser Anstieg effektiv gehemmt werden.

### 3.1.9 Untersuchung des Gefäßmarkers CD31

In Diabetespatienten ist die Angiogenese, also die Neubildung von Blutgefäßen, aufgrund der Hyperglykämie und den daraus resultierenden inflammatorischen Prozessen häufig gestört (160). Mittels Immunhistochemie wurde deshalb die Expression von CD31, auch bekannt unter der Bezeichnung PECAM-1 (Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül), als Marker für die Endothelzellen in den Gefäßen, im Nierengewebe von den diabetischen WT- und eNOS-KO-Tieren untersucht (Abbildung 3-9). Hierfür wurde die Expression in den peritubulären Kapillaren und in den Glomeruli separat ausgewertet. Für die Expressionsanalyse in den Glomeruli wurden mindestens 15 Glomeruli je Niere ausgewertet und gemittelt.

Im Interstitium konnte nur bei den eNOS-KO-Mäusen nach zwölf Wochen DM ein signifikanter Anstieg der CD31-Level um etwa das 1,2-fache beobachtet werden. Diese Expressionszunahme wurde durch die zusätzliche Behandlung mit Cinaciguat inhibiert (Abbildung 3-9 B). In den glomerulären Kapillaren war dieser Effekt etwas stärker ausgeprägt.



**Abbildung 3-9: Immunhistochemische Analyse des Endothelzellmarkers CD31 in diabetischem Nierengewebe von WT- und eNOS-KO-Mäusen.**

**A** Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Analyse von CD31 (Vergrößerung 200×). **B** Statistische Auswertung der CD31-Expression in den peritubulären Kapillaren. **C** Statistische Auswertung der CD31-Expression in den Glomeruli.

\*:  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test).

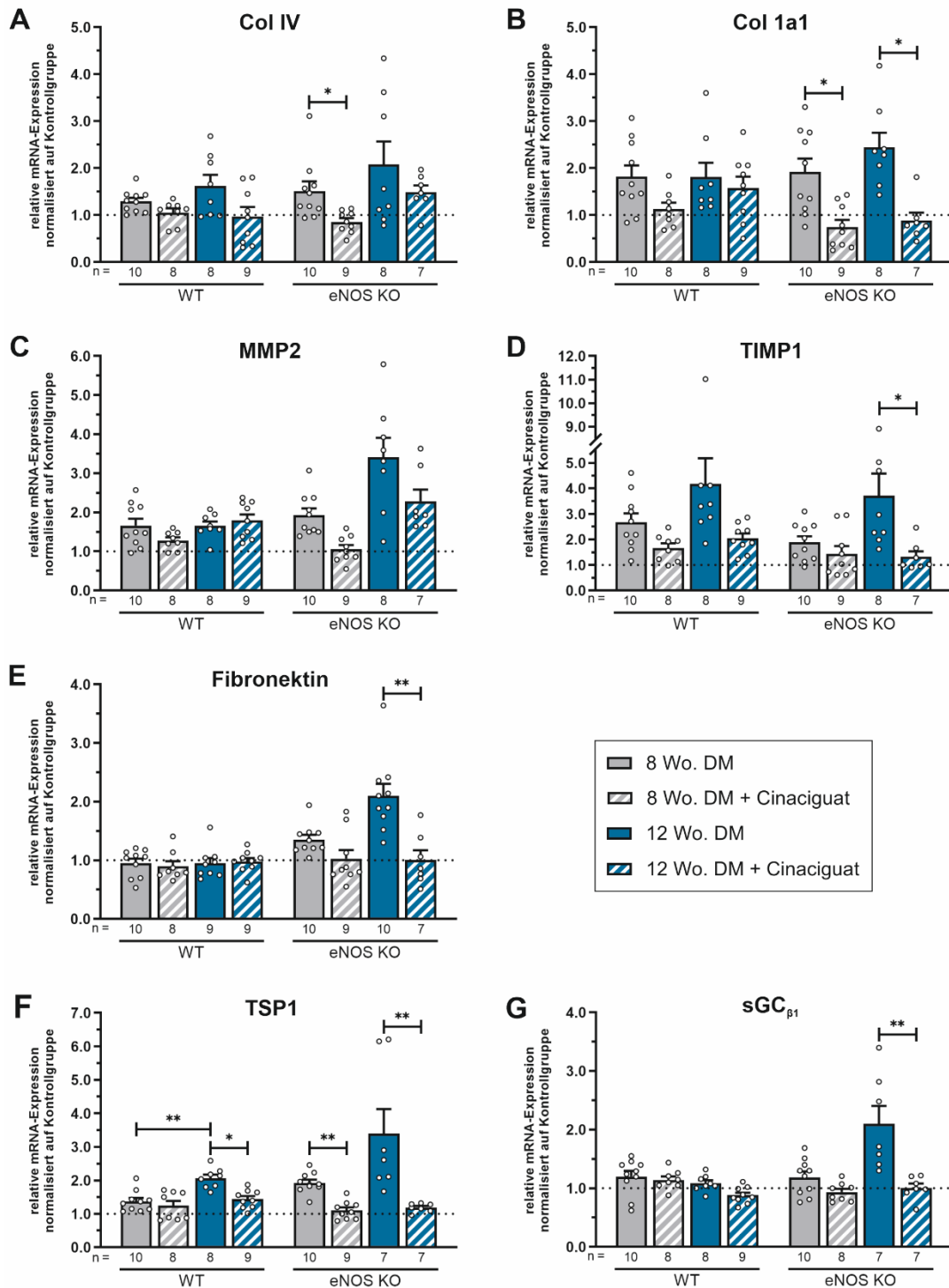
So stieg die CD31-Expression in den diabetischen eNOS-KO-Nieren nach zwölf Wochen verglichen zu den unbehandelten Tieren signifikant um durchschnittlich das 1,4-fache. Auch hier wurde die deutliche Zunahme durch die Gabe des sGC-Aktivators verhindert (Abbildung 3-9 C). In den WT-Nieren konnte ebenfalls eine im Mittel um das 1,3-fache gestiegene CD31-Expression in den Glomeruli detektiert werden, die allerdings im Vergleich zu den gesunden Mäusen nicht statistisch signifikant war.

### 3.1.10 mRNA-Expressionsanalyse von Fibrosemarkern und Signalproteinen

Um einen detaillierteren Einblick in die molekularen Prozesse in der diabetischen Niere zu erhalten, wurde die mRNA-Expression von verschiedenen Fibrosemarkern und Signalproteinen mittels RT-qPCR analysiert (Abbildung 3-10 und Tabelle 3-9). Die Auswertung erfolgte mit einer modifizierten  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, bei der die Effizienz der Amplifikation während der PCR berücksichtigt wurde (Abschnitt 2.6.3). Die mRNA-Expression in den diabetischen Nieren wurde dabei auf die mRNA-Level in den gesunden Kontrollnieren bezogen, die als 1 definiert wurden. Liegen die Werte über 1 bedeutet das, dass die mRNA-Expression im Vergleich zum Kontrollgewebe hochreguliert ist, bei Werten unter 1 ist die Expression entsprechend herunterreguliert.

Mittels histochemischer Methoden konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass die Produktion der extrazellulären Matrix im Nierengewebe durch Diabetes zunimmt (Abschnitt 3.1.5 und 3.1.6). Diese Tendenz konnte durch die RT-qPCR-Analyse bestätigt werden. In den eNOS-KO-Nieren nach zwölf Wochen Diabetes verdoppelte sich die Col IV-, Col 1a1- und Fibronectin-mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollnieren. Nach acht Wochen war die Produktion der extrazellulären Matrix ebenfalls erhöht, allerdings ist dieser Effekt deutlich weniger stark ausgeprägt. Auch bei den WT-Nieren ist eine Zunahme der Kollagen-mRNA-Expression in den Diabetesnieren feststellbar. Fibronectin blieb im WT-Gewebe hingegen völlig unverändert. Die Behandlung mit Cinaciguat konnte insbesondere in den Nieren der eNOS-KO-Tiere effektiv die vermehrte Produktion der ECM-mRNA verhindern (Abbildung 3-10 A, B, E).

Die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2) gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die extrazelluläre Matrixproteine abbauen können. Zu den Gegenspielern der MMPs gehören die Metalloproteinase-Inhibitoren (*tissue inhibitor of MMPs*; TIMP). Beide Proteinklassen spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Bindegewebs-Homöostase (161).



**Abbildung 3-10: mRNA-Expressionsanalyse von Fibrosemarkern und Signalproteinen.**

Mittels RT-qPCR wurde die mRNA-Expression untersucht, 18S rRNA oder  $\beta$ -Aktin dienten als *Housekeeper*-Gene. Die mRNA-Expression in den diabetischen Nieren wurde jeweils auf die mRNA-Level in den gesunden Nieren normalisiert, die als 1 definiert wurden (gestrichelte Linie). Als typische Fibrosemarker wurden **A** Collagen IV (**Col IV**) **B** Collagen 1a1 (**Col 1a1**) **C** Matrix-Metalloproteinase 2 (**MMP2**) **D** Metalloproteinase-Inhibitor 1 (**TIMP1**) und **E** Fibronectin untersucht. Des Weiteren wurden die Signalproteine **F** Thrombospondin 1 (**TSP1**) und **G** lösliche Guanylylcyclase (**sGC $\beta_1$** ) analysiert.

\*, \*\*:  $p < 0,05$ ;  $0,01$  (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test).

Tabelle 3-9: mRNA-Expressionsanalyse von Fibrosemarkern und Signalproteinen.

	Gen	8 Wo. DM	8 Wo. DM + Cin.	12 Wo. DM	12 Wo. DM + Cin.
WT	Col IV n =	1,29 ± 0,07 10	1,05 ± 0,09 8	1,62 ± 0,24 8	0,97 ± 0,20 9
	Col 1a1 n =	1,82 ± 0,24 10	1,13 ± 0,14 8	1,81 ± 0,31 8	1,58 ± 0,24 9
	MMP2 n =	1,67 ± 0,17 10	1,28 ± 0,08 8	1,66 ± 0,11 8	1,80 ± 0,15 9
	TIMP1 n =	2,68 ± 0,35 10	1,67 ± 0,19 8	4,17 ± 1,01 8	2,04 ± 0,19 9
	Fibronektin n =	0,95 ± 0,08 10	0,90 ± 0,09 8	0,95 ± 0,09 9	0,98 ± 0,06 9
	TSP1 n =	1,37 ± 0,10 10	1,24 ± 0,15 8	2,06 ± 0,11 <sup>##</sup> 8	1,44 ± 0,09 <sup>s</sup> 9
	sGC n =	1,20 ± 0,10 10	1,14 ± 0,06 8	1,09 ± 0,05 8	0,88 ± 0,05 9
eNOS-KO	Col IV n =	1,51 ± 0,20 10	0,86 ± 0,08 <sup>#</sup> 9	2,08 ± 0,49 8	1,48 ± 0,15 7
	Col 1a1 n =	1,92 ± 0,28 10	0,74 ± 0,16 <sup>#</sup> 9	2,45 ± 0,31 8	0,88 ± 0,17 <sup>s</sup> 7
	MMP2 n =	1,93 ± 0,17 10	1,05 ± 0,11 9	3,41 ± 0,50 8	2,28 ± 0,30 7
	TIMP1 n =	1,89 ± 0,23 10	1,43 ± 0,31 9	3,72 ± 0,86 8	1,33 ± 0,21 <sup>s</sup> 7
	Fibronektin n =	1,36 ± 0,08 10	1,03 ± 0,15 9	2,10 ± 0,20 10	1,01 ± 0,17 <sup>ss</sup> 7
	TSP1 n =	1,93 ± 0,10 10	1,10 ± 0,09 <sup>##</sup> 9	3,39 ± 0,74 7	1,18 ± 0,05 <sup>ss</sup> 7
	sGC n =	1,19 ± 0,10 10	0,94 ± 0,06 8	2,10 ± 0,30 7	1,00 ± 0,07 <sup>ss</sup> 7

x-fache mRNA-Expression bezogen auf gesunde Kontrollnieren. Mittelwerte ± S.E.M.;

<sup>##</sup>, <sup>s</sup>, <sup>ss</sup>: p < 0,05; 0,01 versus 8 Wo. DM; <sup>s</sup>, <sup>ss</sup>: p < 0,05; 0,01 versus 12 Wo. DM (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test) DM – Diabetes mellitus; Cin. – Cinaciguat

Die MMP2-mRNA-Expression war in allen WT-Versuchsgruppen aufgrund der Hyperglykämie etwas erhöht, zwischen den einzelnen Versuchsgruppen gab es allerdings keine signifikanten Unterschiede. In den eNOS-KO-Nieren hingegen verdoppelten sich die MMP2-mRNA-Level nach acht Wochen Diabetes und verdreifachte sich nach zwölf Wochen. Mit Cinaciguat wurde die MMP2-mRNA-Expression zwar reduziert, aber nicht statistisch signifikant (Abbildung 3-10 C). Die TIMP1-mRNA-Level waren unter den diabetischen Bedingungen nach beiden Untersuchungszeiträumen sowohl in den WT- als auch den eNOS-KO-Nieren deutlich erhöht. Nach zwölf Wochen Diabetes vervierfachten sich die TIMP1-mRNA-Expression nahezu im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Die Gabe des sGC-Aktivators Cinaciguat reduzierte die TIMP1-mRNA-Expression jedoch deutlich (Abbildung 3-10 D).



Das matrizelluläre Protein Thrombospondin 1 (TSP1) ist zuständig für die Aktivierung des profibrotischen Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  und stellt damit einen kritischen Faktor in der diabetischen Nephropathie dar (162). Die Analyse der mRNA-Expression von TSP1 zeigte in beiden Genotypen aufgrund des Diabetes eine beträchtliche Hochregulation. In den WT-Nieren verdoppelte sich die TSP1-Expression nach zwölf Wochen Diabetes, eNOS-KO-Nieren wiesen nach acht Wochen eine Verdopplung und nach zwölf Wochen eine Verdreifachung der TSP1-mRNA-Level auf. Mit Cinaciguat konnte diese Zunahme vor allem in den 12-Wochen-Diabetes-Nieren effektiv gehemmt werden (Abbildung 3-10 F).

Zuletzt wurde die mRNA-Expression der sGC $\beta_1$  untersucht. Diese war in den einzelnen WT-Versuchsgruppen nicht signifikant verändert, verdoppelte sich allerdings in den eNOS-KO-Nieren nach zwölf Wochen Diabetes. Diese Zunahme konnte signifikant durch die Gabe von Cinaciguat reduziert werden (Abbildung 3-10 G).

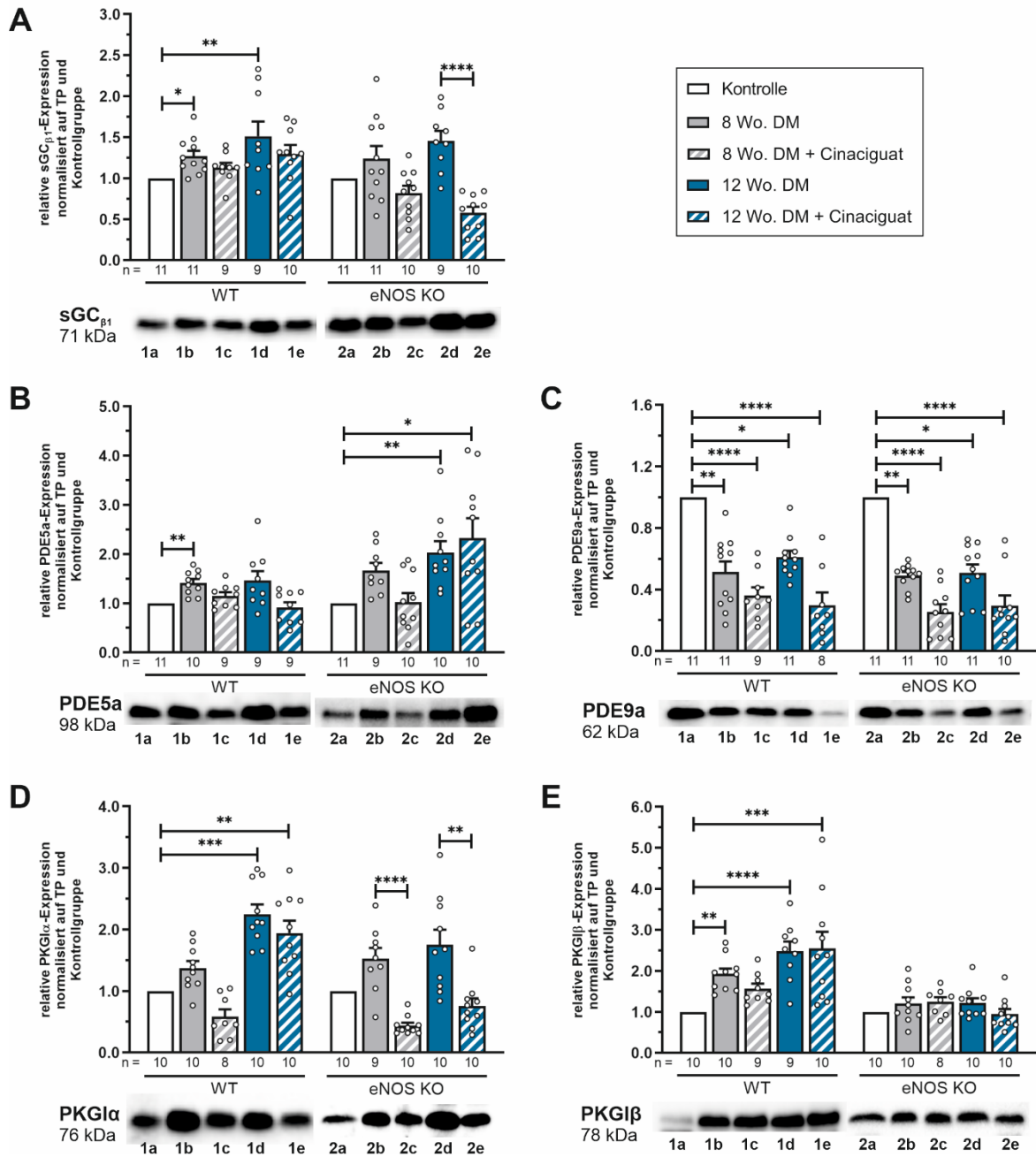
### **3.1.11 Regulation von Signalproteinen der sGC/cGMP/PKG-Signalkaskade**

Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen wurde die Expression verschiedener Proteine untersucht, die entweder direkt Bestandteil der sGC/cGMP/PKG-Signalkaskade sind oder die diese direkt beeinflussen.

Für die Auftrennung der Proteine wurden Trichlorethanol-haltige SDS-Gele verwendet. Dadurch konnten nach dem Blotten zusätzlich Totalprotein-Banden auf der Membran aufgenommen werden, die anschließend zur Normalisierung der jeweiligen Proteinbanden genutzt wurden. In Abbildung 3-11 sind die repräsentativen Immunoblots der untersuchten Proteine und die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung dargestellt. Die Aufnahmen der zugehörigen Totalprotein-Spuren sind im Anhang (Abschnitt 6.1) gezeigt.

Die Auswertung der sGC $\beta_1$ -Proteinexpression zeigte, dass diese in den diabetischen Nieren unabhängig vom Genotyp im Vergleich zu den Kontrollnieren zunahm, nach zwölf Wochen Diabetes im Mittel um das 1,5-fache. Allerdings war dieser Effekt nur bei den diabetischen WT-Tieren statistisch signifikant. Während Cinaciguat diesen Anstieg der sGC $\beta_1$ -Expression in den WT-Tieren nur geringfügig verringerte, lagen die sGC $\beta_1$ -Level bei den eNOS-KO-Tieren sogar noch unter denen der Kontrolltiere (Abbildung 3-11 A).

Die Phosphodiesterasen PDE5a und PDE9a kontrollieren die intrazelluläre cGMP-Konzentration, in dem sie dieses abbauen. Interessanterweise wurden diese beiden Enzyme in der diabetischen Niere gegensätzlich reguliert.



**Abbildung 3-11: Regulation von Signalproteinen der sGC/cGMP-Signalkaskade.**

Repräsentative Immunoblots zeigen die Proteinexpression von der **A** löslichen Guanylylcyclase (sGC $\beta_1$ ), **B** Phosphodiesterase (PDE) 5a, **C** PDE9a, **D** cGMP-abhängigen Proteinkinase I $\alpha$  (PKGI $\alpha$ ) und **E** PKGI $\beta$ .

Auftrageschema: **1** WT; **2** eNOS-KO; **a** Kontrolle; **b** 8 Wo. DM; **c** 8 Wo. DM + Cin.; **d** 12 Wo. DM; **e** 12 Wo. DM + Cin.

Die Expressionslevel wurden densitometrisch ausgewertet und auf Totalprotein (TP) normiert. Anschließend wurde die Proteinexpression der diabetischen Nieren auf die gemittelte Expression der Kontrollnieren bezogen, die als 1 definiert wurde.

\*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*:  $p < 0,05$ ;  $0,01$ ;  $0,001$ ;  $0,0001$  (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test).

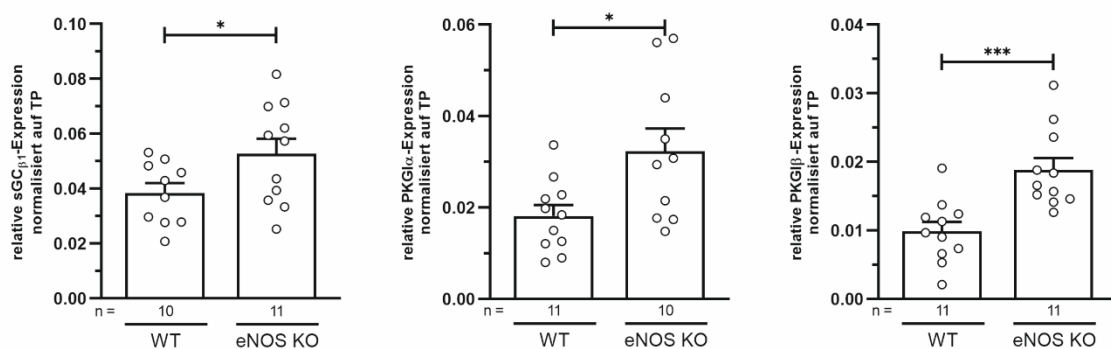
Repräsentative Immunoblots zeigen, dass die PDE5a-Expression unter Diabetes bei allen Versuchsgruppen hochreguliert wurde, wohingegen sich die PDE9a-Level sogar halbiert haben (Abbildung 3-11 B, C). Die Gabe von Cinaciguat führte in den WT-Tieren zu einer geringen, nicht-signifikanten Reduktion der PDE5a, in den eNOS-KO-Nieren nach zwölf Wochen zu einem geringen Anstieg. Die PDE9a-Level wurden hingegen durch den sGC-Aktivator noch weiter verringert.

Die Proteinexpression der PKGI $\alpha$  war sowohl in den diabetischen Nieren der WT-Mäuse, als auch in denen der eNOS-KO-Tiere deutlich erhöht. Cinaciguat führte verglichen mit den unbehandelten diabetischen Tieren, insbesondere in den eNOS-KO-Nieren zu einer signifikant reduzierten PKGI $\alpha$ -Expression (Abbildung 3-11 D).

Die PKGI $\beta$  Proteinlevel veränderten sich nur in den WT-Nieren und verdoppelten sich dabei aufgrund der diabetischen Bedingungen. In den eNOS-KO-Nieren konnten hingegen keinerlei Veränderungen der PKGI $\beta$ -Expression detektiert werden. Die Cinaciguat-Behandlung hatte darauf keinen messbaren Einfluss (Abbildung 3-11 E).

Beim direkten Vergleich von WT- und eNOS-KO-Kontrollnieren war außerdem auffällig, dass die Expression aller untersuchten Proteine der sGC/cGMP/PKG-Signalkaskade in der Niere der eNOS-KO-Mäuse signifikant hochreguliert waren (Abbildung 3-12).

Die Level der sGC $\beta_1$  lagen dabei im Mittel 1,4-fach höher als in den WT-Nieren. Die PKGI $\alpha$ -Expression war in den eNOS-KO-Nieren 1,8-fach und die PKGI $\beta$ -Expression 1,9-fach erhöht.



**Abbildung 3-12: Vergleich der Proteinexpression in WT- und eNOS-KO-Kontrollnieren.**

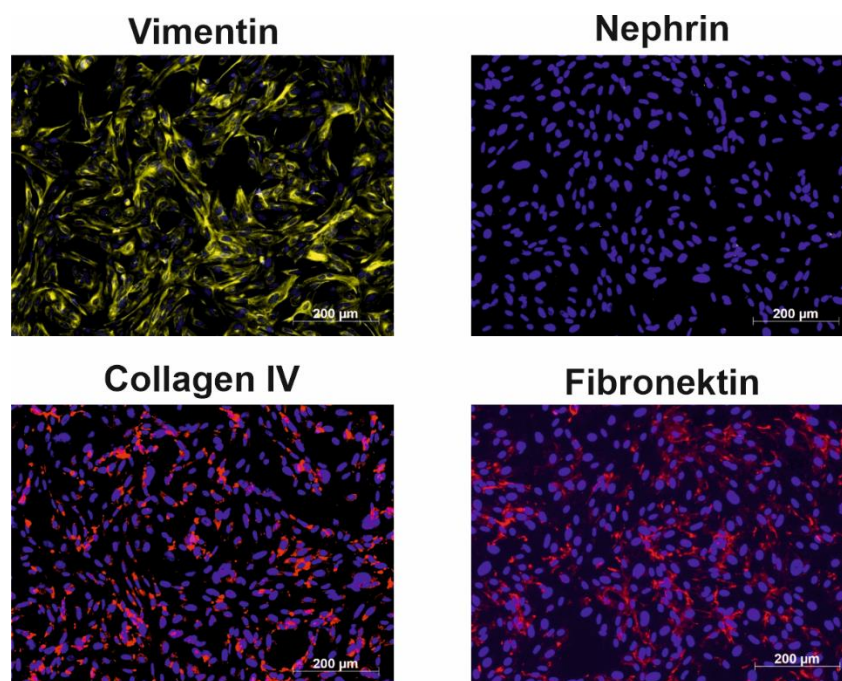
Mit Hilfe der in Abbildung 3-11 gezeigten Immunoblots wurde die Proteinexpression der **A** löslichen Guanylylcyclase (sGC $\beta_1$ ), **B** cGMP-abhängigen Proteinkinase I $\alpha$  (PKGI $\alpha$ ) und **C** PKGI $\beta$  in den Kontrollnieren von WT- und eNOS-KO Nieren miteinander verglichen. Die Expressionslevel wurden densitometrisch ausgewertet und auf Totalprotein (TP) normiert.

\*, \*\*\*:  $p < 0,05$ ; 0,001 angegeben (Student's t-Test).

## 3.2 Untersuchung von glucoseinduzierten Mechanismen in murinen Mesangialzellen

### 3.2.1 Reinheitskontrolle der isolierten primären Mesangialzellen

Für die Untersuchung von glukoseinduzierten Mechanismen in den Mesangialzellen und den Einfluss der Aktivierung der sGC/cGMP-Signalkaskade darauf, wurden primäre Mesangialzellen aus den Nieren von Mäusen isoliert. Um zu überprüfen, ob es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um Mesangialzellen handelte, wurden verschiedene Markerproteine mittels Immuncytochemie analysiert (Abbildung 3-13). Die Zellen zeigten eine stark positive Färbung für das filamentäre Protein Vimentin aber auch für die ECM-Proteine Collagen IV und Fibronektin, während für den Podozytenmarker Nephrin kein Signal detektiert werden konnte. Dies spricht für das Vorliegen einer reinen Mesangialzellkultur (139).

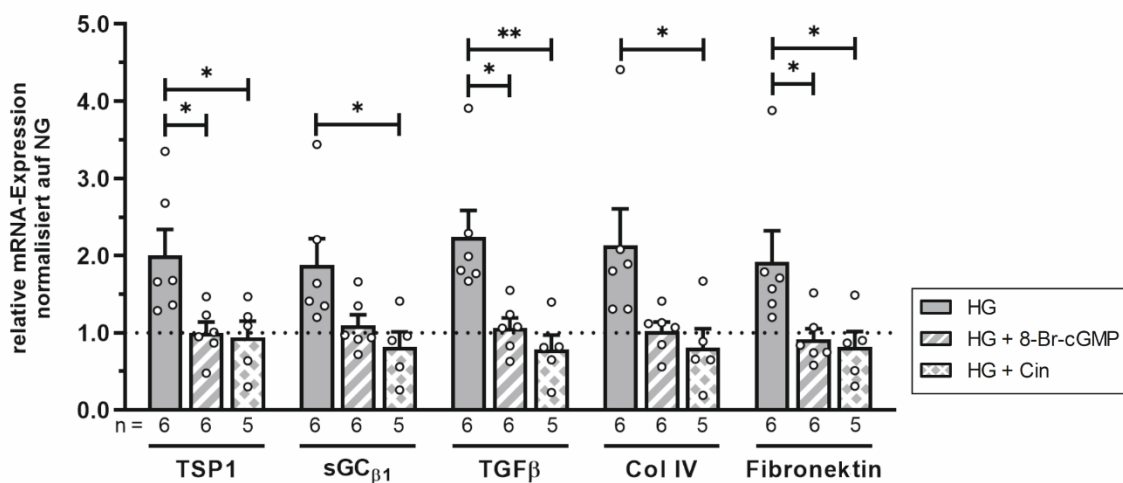


**Abbildung 3-13: Charakterisierung der isolierten primären, murinen Mesangialzellen mittels Immuncytochemie.**

Repräsentative Aufnahmen der immuncytochemischen Analyse (Vergrößerung 200×) zeigen eine positive Färbung für Vimentin, Collagen IV und Fibronektin und eine negative für das podozytenspezifische Nephrin. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

### 3.2.2 Aktivierung der sGC/cGMP-Signalkaskade in glukosestimulierten WT-MCs

Um die Funktion der Mesangialzellen in der diabetischen Nephropathie näher zu untersuchen, wurde ein Zellkulturmodell mit primären Mesangialzellen aus WT-Mäusen etabliert. Dazu wurden die Mesangialzellen mit verschiedenen Glukosekonzentrationen im Nährmedium stimuliert. Zur Nachahmung von normalen Blutzuckerkonzentrationen wurden die Zellen mit 8 mM D-Glukose (*Normal Glucose* (NG)-Medium) inkubiert. Die erhöhten Blutzuckerspiegel unter Diabetes mellitus wurden mit 25 mM D-Glukose (*High Glucose* (HG)-Medium) simuliert. Das NG-Medium enthielt zudem 17 mM D-Mannitol, um auszuschließen, dass etwaige Effekte durch osmotischen Stress verursacht wurden. Dem HG-Medium wurde zusätzlich entweder 1,0 mM 8-Br-cGMP zur Aktivierung der PKG oder 20  $\mu$ M Cinaciguat zur Aktivierung der sGC zugesetzt, um den Einfluss der sGC/cGMP/PKG-Signalkaskade auf die Proteinexpression zu untersuchen. Insgesamt betrug der Inkubationszeitraum jeweils 48 h. Aufgrund der geringen Stabilität des 8-Br-cGMPs im Nährmedium, wurde dieses nach 24 h durch frisches ersetzt.



**Abbildung 3-14: Effekte der sGC/PKG-Aktivierung auf die mRNA-Expression in HG-stimulierten WT-Mesangialzellen.**

Die mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR analysiert, 18S rRNA diente dabei als Housekeeper-Gen. Die mRNA-Expression der einzelnen Proteine in den *High Glucose*-stimulierten Zellen wurde jeweils auf die mRNA-Level in den mit normalen Glukosekonzentrationen inkubierten Zellen normalisiert, die als 1 definiert wurden (gestrichelte Linie). Die Zellen wurden des Weiteren entweder mit 1,0 mM 8-Br-cGMP oder mit 20  $\mu$ M Cinaciguat (Cin) stimuliert.

\*, \*\*:  $p < 0,05$ ; 0,01 (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test).

**Tabelle 3-10: mRNA-Expressionsanalyse von Fibrosemarkern und Signalproteinen in MCs.**

Gen	HG	HG + 8-Br-cGMP	HG + Cinaciguat
<b>TSP1</b> n =	2,00 ± 0,34 6	1,00 ± 0,14* 6	0,94 ± 0,21* 5
<b>sGC<math>\beta</math>1</b> n =	1,88 ± 0,35 6	1,09 ± 0,14 6	0,82 ± 0,19* 5
<b>TGF<math>\beta</math></b> n =	2,24 ± 0,35 6	1,07 ± 0,13* 6	0,78 ± 0,19** 5
<b>Col IV</b> n =	2,13 ± 0,47 6	1,02 ± 0,12 6	0,81 ± 0,24* 5
<b>Fibronektin</b> n =	1,92 ± 0,40 6	0,92 ± 0,14* 6	0,82 ± 0,20* 5

x-fache mRNA-Expression bezogen auf Kontrollzellen, die mit 8 mM D-Glucose und 17 mM D-Mannitol inkubiert wurden. Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.;

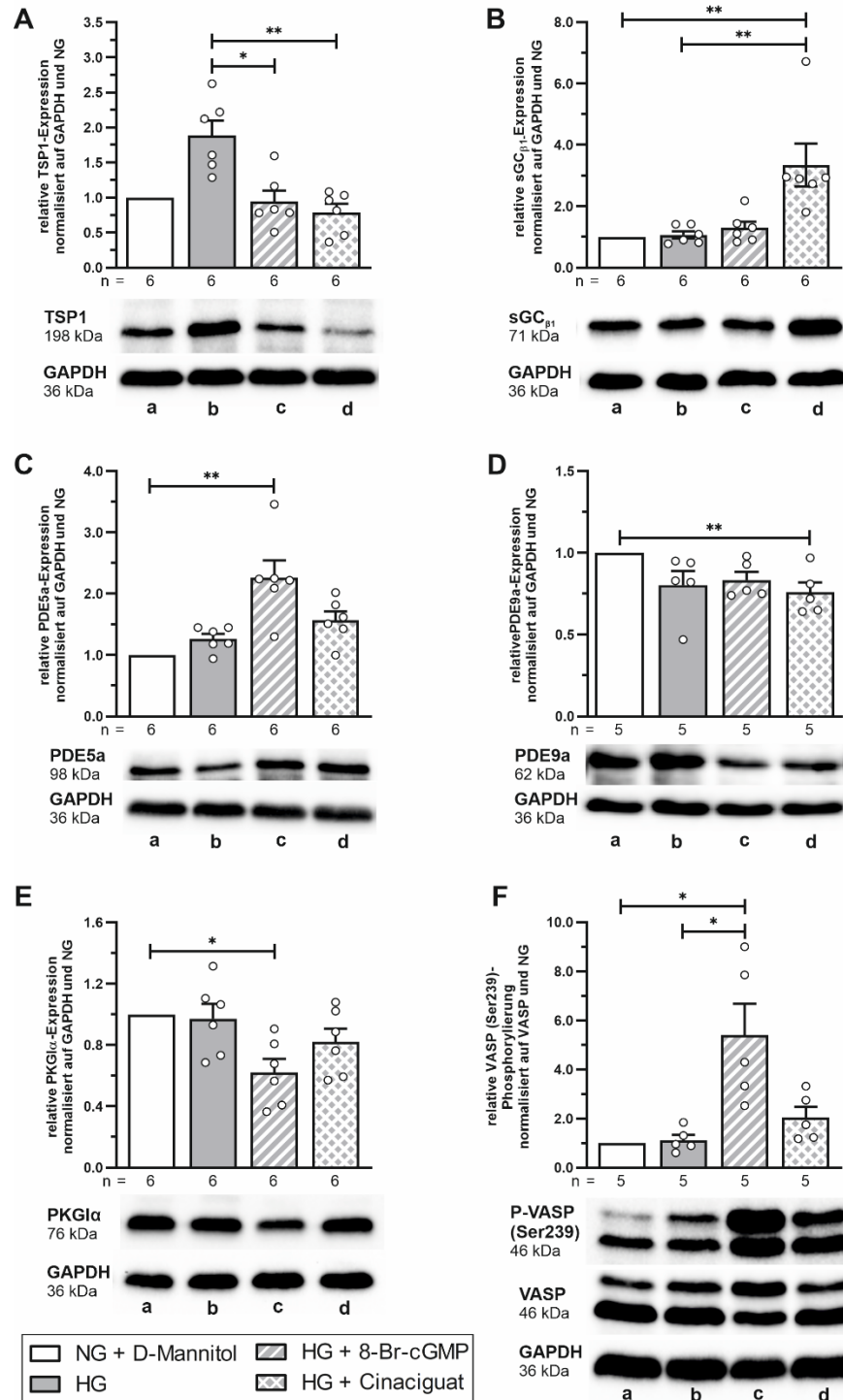
\*, \*\*:  $p < 0,05$ ;  $0,01$  versus HG;

(Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test) HG – High Glucose; Cin. – Cinaciguat

Die hohen Glukosekonzentrationen führten in den Mesangialzellen sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene zu einer Verdopplung der TSP1-Level (Abbildung 3-14; Tabelle 3-10; Abbildung 3-15 A). Die zusätzliche Stimulation der Zellen mit 8-Br-cGMP oder Cinaciguat hingegen verringerte die TSP1-Expression signifikant auf das Niveau der Kontrollzellen. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen aus den *in vivo*-Experimenten (Abbildung 3-10 F).

Eine Überexpression von TSP1 führt zu einer vermehrten Aktivierung des profibrotischen Wachstumsfaktors TGF $\beta$ , der wiederum die Bildung der extrazellulären Matrixproteine Collagen IV und Fibronektin fördert (163). Auch in den Mesangialzellen ist die mRNA-Expression dieser drei Proteine unter den diabetischen Bedingungen deutlich angestiegen (Abbildung 3-14, Tabelle 3-10). Auch dieser Anstieg konnte durch die zusätzliche Stimulation der Zellen mit 8-Br-cGMP oder Cinaciguat effektiv inhibiert werden.

Wie bereits in den diabetischen Nieren gezeigt wurde, verdoppelten sich die sGC $\beta$ 1-mRNA-Level aufgrund der Hyperglykämie auch in den Mesangialzellen und wurden durch die Behandlung mit 8-Br-cGMP oder Cinaciguat signifikant verringert (Abbildung 3-14, Tabelle 3-10). Auf Proteinebene hingegen konnte unter den diabetischen Bedingungen keine Erhöhung der sGC $\beta$ 1 beobachtet werden. Erst die Stimulation mit Cinaciguat führte zu einem sehr deutlichen Anstieg der sGC $\beta$ 1-Proteinlevel (Abbildung 3-15 B).



**Abbildung 3-15: Regulation der Proteinexpression in HG-stimulierten Mesangialzellen.**

Repräsentative Immunoblots zeigen die Proteinexpression von **A** Thrombospondin 1 (TSP1) **B** löslicher Guanylylcyclase (sGC $\beta_1$ ), **C** Phosphodiesterase (PDE) 5a, **D** PDE9a, **E** cGMP-abhängigen Proteinkinase Ia (PKG $\alpha$ ) und **F** Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP). Auftrageschema: **a** NG + D-Mannitol; **b** HG; **c** HG + 8-Br-cGMP; **d** HG + Cin.

Die Expressionslevel wurden densitometrisch ausgewertet und auf GAPDH normiert. Anschließend wurde die Proteinexpression auf die gemittelte Expression der mit NG + D-Mannitol behandelten Kontrollzellen bezogen, die als 1 definiert wurde.

\*, \*\*:  $p < 0,05$ ;  $0,01$ ; (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test).

Die PDE5a und PDE9a wurden auch in den Mesangialzellen gegensätzlich reguliert. Sowohl unter den HG-Bedingungen alleine, als auch mit zusätzlicher Cinaciguatbehandlung konnte nur eine leichte, nicht signifikante Zunahme der PDE5a festgestellt werden. Die Stimulation der Zellen mit 8-Br-cGMP hingegen führte zu einem deutlicheren, statistisch signifikanten Anstieg der PDE5a-Level um durchschnittlich das 2,3-fache (Abbildung 3-15 C).

Im Gegensatz dazu verringerten sich die PDE9a-Level tendenziell durch die hohen Glukosekonzentrationen. Die Aktivierung der sGC mit Cinaciguat führte sogar zu einer signifikanten Abnahme der Expression auf im Mittel das 0,8-fache der Kontrollzellen (Abbildung 3-15 D).

Die Proteinlevel der PKGI $\alpha$  wurden weder durch die hohen Glukosekonzentrationen im Nährmedium noch durch die Stimulation mit Cinaciguat beeinflusst. Die Behandlung mit 8-Br-cGMP führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Proteinexpression auf das durchschnittlich 0,6-fache der NG-Zellen (Abbildung 3-15 E).

VASP ist ein Substrat der PKGI $\alpha$ , die nach Aktivierung mit cGMP das VASP am Ser239 phosphoryliert. Die Analyse der VASP-Phosphorylierung lässt damit Rückschlüsse auf die Aktivierung der PKGI $\alpha$  zu. Die Stimulation der Zellen mit 8-Br-cGMP führte in diesem Fall zu einer 5-fachen Zunahme der VASP-Phosphorylierung. Die Behandlung mit Cinaciguat verdoppelte die Phosphorylierung des VASP in den Zellen, allerdings nicht statistisch signifikant (Abbildung 3-15 F).

### 3.2.3 Die Rolle der PKGI in glukosestimulierten Mesangialzellen

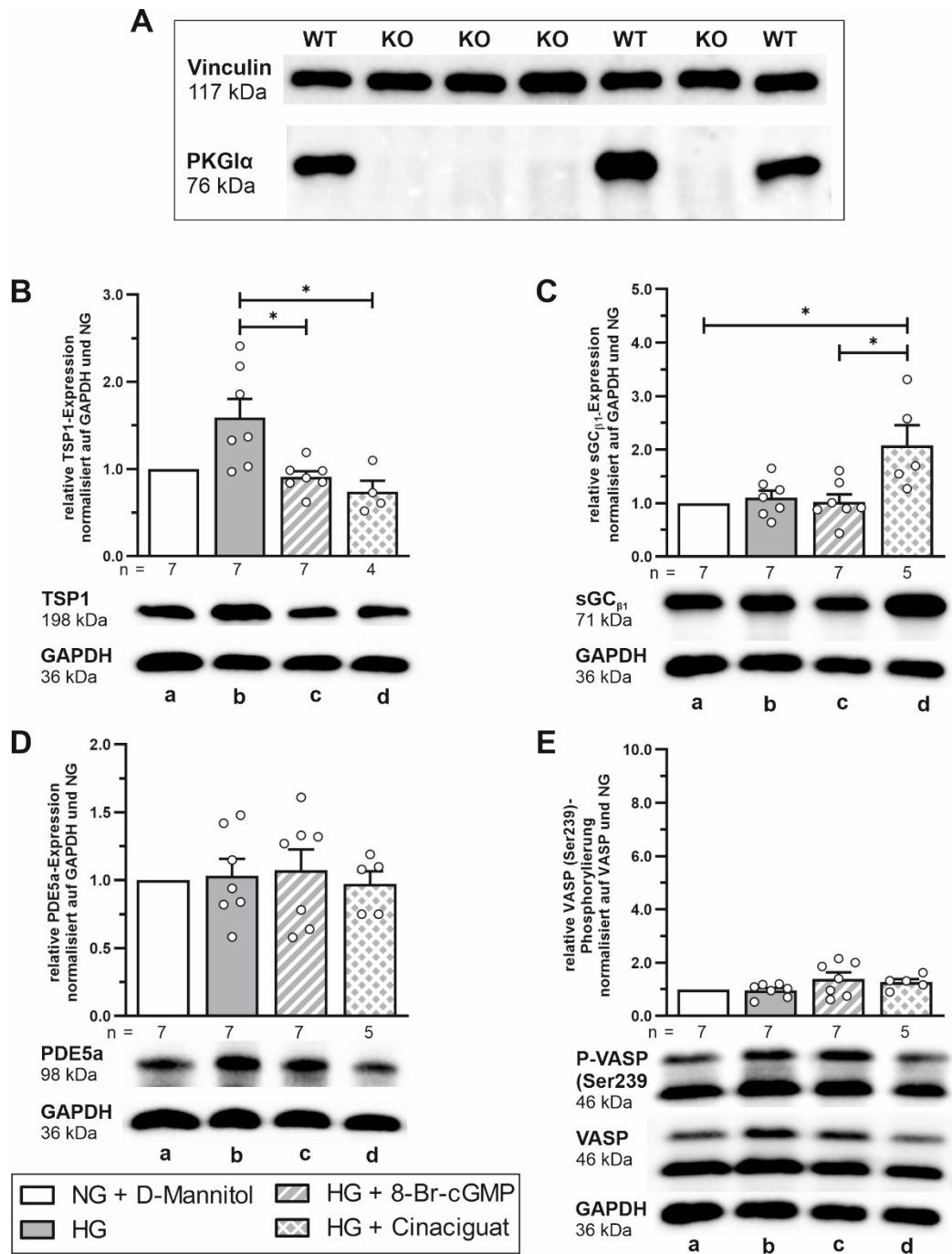
Neben den CNG-Kanälen und den PDEs sind die cGMP-abhängigen Proteinkinasen die wichtigsten Zielstrukturen des Botenstoffs cGMP. Um zu überprüfen, ob die zuvor beschriebenen Effekte von 8-Br-cGMP und Cinaciguat in den Mesangialzellen durch die PKGI reguliert wurden, wurden zusätzliche Versuche mit PKGI-KO-Zellen durchgeführt.

Dazu wurden die primären Mesangialzellen aus Nieren von Mäusen gewonnen, bei denen die PKGI global ausgeschaltet war. Ein repräsentativer Western Blot in Abbildung 3-16 A zeigt, dass in den verwendeten Zellen keine PKGI-Expression mehr detektierbar war.

Wie bereits bei den WT-Zellen beschrieben, wurden auch die PKGI-KO-MCs mit verschiedenen Glukosekonzentrationen (LG, HG), sowie zusätzlich mit 8-Br-cGMP und Cinaciguat inkubiert. Die veränderte Proteinexpression wurde anschließend mittels Western Blot-Analyse untersucht.

Überraschenderweise verhielt sich die TSP1-Proteinexpression in den KO-Zellen wie in den WT-Zellen. In den HG-behandelten KO-Zellen kam es zu einer Zunahme der TSP1-Level,





**Abbildung 3-16: Regulation der Proteinexpression in HG-stimulierten PKGI-KO-MCs.**

**A** Kontrolle des Knockouts der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (PKGI) in den isolierten MCs mittels Analyse der PKGIα.

Repräsentative Immunoblots zeigen die Proteinexpression von **B** Thrombospondin 1 (TSP1), **C** löslichen Guanylylcyclase (sGC<sub>β1</sub>), **C** Phosphodiesterase (PDE) 5a, **E** Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP).

Auftragesschema: **a** NG + D-Mannitol; **b** HG; **c** HG + 8-Br-cGMP; **d** HG + Cin.

Die Expressionslevel wurden densitometrisch ausgewertet und auf GAPDH normiert. Anschließend wurde die Proteinexpression auf die gemittelte Expression der mit NG + D-Mannitol behandelten Kontrollzellen bezogen, die als 1 definiert wurde.

\*:  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test).

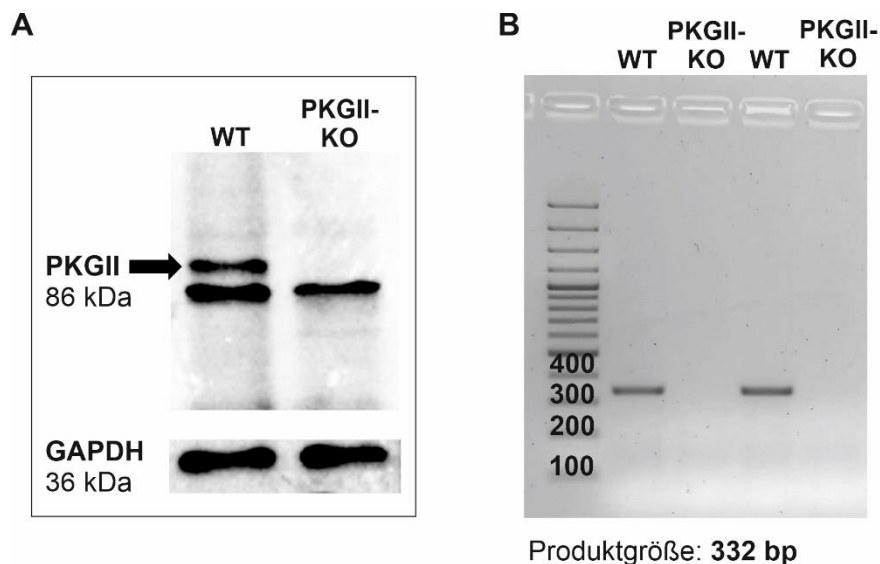
während die zusätzliche Stimulation mit 8-Br-cGMP oder Cinaciguat zu einer signifikanten Reduktion des Proteins führte (Abbildung 3-16 B).

Auch die sGC $\beta_1$ -Expression verhielt sich in den KO-MCs unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen wie in den WT-Zellen. So führte die Cinaciguat-Behandlung auch in den PKGI-KO-Zellen zu einer signifikanten Steigerung der sGC $\beta_1$ -Level (Abbildung 3-16 C).

Die PDE5 ist nicht nur ein direktes Target des Botenstoffs cGMP, sondern auch der PKGI. Wie die Analyse der PDE5a-Expression zeigt, kommt es aufgrund der fehlenden PKGI in den KO-Zellen nach der Stimulation mit 8-Br-cGMP nicht zu einem Anstieg der Proteinlevel (Abbildung 3-16 D). Auch konnte in den PKGI-KO-Zellen keine Zunahme der VASP-Phosphorylierung nach Inkubation mit 8-Br-cGMP oder Cinaciguat festgestellt werden (Abbildung 3-16 E). Beide Ergebnisse bestätigen damit, dass in den verwendeten Mesangialzellen die PKGI vollständig ausgeschaltet war.

### 3.2.4 Nachweis der PKGII in Mesangialzellen

Wie die TSP1-Expressionsanalyse in den PKGI-KO-Zellen gezeigt hat, ist die PKGI wohl nicht oder zumindest nicht alleinig für die Effekte, die durch die Stimulation mit 8-Br-cGMP oder Cinaciguat bewirkt wurden, verantwortlich. Neben der PKGI stellt auch die PKGII ein wichtiges Zielsubstrat des sekundären Botenstoffs cGMP dar.

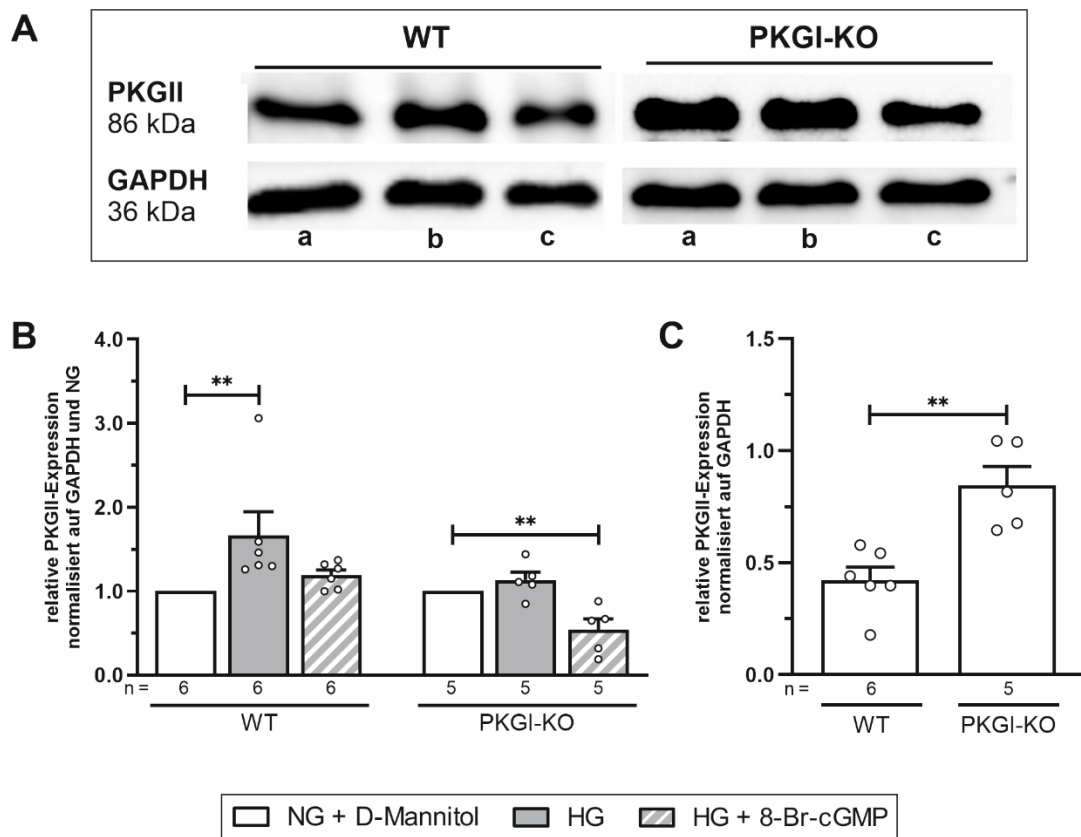


**Abbildung 3-17: Nachweis der PKGII in primären, murinen Mesangialzellen.**

**A** Nachweis der PKGII auf Proteinebene mittels Western Blot. Hierfür wurde Proteinlysate aus WT-MCs mit dem aus PKGII-KO-Zellen verglichen.

**B** Nachweis der PKGII auf mRNA-Ebene. Mit spezifischen Primern für die PKGII konnte nur in den WT-Zellen ein PCR-Produkt erhalten werden.

Bisher wurde allerdings nicht untersucht, ob die PKGII auch in Mesangialzellen exprimiert wird. Deshalb wurde in dieser Arbeit zunächst geprüft, ob die PKGII mittels Western Blot und PCR überhaupt in den primären Mesangialzellen nachgewiesen werden kann. Dazu wurden MCs aus WT-Nieren mit MCs aus PKGII-KO-Nieren miteinander verglichen. Wie in der Abbildung 3-17 dargestellt, konnte die PKGII sowohl auf Proteinebene (A), als auch auf mRNA-Ebene (B) erfolgreich nachgewiesen werden. Während in den WT-Zellen sowohl mittels Western Blot, als auch PCR jeweils spezifische Banden für das gesuchte Protein detektiert werden konnten, fehlten diese in den PKGII-KO-Zellen. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den detektierten Banden sehr wahrscheinlich um die PKGII handelte.



**Abbildung 3-18: Analyse der PKGII-Expression in HG-stimulierten WT- und PKGI-KO-MCs.**

**A** Repräsentative Immunoblots zeigen die Proteinexpression der PKGII.

Auftrageschema: **a** NG + D-Mannitol; **b** HG; **c** HG + 8-Br-cGMP.

**B** Die Expressionslevel wurden densitometrisch ausgewertet und auf GAPDH normiert. Anschließend wurde die Proteinexpression auf die gemittelte Expression der mit NG + D-Mannitol behandelten Kontrollzellen bezogen, die als 1 definiert wurde.

**C** Vergleich der PKGII-Expression in WT- und PKGI-KO-Kontrollzellen.

\*\* $p < 0,01$  (**B** Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test; **C** Student's-t-Test)).

---

Des Weiteren sollte nun die Proteinexpression der PKGII in glukoseinduzierten WT- und PKGI-KO-MCs mittels Western Blot untersucht werden (Abbildung 3-18). Interessanterweise führten die diabetischen Bedingungen zu einer signifikanten Erhöhung der PKGII-Expression um das durchschnittlich 1,7-fache in den WT-Zellen, aber nicht in den PKGI-KO-MCs. Andererseits war in den PKGI-KO-Zellen aufgrund der Stimulation mit 8-Br-cGMP eine signifikante Reduktion der PKGII-Level um durchschnittlich die Hälfte der Kontrollzellen zu beobachten, die in den WT-Zellen nicht detektierbar war.

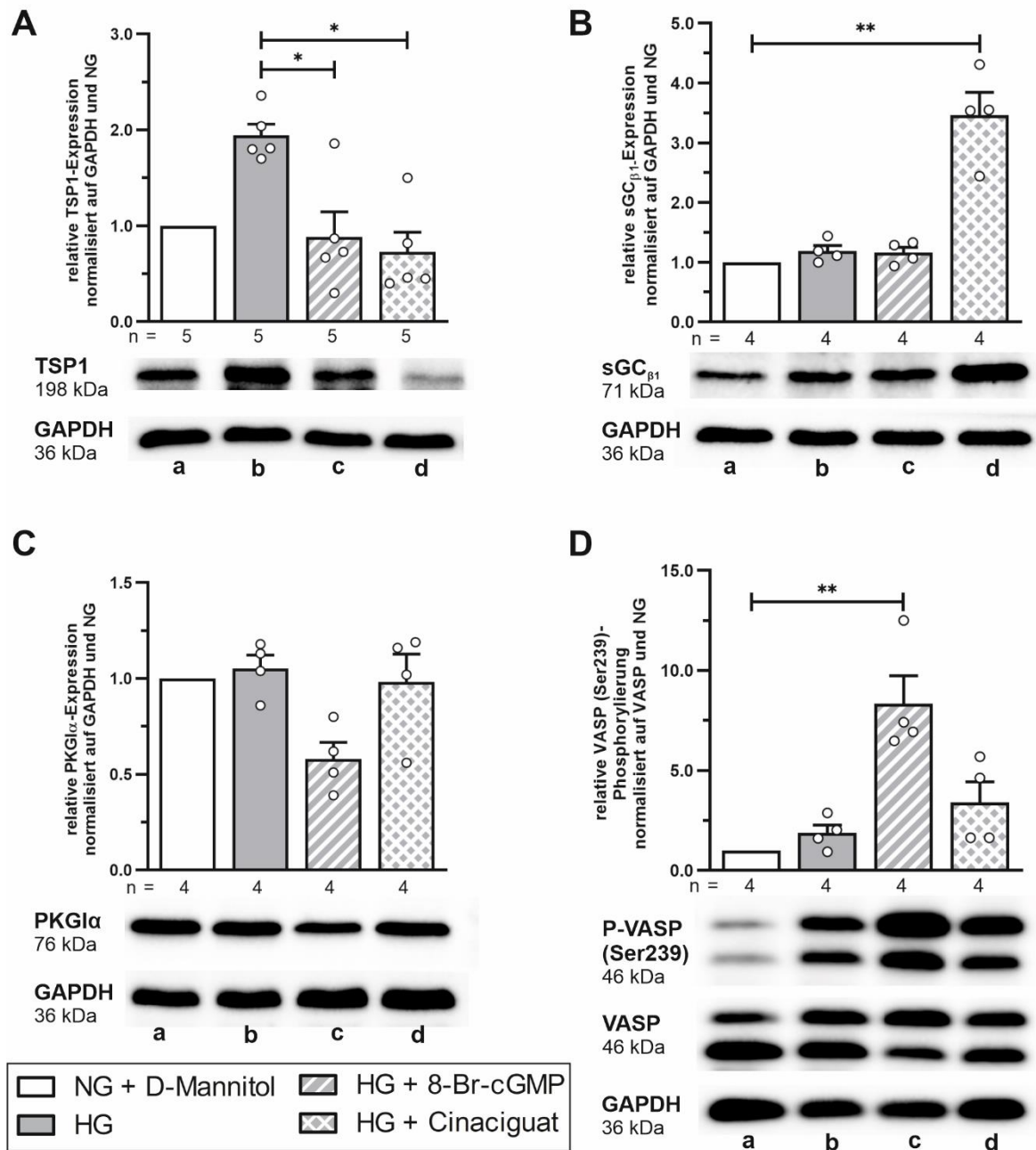
### 3.2.5 Die Rolle der PKGII in glukosestimulierten Mesangialzellen

Auch die PKGII-KO-MCs wurden wie zuvor die WT- und PKGI-KO-MCs mit LG- und HG-Kulturmedium inkubiert, sowie zusätzlich mit 8-Br-cGMP und Cinaciguat stimuliert. Anschließend wurden die Expressionsunterschiede verschiedener Proteine unter den einzelnen Behandlungsbedingungen mittels Western Blot analysiert. Repräsentative Blots und die zugehörige statistische Auswertung sind in Abbildung 3-19 dargestellt. Auch in den PKGII-KO-MCs konnte eine Erhöhung der TSP1-Expression durch die hohen Glukosekonzentrationen beobachtet werden. Die zusätzliche Stimulation mit 8-Br-cGMP oder Cinaciguat führte im Vergleich zu den HG-stimulierten Zellen allerdings auch bei fehlender PKGII zu einer signifikanten Verringerung der TSP1-Level (Abbildung 3-19 A).

Die sGC $\beta_1$ -Proteinlevel waren aufgrund der Inkubation mit Cinaciguat in den PKGII-KO-Zellen sogar um das 3,5-fache der Kontrollzellen erhöht (Abbildung 3-19 B).

Bei der Betrachtung der PKGI $\alpha$ -Expression fiel eine Reduktion des Proteins durch die 8-Br-cGMP-Behandlung auf, die zwar nicht in der Gesamtstatistik aber beim direkten Vergleich mit der HG-Gruppe statistisch signifikant war (Student's t-Test  $p = 0,0056$ ) (Abbildung 3-19 C).

Die Ser239-Phosphorylierung von VASP, ein Marker für die Aktivierung der PKGI, erhöhte sich in den PKGII-KO-Zellen durch die Stimulation mit 8-Br-cGMP deutlich um durchschnittlich das 8,3-fache, während die Inkubation mit Cinaciguat ebenfalls zu einer Erhöhung führte, die allerdings nicht statistisch signifikant war (Abbildung 3-19 D).



**Abbildung 3-19: Regulation der Proteinexpression in HG-stimulierten PKGII-KO-MCs.**

Repräsentative Immunoblots zeigen die Proteinexpression von **A** Thrombospondin 1 (TSP1) **B** löslichen Guanylylcyclase (sGC $\beta_1$ ), **C** cGMP-abhängigen Proteinkinase I $\alpha$  (PKGI $\alpha$ ), **D** Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP).

Auftrageschema: **a** NG + D-Mannitol; **b** HG; **c** HG + 8-Br-cGMP; **d** HG + Cin.

Die Expressionslevel wurden densitometrisch ausgewertet und auf GAPDH normiert. Anschließend wurde die Proteinexpression auf die gemittelte Expression der mit NG + D-Mannitol behandelten Kontrollzellen bezogen, die als 1 definiert wurde.

\*, \*\*:  $p < 0,05; 0,01$  (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test).

## 4 Diskussion

### 4.1 Beurteilung der Nierenschädigung im verwendeten Mausmodell

Alle typischen Merkmale eines humanen Krankheitsbilds in einem Tiermodell abzubilden ist immer eine Herausforderung, bei der diabetischen Nephropathie ist diese, wie in Kapitel 1.5 bereits beschrieben, allerdings besonders groß.

In dieser Arbeit wurden als Modellsystem eNOS-KO-Mäuse mit einem gemischten genetischen Hintergrund (Sv129/ C57BL/6J) eingesetzt, bei denen durch STZ-Injektionen ein Typ-1-Diabetes induziert wurde. Als Vergleichsgruppe wurden WT-Tiere herangezogen, die ebenfalls mit STZ behandelt wurden, als Kontrollgruppe dienten jeweils unbehandelte Wurfgeschwister. Die Versuchszeiträume betragen acht und zwölf Wochen. Im Folgenden soll nun zunächst analysiert werden, ob das in der vorliegenden Dissertation verwendete Modell zur Untersuchung der DN, die von der AMDCC geforderten Kriterien erfüllte (112).

#### 4.1.1 Induktion eines Typ-1-DM mittels STZ

Die Verwendung von STZ, um einen Typ-1-Diabetes in Mäusen zu induzieren, ist eine weit verbreitete und gut etablierte Methode. In diesem Projekt wurde das STZ in einer niedrigen Dosierung von 50 mg/kg/Tag i. p. über fünf Tage im sogenannten „*Low-dose*“-Regime verabreicht. Im Gegensatz dazu wird bei der Hochdosis-Gabe entweder einmalig 200 mg/kg oder an zwei aufeinanderfolgenden Tagen 100 mg/kg STZ injiziert (113, 118). Die geringeren STZ-Konzentrationen schädigen die Inselzellen des Pankreas nur partiell und induzieren inflammatorische Prozesse, die zu einem Aktivitätsverlust der Betazellen und letztendlich zur Insulindefizienz führen (164–166). Dieser Prozess ähnelt demnach den Mechanismen, die auch bei der Entwicklung des humanen Typ-1-Diabetes eine wichtige Rolle spielen. Außerdem kann mit der „*Low-dose*“-Strategie ausgeschlossen werden, dass die entwickelten Nierenschädigungen durch nephrotoxische Nebeneffekte des STZ verursacht wurden, wie es bei den hohen Dosierungen der Fall ist (167, 168).

Die angewendete STZ-Methode hat zudem den Vorteil, dass der praktische und finanzielle Aufwand eher gering ist. So sind beispielsweise keine aufwendigen Zuchten über mehrere Generationen notwendig, um einen bestimmten Genotyp mit entsprechenden Phänotyp zu erhalten.

Sowohl WT- als auch eNOS-KO-Mäuse entwickelten aufgrund der Behandlung mit STZ charakteristische Symptome eines Typ-1-DM.

Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren wiesen die STZ-behandelten Tiere signifikant erhöhte Blutzuckerspiegel auf. Das deutlich geringere Körpergewicht, eine stark ausgeprägte Glukosurie, sowie Polyurie und Polydipsie stellen weitere typische Merkmale der Erkrankung dar und sind ein sicheres Zeichen dafür, dass die Tiere einen Diabetes mellitus entwickelt haben (Kapitel 3.1.1).

Grundsätzlich konnten hier keine Unterschiede zwischen WT- und eNOS-KO-Mäusen festgestellt werden. Auffällig waren jedoch die Stoffwechselfparameter der eNOS-KO-Tiere nach zwölf Wochen DM (Tabelle 3-3 und Abbildung 3-1). Sowohl die Trinkmenge, als auch das ausgeschiedenen Urinvolumen waren im Vergleich zu den eNOS-KO-Tieren mit acht Wochen DM signifikant reduziert und lagen in etwa auf dem Niveau der unbehandelten Kontrollmäuse. Während die Polyurie als Folge der hohen Blutzuckerspiegel durch osmotische Diurese in der Niere verursacht wird, könnte eine plötzliche starke Abnahme der Urinmenge auf eine bereits fortgeschrittene Beeinträchtigung des Organs hinweisen (169–171).

#### **4.1.2 Untersuchung der Nierenfunktion im verwendeten STZ-Mausmodell**

Verschiedene Parameter können zur Beurteilung der Nierenfunktion herangezogen werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Kenngrößen werden nun nachfolgend detaillierter betrachtet.

##### Blutdruck

Sowohl WT- als auch eNOS-KO-Mäuse entwickelten nach Induktion des Typ-1-DM eine Hypertonie, die je länger der Diabetes bestand, stärker ausgeprägt war (Tabelle 3-4; Abbildung 3-2). Diabetes ist bekanntermaßen mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert, wobei Bluthochdruck zu den häufigsten Komorbiditäten zählt (172, 173). Insbesondere beim Typ-1-DM besteht eine starke Korrelation zwischen einem erhöhten Blutdruck und dem Grad der Albuminurie, sowie dem Progress der DN (174).

Wie außerdem bereits in der Literatur beschrieben, wiesen schon die gesunden eNOS-KO-Kontrollmäuse einen signifikant höheren systolischen Blutdruck auf, als die entsprechenden WT-Tiere, was die Bedeutung von NO im kardiovaskulären System widerspiegelt (118, 129, 175).

---

### Serumkreatinin und Kreatinin-Clearance

Die Bestimmung der Kreatininkonzentration im Serum und der daraus errechneten GFR gehört entsprechend der nationalen Versorgungsleitlinie zu den klinischen Standardlaborparametern, um eine Nierenerkrankung bei Patienten mit Diabetes mellitus festzustellen (176). Kreatinin ist das Abbauprodukt von Kreatin und wird vollständig renal ausgeschieden. Bei einer beeinträchtigten Nierenfunktion kommt es deshalb zu einem deutlichen Anstieg des Kreatininspiegels im Blut, der labordiagnostisch bestimmt werden kann (177). Da das endogene Kreatinin in den Glomeruli frei filtriert und weder tubulär rückresorbiert noch metabolisiert wird, kann über die Ermittlung der Kreatinin-Clearance auch die GFR abgeschätzt werden (178). Die Bestimmung von Kreatinin als renaler Marker ist allerdings nicht unumstritten. Verschiedene Einflussfaktoren, wie das Geschlecht, Körpergewicht und Muskelmasse, können das Ergebnis der Kreatinin-Clearance verfälschen und erschweren so den direkten Vergleich von verschiedenen Patienten (179). Außerdem konnte gezeigt werden, dass in Mäusenieren Kreatinin auch tubulär sezerniert wird, wodurch sich die Ausscheidung im Urin erhöht (180).

In dieser Arbeit wurde dennoch die Kreatinin-Clearance als Maß für die Nierenfunktion bestimmt. Im Vergleich zu inhomogenen Patientenpopulationen, bietet diese Studie mit Mäusen den Vorteil, dass alle Tiere männlich waren, den gleichen genetischen Hintergrund und das gleiche Alter aufwiesen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Variation bei der Kreatininkonzentration aufgrund der oben genannten Parameter vernachlässigbar sind.

In klinischen Laboratorien wird Kreatinin häufig mit der photometrischen Jaffé-Methode oder der moderneren enzymatischen Methode bestimmt. Allerdings können beide Methoden, insbesondere aber die Jaffé-Methode, durch verschiedenen Störgrößen in der Probe, wie beispielsweise Proteine, Ketone oder Glukose, stark beeinflusst werden (181, 182). Deshalb wurde in dieser Arbeit die Kreatininbestimmung in Serum und Urin mittels HPLC durchgeführt.

Die Serumkreatininspiegel waren bei den eNOS-KO-Mäusen nach zwölf Wochen DM als einzige Versuchsgruppe signifikant erhöht, wohingegen die Werte von den diabetischen WT-Tieren praktisch unverändert blieben (Tabelle 3-5; Abbildung 3-3). Dieses Ergebnis spricht zumindest bei den eNOS-KO-Tieren für eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion. Die unveränderten Kreatininkonzentrationen bei den WT-Tieren bedeuten allerdings nicht, dass eine Schädigung der Nieren sicher ausgeschlossen werden kann. Tatsächlich ist die



Bestimmung des Serumkreatinins in der frühen Phase der Nierenschädigung nur wenig sensitiv, weshalb trotz pathologischer Veränderungen des Organs, keine erhöhten Kreatininwerte feststellbar sind (179).

Um die GFR der Versuchstiere abschätzen zu können wurde mit Hilfe der Kreatininkonzentrationen in Serum und Urin, sowie der ermittelten Urinvolumina über 24 Stunden, die Kreatinin-Clearance bestimmt. Bei den diabetischen WT-Tieren und bei den eNOS-KO-Mäusen nach acht Wochen Diabetes konnte im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, eine deutliche Zunahme der Kreatinin-Clearance beobachtet werden (Tabelle 3-5; Abbildung 3-3). Diese initiale glomeruläre Hyperfiltration ist ein typisches Charakteristikum in der frühen Phase eines Diabetes mellitus (149). Die zugrunde liegenden physiologischen Mechanismen sind sehr komplex und beinhalten viele regulatorische Faktoren, wobei die erhöhten Blutzuckerspiegel und die veränderten Insulinlevel dabei eine Hauptrolle einnehmen (183). Die „Vaskuläre Hypothese“ geht von einem gesteigerten Nettofiltrationsdruck im Nierenkörperchen aus, der durch ein Ungleichgewicht verschiedener vasoaktiver Faktoren, wie NO, Angiotensin II oder atriales NP, verursacht wird, die den Gefäßtonus der afferenten und efferenten Arteriole regulieren (184). Die „Tubuläre Theorie“ basiert auf der gesteigerten Rückresorption von Glukose und Natrium im proximalen Tubulus über die Natrium-Glukose-Kotransporter aufgrund der hohen Blutzuckerspiegel. Die erhöhte Rückresorption verringert die Natriumkonzentration im Tubuluslumen, die von der Macula densa detektiert wird, wodurch über das tubuloglomeruläre Feedback die glomeruläre Filtration gesteigert wird (185). Der mechanische Stress, der aufgrund der Hyperfiltration auf den glomerulären Filter einwirkt, führt zu strukturellen Veränderungen und letztendlich zum Verlust der Nephrone und hat damit in der Pathogenese der DN eine große Bedeutung (186).

Im Gegensatz zu allen anderen diabetischen Versuchsgruppen nahm die Kreatinin-Clearance bei den eNOS-KO-Tieren nach zwölf Wochen Diabetes deutlich ab und lag bei durchschnittlich nur noch 56 % der Clearance der gesunden Kontrollgruppe. Im Vergleich zu den diabetischen eNOS-KO-Mäusen nach acht Wochen, war dieser Rückgang statistisch signifikant. Nach Mogensen et al. folgt einer initialen Hyperfiltration im Krankheitsprogress zunächst eine Normalisierung, dann eine Verringerung der GFR (21). Die deutliche Abnahme der Kreatinin-Clearance bei den eNOS-KO-Tieren nach zwölf Wochen DM, kann somit als ein Zeichen für eine fortgeschrittene Beeinträchtigung der Nierenfunktion gewertet werden.

### Renale und glomeruläre Hypertrophie

Die renale und glomeruläre Hypertrophie gehören zu den ersten Veränderungen, die bei einem Diabetes mellitus festgestellt werden können (21, 184, 187). Als Ursache für die Vergrößerung des Organs gilt insbesondere die glukoseinduzierte Hypertrophie der Epithelzellen des proximalen Tubulus (188, 189). Zudem ist ein vergrößertes Nierenvolumen meist mit einer glomerulären Hyperfiltration assoziiert (190, 191). Nach der Theorie von Brenner et al. stellt die Hypertrophie der Niere eine Art Kompensationsmechanismus dar, um die Funktion der Niere trotz Verlust an Nephronen aufrecht zu erhalten (192).

Auch in dieser Arbeit wurde die Veränderung der Nierengröße aufgrund des DM bei den einzelnen Versuchstieren untersucht. Wie der Tabelle 3-6 entnommen werden kann, hat das prozentuale Verhältnis von Nierengewicht zu Körpergewicht bei allen diabetischen Versuchstieren im Vergleich zu den gesunden Tieren zugenommen, in einigen Versuchsgruppen auch statistisch signifikant. Betrachtet man hingegen das absolute Organgewicht, kann bei den WT-Tieren zwar eine tendenzielle, aber nicht statistisch signifikante Gewichtszunahme beobachtet werden. Bei den eNOS-KO-Tieren waren ebenfalls keine ausgeprägten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen feststellbar. Da die Versuchstiere, wie es für einen Typ-1-DM typisch ist, während des Versuchszeitraums deutlich an Körpergewicht verloren haben, kommt die Zunahme des Verhältnisses von Nierengewicht zu Körpergewicht vermutlich hauptsächlich aufgrund des Gewichtsverlusts zustande und weniger durch eine Nierenhypertrophie. Das Körpergewicht ist demnach eine wenig geeignete Bezugsgröße, da die Nierenhypertrophie auf diese Weise eher überschätzt wird. Allerdings ist die Angabe des prozentualen Nieren-zu-Körpergewichtverhältnisses in der Literatur durchaus üblich. In ähnlichen Typ-1-DM-Tiermodellen zeigten die Tiere eine deutliche Zunahme des Nieren-zu-Körpergewichtverhältnisses, was trotz signifikanten Gewichtsverlust der Versuchstiere als Hypertrophie interpretiert wurde (118, 119, 193).

Interessant ist hier der direkte Vergleich der Nierengewichte von den jeweiligen unbehandelten Genotypen. Hier zeigte sich, dass eNOS-KO-Mäuse grundsätzlich kleinere Nieren aufwiesen als die gleichaltrigen WT-Tiere bei vergleichbarem Körpergewicht. Nierenatrophie ist mit dem Verlust von Nephronen und einer fortgeschrittenen DN assoziiert, ein Hinweis darauf, dass bereits eNOS-KO-Kontrolltiere Nierenschädigungen aufweisen (150). Außerdem liefert diese Beobachtung eine Erklärung für die fehlende Nierenhypertrophie bei den diabetischen eNOS-KO-Versuchstieren.

Auch wenn in dieser Arbeit keine deutliche renale Hypertrophie bei den Versuchstieren festgestellt werden konnte, so waren die Glomeruli der diabetischen Tiere dennoch signifikant

vergrößert, wobei sich keine Unterschiede zwischen den Versuchszeiträumen oder den Genotypen ergaben (Tabelle 3-8).

### Protein- und Albuminurie

Während die renale Proteinausscheidung als allgemeiner Marker einer Nierenfunktionsstörung gilt, stellt die Albuminurie ein spezifisches Kennzeichen einer glomerulären Schädigung dar. Bei einer gesunden Niere finden sich grundsätzlich nur sehr geringe Mengen Protein im Endharn. Große, geladene Plasmaproteine (>50–60 kDa), werden normalerweise durch den glomerulären Filter zurückgehalten und kleinere Proteine, welche die glomeruläre Kapillarwand durchqueren können, werden im proximalen Tubulus des Nephrons effizient resorbiert und metabolisiert. Finden sich dennoch größere Mengen Protein im Urin, ist das ein Zeichen für eine beeinträchtigte Nierenfunktion. Sowohl diabetische WT- als auch eNOS-KO-Mäuse zeigten im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren eine ausgeprägte Proteinurie und Albuminurie, ein Hinweis auf eine geschädigte Niere bei allen Tieren der einzelnen Versuchsgruppen. Die Albuminausscheidung bei den eNOS-KO-Mäusen nach zwölf Wochen DM war besonders deutlich erhöht, was für einen stärker geschädigten glomerulären Filter spricht, als bei den anderen Diabetestieren. Die Größenordnung der Albuminurie bei den eNOS-KO-Mäusen entsprach dabei den in der Literatur beschriebenen Werten (118, 194). Wie bereits bei den zuvor diskutierten Parametern festgestellt wurde, zeigen eNOS-KO-Mäuse auch ohne STZ-Behandlung Hinweise einer basalen Nierenschädigung. Passend dazu konnte bei diesen Kontrolltieren eine signifikant höhere Albuminurie als bei den WT-Kontrollmäusen festgestellt werden.

### **4.1.3 Nierenpathologie im STZ-Mausmodell**

Im Verlauf einer diabetischen Nephropathie kommt es neben funktionellen Einschränkungen auch zu strukturellen Veränderungen in der Niere. Zu den wichtigsten Merkmalen gehören die tubulointerstitielle Fibrose und die Expansion des Mesangiums.

Die tubulointerstitielle Fibrose zeichnet sich durch die Akkumulation von Myofibroblasten, eine überschießende Produktion extrazellulärer Matrix (ECM) und dem Untergang der renalen Tubuli aus (195). Die zugrundeliegenden Pathomechanismen, die zu den fibrotischen Veränderungen bei der DN führen sind komplex. Vor allem Entzündungsprozesse, die durch eine gesteigerte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen gekennzeichnet sind, nehmen eine zentrale Rolle bei der Entwicklung einer Fibrose ein (196).

Vor allem aktivierte Myofibroblasten, die charakteristischerweise den Marker  $\alpha$ SMA exprimieren, sind für die Synthese der ECM-Proteine, wie verschiedene Kollagene und Fibronectin verantwortlich (153, 197).

Die (immun-)histologische Untersuchung der Nieren, zeigte bei allen diabetischen Mäusen, unabhängig vom Genotyp, sowohl eine signifikante Zunahme der  $\alpha$ SMA-Proteinexpression, als auch von Collagen IV und Gesamtkollagen (Tabelle 3-8; Abbildung 3-5; Abbildung 3-6). Auch hier waren die Effekte bei den eNOS-KO-Tieren nach zwölf Wochen Diabetes besonders stark ausgeprägt. Bestätigt werden konnte diese Beobachtung durch die Analyse der mRNA-Level von Col IV, sowie Col I und Fibronectin, die bei den diabetischen Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ebenfalls erhöht waren (Abbildung 3-10; Tabelle 3-9). Bei den Versuchstieren wurden demnach durch die STZ-Behandlung auch strukturelle Nierenveränderungen in Form einer Fibrose induziert.

Reguliert wird die extrazelluläre Matrix durch die MMPs, wie die Col IV-spezifische MMP2, und diese wiederum durch die ihre spezifischen Inhibitoren TIMP. Eine Verringerung der MMPs führt gleichzeitig zu einer Vermehrung der ECM. In der Literatur wird sowohl in Tiermodellen als auch in Patienten mit DN eine Abnahme der MMP2- und eine Zunahme der TIMP1-Expression beschrieben (193, 198–200). In dieser Arbeit konnte zwar ebenfalls eine deutliche Zunahme der TIMP-1-mRNA in den diabetischen WT- und eNOS-KO-Tieren beobachtet werden aber auch, insbesondere in den Nieren der eNOS-KO-Tiere nach zwölf Wochen DM, einen starken Anstieg der MMP2-mRNA-Expression (Abbildung 3-10; Tabelle 3-9). Auch dieser gegenteilige Effekt auf die MMP2-Expression wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben (201–203). Vermutlich handelt es sich bei der Zunahme der MMP2-Expression um einen kompensatorischen Mechanismus in der früheren Phase der DN, als Reaktion auf die vermehrte ECM-Synthese. Im weiteren Progress der Erkrankung führt die erhöhte Expression der TIMP1 dann zu einer Reduktion der MMP2.

Neben den fibrotischen Veränderungen in der Niere, konnte außerdem sowohl in diabetischen WT- als auch eNOS-KO-Tieren eine Zunahme der mesangialen Matrix beobachtet werden (Abbildung 2-4), ein Charakteristikum der Glomerulopathie vor allem bei Typ-1-Diabetikern mit DN (204).

CD31 bzw. PECAM-1 wird unter anderem an der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert und ist an der Angiogenese beteiligt. In dieser Arbeit konnte eine signifikant gesteigerte CD31-Expression in den eNOS-KO-Mäusen nach zwölf Wochen Diabetes festgestellt werden (Abbildung 3-9). In der Literatur finden sich dazu widersprüchliche Daten. Zum einen

wird eine Reduktion der CD31-Expression in diabetischen Nieren von Mäusen beschrieben (205–207), zum anderen wurde aber auch von einer Zunahme der CD31-Expression (208) bzw. einem Anstieg der CD31+-Zellen in der Niere (209) in DN-Mausmodellen berichtet, was mit einer gesteigerten Neovaskularisation assoziiert wurde (210). In der Arbeit von Nakagawa et al., in der ebenfalls bei eNOS-KO-Mäusen mittels STZ eine Typ-1-Diabetes induziert wurde, wird von einer zunehmenden Expression des Endothelzellmarkers CD34 berichtet und mit einer gesteigerten Proliferation der Zellen assoziiert (118).

#### **4.1.4 Analyse der Podozytenschädigung**

Podozyten, als Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere, nehmen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie ein. Eine Schädigung oder der Verlust der Podozyten hängt nachgewiesenermaßen mit der Entwicklung einer Proteinurie zusammen (211). Um die Podozytenschädigung in den Nieren der Diabetestiere zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Expression von Nephrin als Podozytenmarker untersucht (Abbildung 3-7). In der Literatur finden sich verschiedene Studien, die eine Reduktion von Nephrin als Folge einer Podozytenschädigung bei der diabetischen Nephropathie beschreiben (212–214). In dieser Arbeit konnten jedoch auf Proteinebene keine Unterschiede der Nephrinexpression zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden, auf mRNA-Ebene nach jeweils zwölf Wochen Diabetes eine leichte Verringerung in den WT-Nieren und eine signifikante Reduktion in den eNOS-KO-Nieren (Abbildung 3-7).

Eine Erklärung für die geringen Effekte auf Proteinebene stellen die Expressionsunterschiede von Nephrin in den einzelnen Glomeruli einer Niere dar, wie auch bereits in einer anderen Arbeit gezeigt wurde (215). Vereinzelt Glomeruli zeigten in den diabetischen Nieren durchaus einen deutlichen Verlust der Nephrinexpression andere hingegen nicht. Zudem konnte gezeigt werden, dass es gerade in der frühen Phase der DN sogar zu einer Zunahme der Nephrinexpression kommt, die erst im Progress der Erkrankung deutlich abnimmt (216). Des Weiteren wurde beschrieben, dass bereits unbehandelte eNOS-KO-Mäuse geschädigte Podozyten aufweisen, weshalb die Effekte, die durch die Induktion eines Diabetes verursacht werden, verglichen zu den unbehandelten Tieren weniger ausgeprägt ausfallen (217).

Die Tatsache, dass die Versuchstiere eine nur gering ausgeprägte Beeinträchtigung der Podozyten aufweisen, steht hingegen nicht im Gegensatz zur ausgeprägten Protein- bzw. Albuminurie, die die Versuchstiere aufwiesen. Die pathophysiologischen Prozesse, die zur

Ausbildung der Proteinurie führen, sind vielfältig und verschiedene Zellen sind daran beteiligt. So existieren eindeutige Belege dafür, dass auch die Dysfunktion der Endothelzellen einen großen Anteil bei der Schädigung der glomerulären Filterbarriere hat (218–221).

#### **4.1.5 Fazit zum verwendeten Mausmodell**

Wie bereits in der Literatur beschrieben, wurden insbesondere bei den eNOS-KO-Mäusen nach zwölf Wochen DM Merkmale einer eingeschränkten Nierenfunktion beobachtet (118, 119, 222). Aber auch in allen anderen diabetischen Versuchstieren konnten Anzeichen einer pathologisch veränderten Niere festgestellt werden.

Der Vergleich der in dieser Arbeit erhaltenen Daten mit den geforderten AMDCC-Kriterien (Tabelle 1-1) zeigt, dass die eNOS-KO-Versuchsgruppe nach zwölf Wochen Diabetes beinahe alle geforderten Merkmale aufwies. So konnte bei diesen Tieren eine Hypertonie, eine signifikante Expansion der mesangialen Matrix und eine interstitielle Fibrose festgestellt werden. Ebenso wurde die Reduktion der GFR um 50 % fast erreicht.

Die Albuminurie der diabetischen Tiere im Vergleich zu den unbehandelten eNOS-KO-Mäusen war signifikant erhöht, allerdings nur um das 3,7-fache. Wie bereits diskutiert, wiesen die eNOS-KO-Kontrolltiere auch ohne STZ-Behandlung eine erhöhte Albuminkonzentration im Urin auf. Eine weitere Zunahme der Albuminurie durch die Hyperglykämie, war deshalb im Vergleich zur eNOS-Kontrollgruppe weniger stark ausgeprägt. Beim direkten Vergleich der eNOS-KO-Mäuse nach zwölf Wochen DM mit den gesunden WT-Tieren, konnte jedoch eine durchschnittliche Steigerung der Albuminurie um das 11,6-fache festgestellt werden, was der geforderten 10-fachen Erhöhung in den AMDCC-Kriterien entspricht. Die Verdickung der Basalmembran konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden, da dies eine elektronenmikroskopische Untersuchung erfordert, welche hier nicht zur Verfügung stand.

Nach den AMDCC-Kriterien ist das in dieser Arbeit verwendete Maus-Modell demnach geeignet, um die diabetische Nephropathie zu untersuchen.

Dennoch konnte durch eine histologische Begutachtung der Nieren, keine markante noduläre Sklerose in den Glomeruli nachgewiesen werden, wie es in anderen Studien gezeigt wurde (120, 121, 223), und auch die Podozytenschädigung war nur gering ausgeprägt.

Zudem gilt zu beachten, dass die eNOS-KO-Tiere bereits ohne STZ-Behandlung eine Nierenschädigung (Nierenatrophie, Albuminurie, erhöhtes Serumkreatinin) aufwiesen, die nicht durch den Diabetes verursacht wurde. Außerdem führt der globale Knockout eines Gens immer auch zu Kompensationsmechanismen, die die Ergebnisse beeinflussen können.

---

## 4.2 Pharmakologische Aktivierung der sGC als Therapieoption der DN

### 4.2.1 NO/sGC/PKG-Signalkaskade in der DN

Die eNOS und das durch die eNOS gebildete NO haben einen großen Einfluss auf die Funktion und Integrität des Endothels. Eine gestörte Funktion des Endothels in der Niere ist assoziiert mit der Entstehung und dem Progress einer diabetischen Nephropathie (224). In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass der NO-Stoffwechsel durch den Diabetes mellitus beeinträchtigt ist, wobei verschiedene pathophysiologische Prozesse beteiligt sind (225–227). Ein wichtiger Mechanismus stellt die Entkopplung der eNOS dar, wodurch vermehrt das Superoxidanion  $O_2^-$  anstelle von NO synthetisiert wird. Durch die anschließende Reaktion von NO mit dem  $O_2^-$ , entsteht die reaktive Sauerstoffspezies Peroxynitrit  $ONOO^-$ , welche inflammatorisch und zellschädigend wirkt. Trotz gleichbleibender oder zunehmender eNOS-mRNA bzw. -Proteinlevel, kommt es dennoch zu einer verringerten Bioverfügbarkeit von NO (228). Neben anderen Faktoren, wird die Entkopplung der eNOS insbesondere durch den diabetesinduzierten Mangel des eNOS-Kofaktors Tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ) gefördert (229, 230).

In dieser Arbeit wiesen die eNOS-KO-Tiere eine deutlich stärkere Beeinträchtigung der Nieren durch den Diabetes mellitus auf, als die WT-Tiere, was die wichtige Rolle von NO in der DN verdeutlicht und die Daten von Nakagawa et al. bestätigt (118).

Um den Einfluss des Diabetes mellitus auf die sGC/cGMP/PKG-Signalkaskade näher zu untersuchen, wurde die Expression der beteiligten Signalproteine in den diabetischen Nieren mittels RT-qPCR und/oder Western Blot analysiert. In allen diabetischen Versuchstieren konnte eine mehr oder weniger erhöhte Expression der entsprechenden Enzyme festgestellt werden (Abbildung 3-10; Abbildung 3-11). Vermutlich sind für diese Expressionszunahme vor allem kompensatorische Effekte verantwortlich, um die reduzierte Aktivierung der Signalkaskade durch NO auszugleichen. Auch der direkte Vergleich der basalen Proteinexpression in den Nieren der unbehandelten WT- und eNOS-KO-Tiere, zeigte eine grundsätzlich erhöhte Expression der sGC, sowie der PKGI $\alpha$  und  $\beta$  in den eNOS-KO-Nieren, was ebenfalls für die Hypothese einer Kompensation spricht (Abbildung 3-12).

In einer Studie von Dao et al. wurde in der *Aorta thoracica* von eNOS-KO-Mäusen, im Vergleich zu WT-Tieren, ebenfalls eine erhöhte sGC-Proteinexpression nachgewiesen. In weiteren *in vitro*-Versuchen zeigten die Forscher zudem, dass auch die Inhibition der endogenen NO-Produktion zu einer Expressionszunahme der sGC führt (231). Des Weiteren beobachteten Schinner et al. in einem Mausmodell zur Untersuchung der Nierenfibrose eine

---

Zunahme der sGC- und PKGI $\alpha$ / $\beta$ -mRNA-Level (232). Im Gegensatz dazu wurden in einem Rattenmodell der DN eine reduzierte sGC-Expression in den diabetischen Nieren nachgewiesen (193).

Mit der Analyse der Proteinexpression alleine, kann jedoch keine Aussage zur tatsächlichen Aktivität der sGC getroffen werden. Hierfür kann die Bestimmung der cGMP-Konzentration aufschlussreiche Informationen liefern. In diesem Fall wurden die cGMP-Konzentrationen im Urin der Diabetestiere bestimmt (Tabelle 3-7; Abbildung 3-4). Unerwartet waren diese unter den diabetischen Bedingungen bei allen Versuchstieren erhöht, wobei dieser Effekt bei den WT-Tieren besonders deutlich ausgeprägt war. Der direkte Vergleich von gesunden WT- und eNOS-KO-Mäusen zeigte allerdings auch hier eine signifikant erhöhte renale cGMP-Ausscheidung der eNOS-KO-Mäuse.

Zunächst erscheint die Zunahme der cGMP-Konzentrationen trotz Fehlen der eNOS widersprüchlich. cGMP wird jedoch, wie bereits beschrieben, nicht nur über den eNOS/sGC-Signalweg gebildet, sondern auch über den NP/pGC-Weg. In der Literatur wurde mehrfach berichtet, dass die NP-Konzentrationen unter diabetischen Bedingungen erhöht waren (233–235). Außerdem gibt es Hinweise, dass die extrazellulären cGMP-Konzentrationen eher über die NP/pGC-Signaltransduktion reguliert werden (236). Demnach könnten auch die cGMP-Spiegel im Urin aufgrund kompensatorischer Mechanismen in Folge der beeinträchtigten Signaltransduktion von NO erhöht sein.

Auch die cAMP-Spiegel im Urin waren, verglichen zu den unbehandelten Tieren, bei den Diabetestieren deutlich erhöht (Tabelle 3-7; Abbildung 3-4). Hier konnten bei der basalen cAMP-Ausscheidung keine Unterschiede zwischen WT- und eNOS-KO-Tiere festgestellt werden. Es ist weithin bekannt, dass die PKA/cAMP-Signaltransduktion eine wichtige Rolle bei der Regulation des Glukosemetabolismus im Körper spielt (237) und dass Glukose beispielsweise die cAMP-Produktion in den pankreatischen Betazellen stimulieren kann (238). Sowohl die PDE5 als auch PDE9 binden spezifisch cGMP und bauen dieses ab, um so die intrazellulären cGMP-Spiegel zu regulieren. Während die PDE5 vor allem cGMP kontrolliert, welches über die NO/sGC-Signalkaskade gebildet wurde, baut die PDE9 vor allem cGMP ab, das durch NP/pGC generiert wurde (239).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass diese beiden PDEs in den diabetischen Nieren gegensätzlich reguliert werden. Die PDE5a-Expression wurde durch die diabetischen Bedingungen stimuliert, während die PDE9a-Proteinlevel deutlich reduziert wurden. Von einer diabetesinduzierten Zunahme der der PDE5-Proteinexpression wurde auch in anderen Arbeiten,



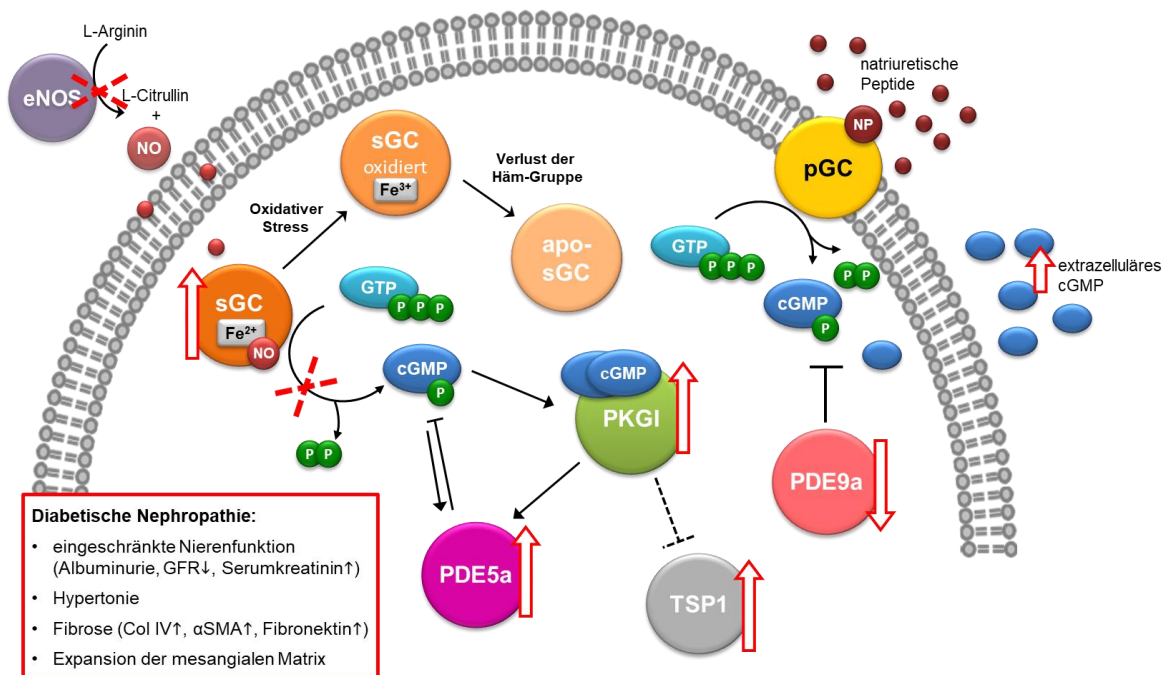
beispielsweise im Nierengewebe (193, 240), in Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems (241) oder im Herzen (242), berichtet.

Die PDE9a-Expression in der diabetischen Niere wurde bisher in anderen Studien nicht untersucht. Die deutliche Abnahme der PDE9a könnte aber erhöhte Konzentrationen an NP/pGC-generiertes cGMP zur Folge haben, was mit den hohen cGMP-Spiegeln im Urin zusammenpasst. In kardialen Myozyten konnte außerdem gezeigt werden, dass die beiden PDEs in unterschiedlichen Kompartimenten vorliegen und dadurch möglicherweise auch unterschiedlich reguliert werden (243).

TSP1 spielt als Regulator des profibrotischen und inflammatorischen Wachstumsfaktors TGF $\beta$  und der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle in der DN (162). In einer Studie von Daniel et al. wurden in den Glomeruli von STZ-behandelten Mäusen, verglichen zur unbehandelten Kontrollgruppe, eine deutlich erhöhte TSP1-Expression festgestellt (244). In Patienten mit Typ-1-Diabetes waren die TSP1-Plasmakonzentrationen gegenüber den gesunden Probanden ebenfalls deutlich erhöht (245). Auch in dieser Arbeit führten die hyperglykämischen Bedingungen zu einer deutlichen Induktion der TSP1-mRNA-Expression in der Niere. In der Arbeitsgruppe um Murphy-Ullrich J. E. wurde in mehreren Publikationen postuliert, dass glukoseinduziertes TSP1 durch die PKGI gehemmt werden kann (246–248). Die Expressionszunahme von TSP1 trotz ebenfalls erhöhter PKGI-Level, wie hier beobachtet wurde, scheint deshalb zunächst widersprüchlich. Eine erhöhte Proteinmenge bedeutet allerdings nicht automatisch eine erhöhte Enzymaktivität. Ein Mangel an NO und folglich an cGMP führt zu einer geringeren Aktivierung der PKGI und somit zu einer fehlenden Phosphorylierung und Regulierung der nachfolgenden Substratproteine. Der genaue Mechanismus, wie PKGI die TSP1 kontrolliert, ist nicht untersucht. In der Proteinsequenz von TSP1 findet sich jedoch die charakteristische Erkennungssequenz (R/K)<sub>2-3</sub>-X-S/T der cGMP-abhängigen Proteinkinasen (249) in Form von K-K-V-S, weshalb eine Regulation der TSP1 durch Phosphorylierung denkbar ist.

In Abbildung 4-1 sind die Einflüsse des Diabetes mellitus auf die Expression einzelner Signalproteine in der Niere nochmals schematisch zusammengefasst.

## Diabetes mellitus



**Abbildung 4-1: Einfluss des DM auf die Proteine der NO/sGC/cGMP-Signalkaskade.**

Die Veränderungen der Proteinexpression aufgrund des Diabetes sind mit roten Pfeilen dargestellt. Die Hyperglykämie führt zu einer verringerten eNOS-Aktivität und diese folglich zu einer reduzierten cGMP-Synthese (rotes Kreuz). Zur Kompensation des NO-Mangels nahm die Expression von sGC und PKGI zu. Auch die Expression von PDE5a und TSP1 wurde erhöht, wobei sich die PDE9a-Level verringerten. Als Folge der reduzierten PDE9a-Expression wurde weniger pGC-generiertes cGMP abgebaut, wodurch die extrazelluläre cGMP-Konzentration anstieg.

eNOS – endotheliale NO-Synthase; sGC – lösliche Guanylylcyclase; cGMP – zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat; GTP – Guanosin-5'-Triphosphat; pGC – partikuläre Guanylylcyclase; PKG – cGMP-abhängige Proteinkinasen; PDE – Phosphodiesterasen; TSP1 – Thrombospondin

### 4.2.2 Einfluss von Cinaciguat auf die diabetische Nephropathie

Die Erhöhung der renalen cGMP-Spiegel als Therapiestrategie zur Behandlung der DN, ist kein völlig neues Konzept. So gibt es beispielsweise vielversprechende präklinische und klinische Daten zur PDE5-Inhibition (206, 240, 250) oder zum Einsatz von sGC-Stimulatoren (103, 251, 252) bei der diabetischen Nephropathie. Auch mit sGC-Aktivatoren konnten in Rattenmodellen eine Verbesserungen der diabetes-induzierten Nierenschäden erreicht werden (193, 253).

Im Gegensatz zu sGC-Stimulatoren können sGC-Aktivatoren auch die oxidierte, Häm-freie apo-sGC aktivieren und so der durch oxidativem Stress verringerten Bioverfügbarkeit von

NO entgegenwirken. Deshalb wurde in dieser Arbeit der sGC-Aktivator Cinaciguat als Behandlungsoption der DN untersucht. Dazu wurde den diabetischen Tieren in den jeweils letzten vier Wochen des acht- bzw. zwölfwöchigen Versuchszeitraums Cinaciguat oral über das Futter verabreicht.

Die Gabe von Cinaciguat hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Grunderkrankung Diabetes mellitus (Kapitel 3.1.1). Unabhängig vom Genotyp, blieben die erhöhten Blutzuckerspiegel, die ausgeprägte Glukosurie, das verringerte Körpergewicht, sowie die Polyurie und Polydipsie unbeeinflusst von der zusätzlichen pharmakologischen Aktivierung der sGC. Auch in anderen Studien zu Cinaciguat in der diabetischen Nephropathie, hatte die sGC-Aktivierung keinen Effekt auf die Hyperglykämie oder andere typische Diabetessymptome (193, 254). Auch PDE5-Inhibitoren zeigten in STZ-induzierten Diabetesmodellen keinen Einfluss auf die Hyperglykämie (206, 240, 255). Dennoch deuten verschiedene Arbeiten darauf hin, dass NO eine Rolle bei der Insulinsekretion und dem Glukosemetabolismus spielt. Die genaue Bedeutung von NO bei der Freisetzung von Insulin wird kontrovers diskutiert (256), es konnte aber gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen fehlendem NO und der Insulinresistenz bei Typ-2-Diabetes gibt (257). Es wurde postuliert, dass die Expression des insulinabhängigen Glukosetransporters GLUT4 durch die NO/sGC/cGMP-Signaltransduktion reguliert wird (258, 259). In dieser Arbeit und den anderen zuvor genannten Studien, wurden STZ-induzierte Typ-1-Diabetesmodelle eingesetzt, um die sGC-Aktivierung und PDE5-Inhibitoren zu analysieren. Diese Tiere wiesen also eher einen Insulinmangel und keine Insulinresistenz wie beim Typ-2-Diabetes auf. Die pharmakologische Aktivierung der sGC/cGMP-Signalkaskade hätte demnach in Typ-1-Diabetesmodellen keinen Einfluss auf die hohen Blutzuckerspiegel.

Hypertonie entsteht beim Typ-1-Diabetes als typische Folgekomplikation aufgrund vaskulärer Veränderungen und der Entwicklung einer Nierenschädigung (173). Auch in dieser Arbeit wiesen alle STZ-behandelten Tiere einen erhöhten systolischen Blutdruck auf (Kapitel 3.1.2). Allerdings hatte die zusätzliche Gabe von Cinaciguat keinen Einfluss auf die Hypertonie, obwohl bereits in anderen prä-klinischen Modellen eine Blutdrucksenkende Wirkung von sGC-Aktivatoren und -Stimulatoren gezeigt wurde (260). Cinaciguat ist ein hochpotenter Wirkstoff, mit einer mittleren effektiven Konzentration (EC50) von ~10 nM für die Häm-freie apo-sGC (261). In einer klinischen Studie verursachten höhere Dosen von Cinaciguat eine deutliche Blutdrucksenkung bei den behandelten Patienten (109, 110), was letztendlich zum Abbruch der Studie führte. Deshalb wurde den diabetischen Mäusen in dieser Arbeit eine niedrigere Dosierung des sGC-Aktivators verabreicht. Die Konzentration im

Futter der Tiere wurde so gewählt, dass die durchschnittliche tägliche Aufnahme ungefähr 3 mg/kg betrug, um einen zu starken Blutdruckabfall zu vermeiden. Boustany-Kari et al. konnten mit ihrem sGC-Aktivator BI 703704 in einem Rattenmodell der DN bei einer ähnlichen Dosierung protektive Effekte auf die Niere, aber noch keine blutdrucksenkende Wirkung feststellen. Erst bei höheren Dosierungen und längeren Behandlungszeiträumen wurde eine signifikante Reduktion des Blutdrucks beschrieben (253). Auch mit dem sGC-Stimulator BAY 41-8543 wurden dosisabhängige Effekte auf den Blutdruck nachgewiesen (262), weshalb davon auszugehen ist, dass in diesem Fall die verabreichte Cinaciguatdosis zu gering war, um einen messbaren Einfluss auf dem Blutdruck zu haben.

Auch wenn die Behandlung mit Cinaciguat keinen Einfluss auf die Hyperglykämie und Hypertonie hatte, so konnte dennoch ein protektiver Effekt auf die Nierenfunktion erreicht werden (Kapitel 3.1.3). Während die eNOS-KO-Tiere nach zwölf Wochen Diabetes eine reduzierte Kreatinin-Clearance aufwiesen, lag diese bei den mit Cinaciguat behandelten Tieren, signifikant höher, auf dem Niveau der Versuchsgruppe nach acht Wochen DM. Ein deutlicher Hinweis darauf, dass Cinaciguat den Progress der DN verlangsamt. Die ermittelten Daten zur täglichen Wasseraufnahme und Urinausscheidung spiegeln diesen Effekt wieder. Die jeweiligen Volumen erhöhten sich durch die Gabe des sGC-Aktivators bei den eNOS-KO-Tieren nach zwölf Wochen Diabetes signifikant. Bei den anderen Versuchstieren konnte durch die Cinaciguatgabe kein Effekt auf die erhöhte Kreatinin-Clearance festgestellt werden. Wie bereits zuvor diskutiert, wird die glomeruläre Hyperfiltration vor allem durch hohe Blutzuckerspiegel hervorgerufen, auf die die Cinaciguatbehandlung keinen Einfluss hatte, weshalb hier keine normalisierende Wirkung auf die GFR zu erwarten war.

Des Weiteren verhinderte die sGC-Aktivierung mit Cinaciguat den signifikanten Anstieg des Serumkreatinins und der Albuminurie bei den eNOS-KO-Mäusen nach zwölf Wochen Diabetes, was ebenfalls für eine protektive Wirkung auf die Niere spricht. Interessanterweise konnten keine Effekte auf die Proteinurie im Allgemeinen festgestellt werden. Wie bereits erwähnt stellt die Albuminurie vor allem ein Marker für die glomeruläre Schädigung dar, während die Gesamtproteinausscheidung auch von geschädigten tubulären Endothelzellen beeinflusst wird. Hier könnten dosisabhängige Effekte aber auch die Behandlungsdauer eine Rolle spielen. Czirik et al. erreichten in einem Rattenmodell mit der Gabe von 10 mg/kg Cinaciguat peroral, eine signifikante Verringerung der Proteinurie, allerdings war diese im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe immer noch deutlich erhöht (193). Mit dem sGC-Aktivator BI 703704 konnte bereits mit einer Dosis von 3 mg/kg eine signifikante Reduktion

der Proteinausscheidung festgestellt werden, allerdings erst nach einem Behandlungszeitraum von sieben Wochen (253).

Sowohl bei den diabetischen WT- als auch den eNOS-KO-Tieren führte die zusätzliche Cinaciguatbehandlung zu einer signifikanten Reduktion der fibrotischen Nierenveränderungen. Insbesondere bei den Tieren nach zwölf Wochen Diabetes, verhinderte die Aktivierung der sGC die vermehrte Bildung von Kollagenablagerungen in der Niere, sowie die diabetesinduzierte Expression verschiedener Fibrosemarker wie Collagen IV, Collagen I, Fibronektin und  $\alpha$ SMA. Diese positiven Effekte der NO/sGC/cGMP-Signalkaskade wurden bereits in einem Mausmodell der Nierenfibrose beschrieben, wobei dabei insbesondere die PKGI eine bedeutende Rolle spielte (232, 263). Als mögliche Konsequenz der geringeren Kollagenmenge in der Niere, verringerte sich durch die Gabe von Cinaciguat auch die Expression von MMP2, welches die extrazelluläre Matrix und insbesondere Collagen IV reguliert, sowie dessen Inhibitor TIMP1.

Außerdem konnte durch die pharmakologische Aktivierung der sGC, insbesondere in den eNOS-KO-Nieren, die diabetesinduzierte Expansion des Mesangiums erfolgreich inhibiert werden.

#### **4.2.3 Einfluss von Cinaciguat auf die Expression verschiedener Signalproteine in der diabetischen Niere**

Unter den diabetischen Bedingungen in der Niere, waren die Expression der einzelnen Signalproteine der sGC/cGMP/PKG-Signalkaskade, sowie die cGMP-Level im Urin deutlich erhöht. Wie bereits diskutiert, sind dafür vermutlich Kompensationsmechanismen verantwortlich, um die verringerte NO-Bioverfügbarkeit durch den Diabetes mellitus auszugleichen.

Die zusätzliche Gabe des sGC-Aktivators Cinaciguat verringerte sowohl die mRNA- als auch die Proteinlevel der sGC auf das Niveau der unbehandelten Kontrollnieren, insbesondere bei den eNOS-KO-Mäusen. Dies spricht für den postulierten Feedbackmechanismus, wodurch die sGC-Expression bei NO-Mangel gesteigert wird, um die Aktivierung der Signalkaskade aufrechtzuerhalten. Durch Aktivierung der sGC-Signalkaskade mit Cinaciguat wird die sGC-Expression jedoch herunterreguliert, um einer überschießenden Reaktion entgegenzuwirken. Auch Zhou et al. postulierten einen negativen Feedbackmechanismus, da sie *in vitro* nachweisen konnten, dass die PKGI $\alpha$  die sGC phosphoryliert und so die Enzymaktivität inhibiert (264).

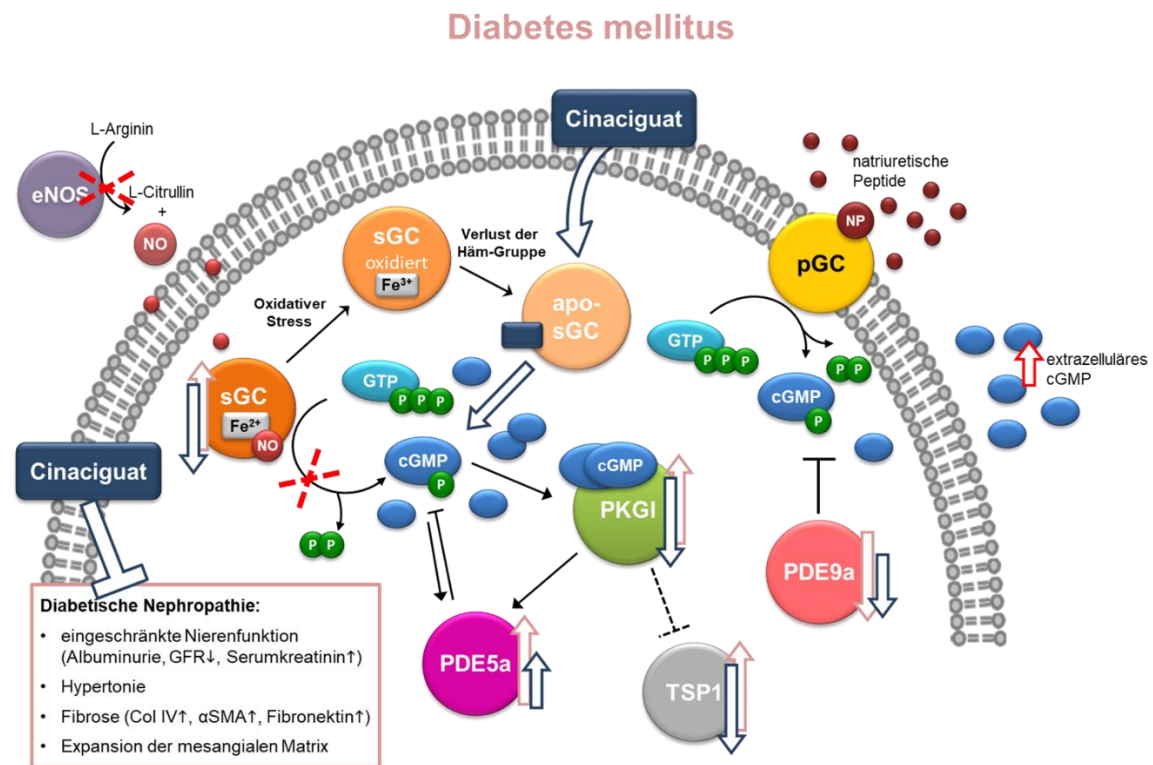
Auch die durch Diabetes erhöhte Expression der PKGI $\alpha$  konnte vor allem in den eNOS-KO-Tieren durch die sGC-Aktivierung mit Cinaciguat signifikant verringert werden, während die PKGI $\beta$ -Expression dadurch nicht beeinflusst wurde.

Die cGMP-Spiegel im ausgeschiedenen Urin wurden überraschenderweise durch den sGC-Aktivator kaum beeinflusst, gleiches gilt für die ausgeschiedenen cAMP-Konzentrationen. Obwohl eine deutliche Zunahme der cGMP-Level durch Cinaciguat erwartet wurde, konnte nur im Urin der eNOS-KO-Mäuse nach zwölf Wochen DM eine geringe und nicht statistisch signifikante Steigerung beobachtet werden. In dem Typ-1-Diabetesmodell von Czirok et al. hingegen, wurden signifikant erhöhte cGMP-Konzentrationen im Urin durch die sGC-Aktivierung beschrieben, allerdings wurde mit 10 mg/kg/Tag Cinaciguat auch eine deutlich höhere Dosis verabreicht, als in der vorliegenden Arbeit. Es könnte sich also um einen Dosis-abhängigen Effekt handeln. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass die Zunahme der cGMP-Konzentration im Nierengewebe in Abhängigkeit von der sGC-Aktivator-Konzentration im Plasma, ab einem bestimmten Punkt einen Sättigungsbereich erreicht. Eine weitere Zunahme der Wirkstoffkonzentration führte also zu keiner weiteren cGMP-Erhöhung (253). Auch dieses Ergebnis liefert eine mögliche Erklärung für die geringe Konzentrationsveränderung von cGMP durch Cinaciguat, da in der hier vorliegenden Arbeit die renale cGMP-Ausscheidung durch den Diabetes bereits deutlich erhöht war und somit möglicherweise die physiologisch mögliche Maximalkonzentration schon erreicht war.

Die Proteinexpression der cGMP-regulierenden Phosphodiesterasen PDE5 und PDE9 wurden durch die Therapie mit Cinaciguat nicht statistisch signifikant verändert, allerdings sind Tendenzen erkennbar. In den diabetischen WT-Tieren und in den eNOS-KO-Tieren nach acht Wochen DM, war eine leichte Reduktion der PDE5a-Level erkennbar, nach zwölf Wochen DM in den eNOS-KO-Nieren eine tendenzielle Hochregulation. Auch in anderen Arbeiten wurde berichtet, dass die durch den DM erhöhte PDE5a-Expression in verschiedenen Geweben durch Cinaciguat reduziert werden konnte (254, 265). Die PDE9a-Level, die unter den diabetischen Bedingungen bereits erniedrigt waren, wurden durch Cinaciguat noch weiter reduziert. Um eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen zu finden, sind allerdings noch weitergehende Untersuchungen zur Regulation der PDE9 in der Niere notwendig.

Des Weiteren führte die pharmakologische Aktivierung der sGC mit Cinaciguat zu einer effektiven Hemmung der glukoseinduzierten Zunahme der TSP1-Level. Dieses Ergebnis stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Daten überein. So führte die Stimulation von humanen Endothelzellen mit einem NO-Donor *in vitro* zu einer Reduktion der TSP1-Expression (266) und auch in einem *in vivo*-Modell zur Untersuchung der Glomerulonephritis

konnte durch die Gabe eines PDE5-Inhibitors eine Reduktion der TSP1-Level in den Glomeruli erreicht werden (267). In Abbildung 4-2 ist die Wirkung des sGC-Aktivators Cinaciguat auf die Proteinexpression der NO/sGC/cGMP/PKG-Signalkaskade schematisch zusammengefasst.



**Abbildung 4-2: Einfluss der pharmakologischen Aktivierung der sGC mit Cinaciguat auf die durch DM veränderte Expression einzelner Signalproteine.**

Die Veränderungen der Proteinexpression aufgrund Cinaciguat sind mit blauen Pfeilen markiert. Cinaciguat aktiviert die sGC NO- und Häm-unabhängig, wodurch sich die intrazellulären cGMP-Konzentrationen erhöhen. Dies führt zur Reduktion der Expression von sGC, PKGI und TSP1. Die PDE5a-Level werden tendenziell weiter erhöht, während die PDE9a-Expression noch weiter abnimmt. Auf die extrazelluläre cGMP-Konzentration im Urin hat Cinaciguat keinen Einfluss.

eNOS – endotheliale NO-Synthase; sGC – lösliche Guanylylcyclase; cGMP – zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat; GTP – Guanosin-5'-Triphosphat; pGC – partikuläre Guanylylcyclase; PKG – cGMP-abhängige Proteinkinasen; PDE – Phosphodiesterasen; TSP1 – Thrombospondin

---

### 4.3 Glukoseinduzierte Effekte auf die NO/sGC/cGMP-Signalkaskade in MCs

Die Niere ist ein komplexes Organ, welches aus vielen verschiedenen Zelltypen besteht. Deshalb gibt es keinen bestimmten Zelltyp, der alleine für die pathophysiologischen Mechanismen verantwortlich ist, die zur Entwicklung einer diabetischen Nephropathie führen, vielmehr handelt es sich um ein Zusammenspiel verschiedener Einflussfaktoren (268). Dennoch wurden für die vorliegende Arbeit die glomerulären Mesangialzellen ausgewählt, um vor allem glukoseinduzierte Effekte auf die NO/sGC/cGMP-Signalkaskade zu untersuchen. In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass die Proteine dieses Signalwegs in den Mesangialzellen deutlich exprimiert werden (232, 269, 270), außerdem ist sicher erwiesen, dass die Mesangialzellen als Produzenten der extrazellulären Matrix grundlegend an der Krankheitsentstehung der DN beteiligt sind (18).

#### 4.3.1 Untersuchung der Proteinregulation in Wildtyp-MCs

In dieser Arbeit wurde mit primären Mesangialzellen aus den Nieren von Mäusen gearbeitet. Um die hohen Blutzuckerspiegel eines Diabetes mellitus zu simulieren, wurden diese mit 25 mM D-Glucose im Zellkulturmedium inkubiert. Auf zusätzliches Insulin im Medium wurde verzichtet, da in der Literatur von der Dimerisierung der PKGI $\alpha$  aufgrund Insulin berichtet wurde (271). Da es sich bei dem wichtigsten Glukosetransporter in Mesangialzellen um das insulinunabhängige GLUT1 (272) handelt, war gewährleistet, dass dennoch genug Glukose von den Zellen aufgenommen werden kann. Außerdem handelt es sich bei dem untersuchten Mausmodell um ein Typ-1-Diabetes-Modell, welches durch einen Insulinmangel gekennzeichnet ist. Die gewählte Normalglukosebedingung entsprach mit 8 mM nicht dem üblichen humanen Nüchternblutzuckerspiegel von 5,5 mM, da dieser bei Mäusen im Schnitt höher zwischen 7–10 mM liegt (140). Außerdem wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass eine zu niedrige Glukosekonzentration die Vitalität der Mesangialzellen beeinträchtigt (273).

Zusätzlich wurden die Zellen entweder mit 8-Br-cGMP oder Cinaciguat inkubiert, um die PKG oder die sGC exogen zu aktivieren. Um zu kontrollieren, ob die Aktivierung der PKGI erfolgreich war, wurde mittels Western Blot die Phosphorylierung des PKGI-Substrats VASP untersucht. Tatsächlich konnte eine starke Zunahme der Phosphorylierung durch die



Stimulation mit 8-Br-cGMP beobachtet werden. Auch mit Cinaciguat wurde VASP vermehrt phosphoryliert, allerdings war der Effekt deutlich schwächer und nicht statistisch signifikant.

Die hohen Glukosespiegel führten in den Mesangialzellen zu erhöhten mRNA-Level der ECM-Proteine Fibronektin und Collagen IV, sowie des profibrotischen Zytokins TGF $\beta$ . Durch die Stimulation der Zellen mit 8-Br-cGMP oder Cinaciguat konnte diese Expressionszunahme verhindert werden. Somit bewirkte die Aktivierung der sGC/cGMP/PKG-Signalkaskade auch in den Mesangialzellen einen antifibrotischen Effekt, wie er auch in den diabetischen Nieren beobachtet wurde (Abbildung 3-14).

Die Proteinexpression der sGC und PKG $\text{I}\alpha$  veränderte sich durch die HG-Stimulation im Gegensatz zu den *in vivo* Ergebnissen nicht. Nur auf mRNA-Ebene konnte eine Erhöhung der sGC-Level detektiert werden. Die Stimulation der Mesangialzellen mit 8-Br-cGMP führte jedoch zu einer deutlichen Verringerung der PKG $\text{I}\alpha$ -Expression, die wahrscheinlich auf kompensatorische Mechanismen zurückzuführen ist.

Interessanterweise konnte eine starke Zunahme der sGC-Proteinmenge aufgrund der Cinaciguat-Stimulation festgestellt werden, obwohl auf mRNA-Ebene eher eine Abnahme zu beobachten war. *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass Cinaciguat die sGC stabilisieren und so vor proteasomalen Abbau schützen kann (86), wodurch sich entsprechend die Proteinmenge erhöht.

Wie in der Gesamtniere bereits beobachtet werden konnte, wurde die Proteinexpression der PDE5a und PDE9a auch in den Mesangialzellen gegensätzlich reguliert. Während die PDE5a-Level vor allem durch die Stimulation mit 8-Br-cGMP deutlich zunahmten, verringerten sich die PDE9a-Level, insbesondere durch die Inkubation mit Cinaciguat. Die Zunahme der PDE5a-Expression lässt sich vor allem mit dem bekannten negativen Feedback-Mechanismus der PKGI erklären (274, 275). Dass nicht nur die PDE5-Aktivität sondern auch die Proteinexpression durch die PKGI reguliert wird, zeigen die Ergebnisse aus den Versuchen mit den PKGI-KO-Zellen (Abbildung 3-16).

Die Expression des matrizellulären Proteins TSP1 war unter den hyperglykämischen Bedingungen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ebenfalls deutlich erhöht, wobei auch hier die Stimulation mit 8-Br-cGMP oder Cinaciguat zu einer Normalisierung der TSP1-Level führte.

In einer Arbeit von Wang S. et al. wurde bereits beschrieben, dass die TSP1-Expression in Mesangialzellen durch Glukose induziert werden kann und dass diese Hochregulation mit Hilfe eines NO-Donors inhibiert wurde (247). Des Weiteren zeigten die Autoren, dass die

---

PKG-Aktivität und -Expression unter hyperglykämischen Bedingungen reduziert waren, eine Überexpression der katalytischen PKG-Domäne hingegen zur Inhibition der TSP1-Expression führte (246, 248). Wang S. et al. postulierten deshalb, dass die Regulation der TSP1 PKG-abhängig ist. Um zu überprüfen, ob diese Hypothese stimmte, wurden im Folgenden Versuche mit Mesangialzellen durchgeführt, die aus PKGI- und PKGII-KO-Mäusen isoliert wurden.

#### 4.3.2 Untersuchung der Proteinregulation in PKGI- und PKGII-KO-Zellen

Die primären PKGI-KO-Mesangialzellen wurden wie die WT-Zellen isoliert und entsprechend mit den verschiedenen Glukosekonzentrationen, sowie 8-Br-cGMP und Cinaciguat inkubiert.

Mit einem spezifischen PKGI $\alpha$ -Antikörper konnte nachgewiesen werden, dass in den verwendeten KO-Zellen keine PKGI mehr exprimiert wurde (Abbildung 3-16 A). Auch die Analyse der VASP-Phosphorylierung zeigte keine Effekte mehr durch die 8-Br-cGMP-Stimulation, was für einen erfolgreichen *Knockout* der PKGI spricht. Zudem konnte in den PKGI-KO-Zellen auch keine Zunahme der PDE5a-Expression nach Stimulation mit 8-Br-cGMP mehr beobachtet werden. Das bedeutet, dass nicht nur die Aktivität der PDE5 durch den in der Literatur beschriebenen Feedbackmechanismus der PKGI (274, 275) reguliert wird, sondern interessanterweise auch die Proteinexpression.

Überraschenderweise, konnten bei der TSP1-Expression in den PKGI-KO Zellen keine Unterschiede zu den WT-Zellen festgestellt werden. Die Stimulation mit 8-Br-cGMP und Cinaciguat führte auch hier zu einer signifikanten Reduktion der TSP1-Level, was gegen eine alleinige Regulation durch die PKGI spricht. Die in der Literatur aufgestellte Hypothese, dass TSP1 durch die PKGI reguliert wird, konnte somit nicht bestätigt werden. Allerdings wurden bei der betreffenden Arbeit keine Versuche mit echten PKGI-KO-Modellen durchgeführt, sondern lediglich die PKGI in Zellen überexprimiert (246).

Im Allgemeinen werden PKGI und PKGII in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert und haben dort auch verschiedene Funktionen. So kommt die PKGI unter anderem in Glattmuskelnzellen, Thrombozyten oder Fibroblasten vor, während die PKGII in verschiedenen Gehirnbereichen, den Chondrozyten oder der intestinalen Mukosa lokalisiert ist. Auch auf subzellulärer Ebene unterscheiden sich die beiden Kinasen. Bei der PKGII handelt es sich um ein membranständiges Protein, während die PKGI im Zytosol vorliegt (52).

Dennoch finden sich in der Literatur Hinweise, dass in bestimmten Zelltypen beide PKG-Isoformen exprimiert werden. In der Publikation von Matei A-E. et al. konnten beide Enzyme mittels Immunocytochemie in dermalen Fibroblasten nachgewiesen werden (276). Des Weiteren konnte auch in den reninproduzierenden Zellen des JGA sowohl die PKGI $\alpha$  als auch die PKGII nachgewiesen werden (68, 232).

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit überprüft, ob neben der bereits bekannten PKGI auch die PKGII in Mesangialzellen exprimiert wird, um zu untersuchen, ob die PKGII an der Regulation der TSP1-Expression beteiligt sein könnte. Bisher finden sich dazu keine Daten in der Literatur, was vor allem dem Mangel an spezifischen PKGII-Antikörpern für die Immunhistologie in der Niere geschuldet ist.

Mit Hilfe eines lehrstuhlintern hergestellten PKGII-Antikörpers (277), ist es dennoch gelungen zumindest mittels Western Blot das PKGII-Protein in den Mesangialzellen nachzuweisen. Auch auf mRNA-Ebene konnte mit spezifischen PCR-Primern eine PKGII-Expression detektiert werden. Um sicherzustellen, dass es sich um spezifische PKGII-Banden handelte wurden gleichzeitig MCs aus PKGII-KO-Mäusen analysiert (Abbildung 3-17).

Daraufhin wurde zunächst untersucht, ob sich die PKGII-Expression in WT- oder PKGI-KO-Mesangialzellen durch die hyperglykämischen Bedingungen verändert. In Tabelle 4-1 wurden die Regulation der PKGI und PKGII im Vergleich zu den NG-Kontrollzellen unter den verschiedenen Zellkulturbedingungen zusammengefasst. Während die PKGI-Level unter den erhöhten Glukosekonzentrationen, sowohl in WT- also PKGII-KO-Zellen unverändert blieben, konnte eine Zunahme von PKGII-Protein in WT- aber nicht in PKGI-KO-Zellen festgestellt werden. Allerdings zeigte sich beim Vergleich der PKGII-Proteinlevel in WT- und PKGI-KO-Zellen in NG-Medium eine signifikant erhöhte Expression in den PKGI-KO-Zellen, um vermutlich dem Fehlen der PKGI kompensatorisch entgegenzuwirken (Abbildung 3-18). Eine weitere Zunahme der PKGII durch Glukose war deshalb limitiert. Die zusätzliche Stimulation der Zellen mit 8-Br-cGMP führte zu einer deutlichen Verringerung der PKGI-Expression in WT-Zellen. Dieser Rückgang konnte tendenziell auch in den

**Tabelle 4-1: Regulation der PKGI und II in WT- und KO-MCs im Vergleich zu NG-Zellen.**

Stimulus	Wildtyp-MCs	PKGI-KO-MCs	PKGII-KO-MCs
Glukose	PKGI → PKGII ↑	PKGII →	PKGI →
Glukose + 8-Br-cGMP	PKGI ↓ PKGII →	PKGII ↓	PKGI ↓

PKGII-KO-Zellen beobachtet werden. Die PKGII-Proteinlevel in den WT-MCs wurden durch 8-Br-cGMP im Vergleich zu der Expression unter HG-Bedingungen normalisiert. Erst in den PKGI-KO-Zellen konnte durch das 8-Br-cGMP eine ähnliche starke Reduktion der PKGII beobachtet werden wie bei der PKGI. Es scheint so, dass das exogen zugeführte 8-Br-cGMP in WT-Zellen vor allem die PKGI beeinflusst. Wenn jedoch die PKGI fehlt, dann können auch regulatorische Effekte auf die PKGII festgestellt werden.

Mit diesen Versuchen konnte demnach gezeigt werden, dass PKGI und PKGII unterschiedlich reguliert werden, dass sie sich aber auch kompensatorisch ausgleichen können. In dieser Arbeit wurden diese Expressionsunterschiede erstmals untersucht, in der Literatur finden sich dazu keine weiteren Erkenntnisse.

Die Proteinlevel der sGC $\beta_1$  unterscheiden sich in den PKGII-KO-MCs nicht von denen in den WT-Zellen. Die Phosphorylierung der VASP scheint in den PKGII-KO-Zellen jedoch etwas stärker ausgeprägt zu sein, vermutlich weil zur Phosphorylierung dieses Substrats nur noch die PKGI vorliegt. Während in WT-Zellen die Phosphorylierung durch die Stimulation mit 8-Br-cGMP im Vergleich zu den Kontrollzellen durchschnittlich um das 5,4-fache erhöht war, konnte in PKGII-KO-Zellen eine Zunahme um das 8,3-fache beobachtet werden. Das TSP1-Expressionsmuster blieb auch in den PKGII-KO-Zellen unverändert. Die Behandlung mit 8-Br-cGMP oder Cinaciguat verringerte effektiv die durch die Glukose erhöhte TSP1-Expression, was gegen eine alleinige Beteiligung der PKGII spricht.

Wie bereits festgestellt, könnte es sein, dass sich beide PKG-Isoformen gegenseitig kompensieren können. Die TSP1-Expression würde demnach von beiden PKGs reguliert werden. Diese Hypothese könnte nur bewiesen werden, indem Versuche mit PKGI/PKGII-Doppel-KO-Zellen durchgeführt werden. Allerdings sind Mäuse mit einem globalen Knockout beider PKGs nicht überlebensfähig. Deshalb wurden in der Arbeit von Matei A-E. et al. konditionale PKGI/PKGII-Doppel-KO-Mäuse generiert, bei denen keine PKGs mehr in Fibroblasten exprimiert werden. Mit diesem Modell konnte nachgewiesen werden, dass die antifibrotische Wirkung des sGC-Stimulators BAY 41-2272 in der systemischen Sklerose von beiden PKGs vermittelt wurde (276). Allerdings wurden keine Ergebnisse mit den jeweiligen Einzel-KO-Mäusen veröffentlicht.

#### 4.4 Fazit und Ausblick

Die Therapie der diabetischen Mäuse mit dem sGC-Aktivator Cinaciguat in der vorliegenden Arbeit zeigte vielversprechende, protektive Effekte auf die Niere. Auch wenn Cinaciguat selbst, aufgrund des Nebenwirkungsprofils, als Wirkstoff zur Behandlung der humanen diabetischen Nephropathie nicht geeignet ist, konnte dennoch gezeigt werden, dass die pharmakologische Aktivierung der sGC, einen vielversprechenden Therapieansatz darstellt. Auch in anderen prä-klinischen Studien konnten mit sGC-Aktivatoren eine gute Wirksamkeit in unterschiedlichen Erkrankungen erzielt werden (Kapitel 1.4.3). Aus diesem Grund wurden die sGC-Aktivatoren mit Hilfe von Hochdurchsatzscreenings weiter optimiert, um die Verträglichkeit dieser Wirkstoffklasse zu verbessern. Dabei ist es nun gelungen den neuen sGC-Aktivator Runcaciguat (BAY 1101042) zu entwickeln, der sich aktuell in klinischen Phase 2-Studien zur Testung in Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (NCT04507061) und diabetischer Retinopathie (NCT04722991) befindet (278). Es bleibt abzuwarten, ob sich dieser Wirkstoff in der Praxis bewähren kann.

Neben den etablierten Laborparametern zur Untersuchung der Nierenfunktion wurde auch die Expression verschiedener Signalproteine analysiert, die mit der NO/sGC/cGMP-Signalkaskade assoziiert werden. Beispielsweise wurde hier die PDE9a erstmals in der diabetischen Niere untersucht, wobei eine deutliche Reduktion der Proteinexpression im Vergleich zu gesunden Mäusen festgestellt werden konnte. In der DN scheint die PDE9 demnach eher keine treibende Kraft bei der Krankheitsprogression darzustellen. Dennoch werden PDE9-Inhibitoren als mögliche neue Antidiabetika vor allem bei Typ-2-Diabetes diskutiert (279). Wie wirksam diese tatsächlich sind muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit postuliert, dass neben der PKGI auch die PKGII in Mesangialzellen exprimiert wird. In Ermangelung eines spezifischen PKGII-Antikörpers für die Immunhistochemie, wurde die PKGII-Expression in isolierten MCs mittels Western Blot und PCR nachgewiesen. Um das Vorhandensein der PKGII in MCs sicher zu beweisen, sind allerdings weitergehende Analysen notwendig.

Auch um die Hypothese der gemeinsamen Regulation der TSP1 durch beide PKG-Isoformen zu bestätigen, bedarf es weiterer Forschungsarbeit. Da PKGI-/ PKGII-Doppel-KO-Tiere nicht überlebensfähig sind, könnten entsprechende Zellkulturmodelle mittels spezifischer siRNAs oder der CRISPR/Cas9-Technologie generiert werden.

Zum Thema diabetische Nephropathie wurde und wird weltweit sehr viel geforscht, dennoch sind noch viele Fragen zu den grundlegenden Entstehungsmechanismen und möglichen Therapieoptionen nicht geklärt. Mit dieser Arbeit konnten neue Einblicke in die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen gewonnen werden, die vielleicht einen kleinen Teil dazu beitragen, die diabetische Nierenerkrankung besser zu verstehen.

---

## 5 Literaturverzeichnis

1. Harloff M, Prüschenk S, Seifert R, Schlossmann J (2021) Activation of soluble guanylyl cyclase signalling with cinaciguat improves impaired kidney function in diabetic mice. *British journal of pharmacology* 1–16.
2. Müller-Wieland D (2019) Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie* 15:128–134.
3. World Health Organization (2019) Classification of Diabetes Mellitus. Onlineversion: <https://www.who.int/publications/i/item/classification-of-diabetes-mellitus>. Abgerufen am: 25.08.2020.
4. American Diabetes Association (ADA) (2017) 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes care* 40:S11–S24.
5. International Diabetes Federation (2019) IDF Diabetes Atlas 9<sup>th</sup> Edition 2019. Onlineversion des IDF Diabetes Atlas: [www.diabetesatlas.org](http://www.diabetesatlas.org). Abgerufen am: 27.08.2020.
6. Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) und diabetesDE - Deutsche Diabetes-Hilfe (2020) Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2021 – Die Bestandsaufnahme. Verlag Kirchheim + Co, Mainz, S. 9–22.
7. Nauck M *et al.* (2020) Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus: Update 2020. *Diabetologie und Stoffwechsel* 15:S9–S17.
8. World Health Organization (2016) *Global report on diabetes*. WHO Press, World Health Organization, Geneva.
9. Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) (2018) S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes, 2. Auflage. Verfügbar unter: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/057-013.html> Abgerufen am: 30.08.2020.
10. Forbes JM, Cooper ME (2013) Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews* 93:137–188.
11. Chawla A, Chawla R, Jaggi S (2016) Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian journal of endocrinology and metabolism* 20:546–551.
12. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR (2017) Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clinical journal of the American Society of Nephrology* 12:2032–2045.
13. Lang F, Kurtz A (2007) Niere. In: Schmidt RF, Lang F (Hrsg.) *Physiologie des Menschen*. 30. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, S. 683–719.
14. Schweda F, Segerer K, Wanner C (2014) Anatomie und Physiologie der Niere. In: Steffel J, Lüscher T (Hrsg.) *Niere und Ableitende Harnwege*, Springer, Berlin, Heidelberg, S. 3–14.
15. Bolina CDS *et al.* (2013) Three-dimensional aspects of the structural characteristics and kidney angioarchitecture of adult and aged Wistar rats: a scanning electron microscopy study. *Microscopy research and technique* 76:538–544.
16. Field M, Pollock C, Harris D (2017) *Organsysteme Verstehen – Niere*. Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG, Philadelphia.
17. Colhoun HM, Marcovecchio ML (2018) Biomarkers of diabetic kidney disease. *Diabetologia* 61:996–1011.
18. Nguyen TQ, Goldschmeding R (2019) The Mesangial Cell in Diabetic Nephropathy. In: Roelofs J, Vogt L (Hrsg.) *Diabetic Nephropathy*. Springer, Cham, S. 143–151.

19. Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) und diabetesDE - Deutsche Diabetes-Hilfe (2018) Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2018 – Die Bestandsaufnahme. Verlag Kirchheim + Co, Mainz, S. 110–114.
20. Rossing P, Frimodt-Møller M (2019) Clinical Features and Natural Course of Diabetic Nephropathy. In: Roelofs JJ, Vogt L (Hrsg.) *Diabetic Nephropathy*. Springer, Cham, S.21–32.
21. Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E (1983) The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 32:64–78.
22. Papadopoulou-Marketou N, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C (2017) Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: a review of early natural history, pathogenesis, and diagnosis. *Diabetes/metabolism research and reviews* 33.
23. Tervaert TWC *et al.* (2010) Pathologic classification of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 21:556–563.
24. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group (1998) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *The Lancet* 352:837–853.
25. The Diabetes Control and Complications Research Group (1995) Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Kidney international* 47:1703–1720.
26. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale Versorgungs-Leitlinie Typ-2-Diabetes – Leitlinienreport, 2. Auflage. Version 1. 2021. Verfügbar unter: <http://www.leitlinien.de/diabetes> Abgerufen am: 09.05.2021.
27. Wanner C *et al.* (2016) Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine* 375:323–334.
28. Monami M, Nardini C, Mannucci E (2014) Efficacy and safety of sodium glucose co-transport-2 inhibitors in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes, obesity & metabolism* 16:457–466.
29. Brenner BM *et al.* (2001) Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *The New England journal of medicine* 345:861–869.
30. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD (1993) The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *The New England journal of medicine* 329:1456–1462.
31. Lewis EJ *et al.* (2001) Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *The New England journal of medicine* 345:851–860.
32. Parving HH *et al.* (2001) The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *The New England journal of medicine* 345:870–878.
33. Kettner C, Mann J (2017) Prophylaxe und Therapie der diabetischen Nephropathie. *Nephrologe* 12:407–413.
34. Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal* 33:829–837.
35. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74:3203–3207.
36. Waldman SA, Murad F (1987) Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacological reviews* 39:163–196.



37. Kuhn M (2016) Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors. *Physiological reviews* 96:751–804.
38. Biel M (2009) Cyclic nucleotide-regulated cation channels. *The Journal of biological chemistry* 284:9017–9021.
39. Conti M, Beavo J (2007) Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annual review of biochemistry* 76:481–511.
40. Baillie GS, Tejada GS, Kelly MP (2019) Therapeutic targeting of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases: inhibition and beyond. *Nature reviews. Drug discovery* 18:770–796.
41. Zaccolo M, Movsesian MA (2007) cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circulation research* 100:1569–1578.
42. Mullershausen F *et al.* (2003) Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. *The Journal of cell biology* 160:719–727.
43. Goldstein I *et al.* (1998) Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group. *The New England journal of medicine* 338.
44. Richalet J-P *et al.* (2005) Sildenafil inhibits altitude-induced hypoxemia and pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 171:275–281.
45. Frajese GV, Pozzi F, Frajese G (20) Tadalafil in the treatment of erectile dysfunction; an overview of the clinical evidence. *Clinical Interventions in Aging* 1:439–449.
46. Galiè N *et al.* (2009) Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 119:2894–2903.
47. Chong LYZ, Satya K, Kim B, Berkowitz R (2018) Milrinone Dosing and a Culture of Caution in Clinical Practice. *Cardiology in review* 26:35–42.
48. Liu JK, Couldwell WT (2005) Intra-Arterial Papaverine Infusions for the Treatment of Cerebral Vasospasm Induced by Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *NCC* 2:124–132.
49. Pfeifer A *et al.* (1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 135:105–149.
50. Wernet W, Flockerzi V, Hofmann F (1989) The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Letters* 251:191–196.
51. Vaandrager AB, Ehlert EM, Jarchau T, Lohmann SM, Jonge HR de (1996) N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II. *The Journal of biological chemistry* 271:7025–7029.
52. Hofmann F, Bernhard D, Lukowski R, Weinmeister P (2009) cGMP regulated protein kinases (cGK). In: Schmidt HHHW, Hofmann F, Stasch JP (Hrsg.) *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications. Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg, S. 137–162.
53. Butt E *et al.* (1994) cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *The Journal of biological chemistry* 269:14509–14517.
54. Hauser W *et al.* (1999) Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:8120–8125.
55. Wooldridge AA *et al.* (2004) Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *The Journal of biological chemistry* 279:34496–34504.

56. Schlossmann J, Desch M (2011) IRAG and novel PKG targeting in the cardiovascular system. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 301:H672-82.
57. Antl M *et al.* (2007) IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Blood* 109:552–559.
58. Chikuda H *et al.* (2004) Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. *Genes & development* 18:2418–2429.
59. Warner TD, Mitchell JA, Sheng H, Murad F (1994) Effects of cyclic GMP on smooth muscle relaxation. *Advances in pharmacology* 26:171–194.
60. Buechler WA *et al.* (1994) Soluble guanylyl cyclase and platelet function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 714:151–157.
61. Jaffrey SR, Snyder SH (1995) Nitric oxide: a neural messenger. *Annual review of cell and developmental biology* 11:417–440.
62. Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420:846–852.
63. Baylis C, Qiu C (1996) Importance of nitric oxide in the control of renal hemodynamics. *Kidney international* 49:1727–1731.
64. Patzak A *et al.* (2004) Nitric oxide counteracts angiotensin II induced contraction in efferent arterioles in mice. *Acta physiologica Scandinavica* 181:439–444.
65. Sandner P, Kornfeld M, Ruan X, Arendshorst WJ, Kurtz A (1999) Nitric oxide/cAMP interactions in the control of rat renal vascular resistance. *Circulation research* 84:186–192.
66. Kurtz A, Götz KH, Hamann M, Wagner C (1998) Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:4743–4747.
67. Beierwaltes WH (2006) cGMP stimulates renin secretion in vivo by inhibiting phosphodiesterase-3. *American journal of physiology. Renal physiology* 290:1376–1381.
68. Wagner C, Pfeifer A, Ruth P, Hofmann F, Kurtz A (1998) Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *The Journal of clinical investigation* 102:1576–1582.
69. Schramm A *et al.* (2019) Protein Kinase G Is Involved in Acute but Not in Long-Term Regulation of Renin Secretion. *Frontiers in pharmacology* 10:800.
70. Wilcox CS *et al.* (1992) Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:11993–11997.
71. Ren YL, Garvin JL, Carretero OA (2000) Role of macula densa nitric oxide and cGMP in the regulation of tubuloglomerular feedback. *Kidney international* 58:2053–2060.
72. Ren Y, D'Ambrosio MA, Garvin JL, Wang H, Carretero OA (2013) Mechanism of inhibition of tubuloglomerular feedback by CO and cGMP. *Hypertension* 62:99–104.
73. Satoh N *et al.* (2017) Effects of Nitric Oxide on Renal Proximal Tubular Na<sup>+</sup> Transport. *BioMed research international* 2017:6871081.
74. Kamisaki Y *et al.* (1986) Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *Journal of Biological Chemistry* 261:7236–7241.
75. Buechler WA, Nakane M, Murad F (1991) Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochemical and biophysical research communications* 174:351–357.
76. Montfort WR, Wales JA, Weichsel A (2017) Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor. *Antioxidants & redox signaling* 26:107–121.

77. Kang Y, Liu R, Wu J-X, Chen L (2019) Structural insights into the mechanism of human soluble guanylate cyclase. *Nature* 574:206–210.
78. Wolin MS, Wood KS, Ignarro LJ (1982) Guanylate cyclase from bovine lung. A kinetic analysis of the regulation of the purified soluble enzyme by protoporphyrin IX, heme, and nitrosyl-heme. *The Journal of biological chemistry* 257:13312–13320.
79. Wedel B *et al.* (1994) Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:2592–2596.
80. Horst BG, Marletta MA (2018) Physiological activation and deactivation of soluble guanylate cyclase. *Nitric oxide: biology and chemistry* 77:65–74.
81. Craven PA, DeRubertis FR (1978) Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *Journal of Biological Chemistry* 253:8433–8443.
82. Brüne B, Schmidt KU, Ullrich V (1990) Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *European journal of biochemistry* 192:683–688.
83. Boon EM, Huang SH, Marletta MA (2005) A molecular basis for NO selectivity in soluble guanylate cyclase. *Nature chemical biology* 1:53–59.
84. Stasch J-P *et al.* (2006) Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *The Journal of clinical investigation* 116:2552–2561.
85. Pan J *et al.* (2016) The molecular mechanism of heme loss from oxidized soluble guanylate cyclase induced by conformational change. *Biochimica et biophysica acta* 1864:488–500.
86. Hoffmann LS *et al.* (2009) Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *British journal of pharmacology* 157:781–795.
87. Divakaran S, Loscalzo J (2017) The Role of Nitroglycerin and Other Nitrogen Oxides in Cardiovascular Therapeutics. *Journal of the American College of Cardiology* 70:2393–2410.
88. Parker JO (1990) Nitrate tolerance. A problem during continuous nitrate administration. *European journal of clinical pharmacology* 38 Suppl 1:S21–25.
89. Sandner P *et al.* (2019) Soluble Guanylate Cyclase Stimulators and Activators. In: Schmidt HHHW, Ghezzi P, Cuadrado A (Hrsg.) *Reactive Oxygen Species. Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Cham, S. 355–394.
90. Ko FN, Wu CC, Kuo SC, Lee FY, Teng CM (1994) YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* 84:4226–4233.
91. Mülsch A *et al.* (1997) Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *British journal of pharmacology* 120:681–689.
92. Conole D, Scott LJ (2013) Riociguat: first global approval. *Drugs* 73:1967–1975.
93. Sandner P (2018) From molecules to patients: exploring the therapeutic role of soluble guanylate cyclase stimulators. *Biological chemistry* 399:679–690.
94. Stasch J-P, Hobbs AJ (2009) NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. In: Schmidt HHHW Hofmann F, Stasch JP (Hrsg.) *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications. Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg, S. 277–308.
95. Martin F *et al.* (2010) Structure of cinaciguat (BAY 58-2667) bound to Nostoc H-NOX domain reveals insights into heme-mimetic activation of the soluble guanylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry* 285:22651–22657.

96. Surmeli NB, Marletta MA (2012) Insight into the rescue of oxidized soluble guanylate cyclase by the activator cinaciguat. *Chembiochem: a European journal of chemical biology* 13:977–981.
97. Ghosh A, Stasch J-P, Papapetropoulos A, Stuehr DJ (2014) Nitric oxide and heat shock protein 90 activate soluble guanylate cyclase by driving rapid change in its subunit interactions and heme content. *The Journal of biological chemistry* 289:15259–15271.
98. Ghofrani H-A *et al.* (2013) Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 369:319–329.
99. Ghofrani H-A *et al.* (2013) Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 369:330–340.
100. Armstrong PW *et al.* (2020) Vericiguat in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *The New England journal of medicine* 382:1883–1893.
101. Stasch J-P, Schlossmann J, Hocher B (2015) Renal effects of soluble guanylate cyclase stimulators and activators: a review of the preclinical evidence. *Current opinion in pharmacology* 21:95–104.
102. Krishnan SM, Kraehling JR, Eitner F, Bénardeau A, Sandner P (2018) The Impact of the Nitric Oxide (NO)/Soluble Guanylyl Cyclase (sGC) Signaling Cascade on Kidney Health and Disease: A Preclinical Perspective. *International journal of molecular sciences* 19:1712.
103. Hanrahan JP *et al.* (2020) Effects of the Soluble Guanylate Cyclase Stimulator Praliciguat in Diabetic Kidney Disease: A Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial. *Clinical journal of the American Society of Nephrology* 16:59–69.
104. Schwabl P *et al.* (2018) The soluble guanylate cyclase stimulator riociguat reduces fibrogenesis and portal pressure in cirrhotic rats. *Scientific reports* 8:9372.
105. Krishnan SM *et al.* (2021) Assessing the Use of the sGC Stimulator BAY-747, as a Potential Treatment for Duchenne Muscular Dystrophy. *International journal of molecular sciences* 22:8016.
106. Zimmer DP, Silva IA, Chien Y-T, Milne GT, Currie M (2017) The Soluble Guanylate Cyclase Stimulator IW-1701 Enhances Nitric Oxide-Mediated Relaxation of Human Lower Esophageal Sphincter ex vivo. *Gastroenterology* 152:S699.
107. Prasanna G *et al.* (2018) A Novel Selective Soluble Guanylate Cyclase Activator, MG354, Lowers Intraocular Pressure in Preclinical Models, Following Topical Ocular Dosing. *Investigative ophthalmology & visual science* 59:1704–1716.
108. Conran N, Torres L (2019) cGMP modulation therapeutics for sickle cell disease. *Experimental biology and medicine* 244:132–146.
109. Erdmann E *et al.* (2013) Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, unloads the heart but also causes hypotension in acute decompensated heart failure. *European heart journal* 34:57–67.
110. Gheorghide M *et al.* (2012) Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator: results from the randomized, controlled, phase IIb COMPOSE programme in acute heart failure syndromes. *European journal of heart failure* 14:1056–1066.
111. Sandner P, Vakalopoulos A, Hahn MG, Stasch J-P, Follmann M (2021) Soluble guanylate cyclase stimulators and their potential use: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* 31:203–222.
112. Brosius FC *et al.* (2009) Mouse models of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 20:2503–2512.
113. Furman BL (2015) Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current protocols in pharmacology* 70:5.47.1-20.

114. Schmezer P, Eckert C, Liegibel UM (1994) Tissue-specific induction of mutations by streptozotocin in vivo. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 307:495–499.
115. Leiter EH, Prochazka M, Coleman DL (1987) The non-obese diabetic (NOD) mouse. *The American Journal of Pathology* 128:380–383.
116. Baribault H (2016) Mouse Models of Type 2 Diabetes Mellitus in Drug Discovery. *Methods in molecular biology* 1438:153–175.
117. Zhao HJ *et al.* (2006) Endothelial nitric oxide synthase deficiency produces accelerated nephropathy in diabetic mice. *Journal of the American Society of Nephrology* 17:2664–2669.
118. Nakagawa T *et al.* (2007) Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 18:539–550.
119. Kanetsuna Y *et al.* (2007) Deficiency of endothelial nitric-oxide synthase confers susceptibility to diabetic nephropathy in nephropathy-resistant inbred mice. *The American Journal of Pathology* 170:1473–1484.
120. Thibodeau J-F *et al.* (2014) A novel mouse model of advanced diabetic kidney disease. *PLoS one* 9:e113459.
121. Hudkins KL *et al.* (2010) BTBR Ob/Ob mutant mice model progressive diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 21:1533–1542.
122. Azushima K, Gurley SB, Coffman TM (2018) Modelling diabetic nephropathy in mice. *Nature reviews. Nephrology* 14:48–56.
123. Freedman BI, Bostrom M, Daeihagh P, Bowden DW (2007) Genetic factors in diabetic nephropathy. *Clinical journal of the American Society of Nephrology* 2:1306–1316.
124. Betz B, Conway BR (2016) An Update on the Use of Animal Models in Diabetic Nephropathy Research. *Current diabetes reports* 16:18.
125. Christina Seddig (2020) *Tag der Organspende am 6. Juni: Diabetes-Früherkennung kann Nierenschäden und möglicherweise Transplantationen vermeiden.* Pressemitteilung am 04.06.2020. Verfügbar unter: <https://idw-online.de/de/news748866>. Abgerufen am: 16.05.2021.
126. Krishnan SM, Kraehling JR, Eitner F, Bénardeau A, Sandner P (2018) The Impact of the Nitric Oxide (NO)/Soluble Guanylyl Cyclase (sGC) Signaling Cascade on Kidney Health and Disease: A Preclinical Perspective. *International journal of molecular sciences* 19.
127. Alexander Pfeifer *et al.* (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *The EMBO Journal* 17:3045–3051.
128. Pfeifer A *et al.* (1996) Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science* 274:2082–2086.
129. Shesely EG *et al.* (1996) Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:13176–13181.
130. Gurley SB *et al.* (2006) Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. *American journal of physiology. Renal physiology* 290:F214–22.
131. Macherey-Nagel Medi-Test Harnanalytik.
132. Dunn SR, Qi Z, Bottinger EP, Breyer MD, Sharma K (2004) Utility of endogenous creatinine clearance as a measure of renal function in mice. *Kidney international* 65:1959–1967.
133. Fountain KJ *et al.* (2007) Analysis of creatinine in mouse and rat serum by ion exchange high performance liquid chromatography for in vivo studies of renal function. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 846:245–251.
134. Yuen PST *et al.* (2004) A simplified method for HPLC determination of creatinine in mouse serum. *American journal of physiology. Renal physiology* 286:F1116–9.

- 
135. Bähre H, Kaefer V (2017) Mass Spectrometric Analysis of Non-canonical Cyclic Nucleotides. *Handbook of experimental pharmacology* 238:293–306.
  136. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal* 11:447–455.
  137. Schindelin J *et al.* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9:676–682.
  138. Takemoto M *et al.* (2002) A New Method for Large Scale Isolation of Kidney Glomeruli from Mice. *The American Journal of Pathology* 161:799–805.
  139. Wilson HM, Stewart KN (2012) Glomerular epithelial and mesangial cell culture and characterization. *Methods in molecular biology* 806:187–201.
  140. Berglund ED *et al.* (2008) Glucose metabolism in vivo in four commonly used inbred mouse strains. *Diabetes* 57:1790–1799.
  141. Chomczynski P, Sacchi N (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols* 1:581–585.
  142. Ponchel F *et al.* (2003) Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC biotechnology* 3:18.
  143. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* 3:1101–1108.
  144. Fleige S *et al.* (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnology letters* 28:1601–1613.
  145. Smith BJ (1984) SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1:41–55.
  146. Ladner CL, Yang J, Turner RJ, Edwards RA (2004) Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Analytical biochemistry* 326:13–20.
  147. Kyhse-Andersen J (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 10:203–209.
  148. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A (2007) G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior research methods* 39:175–191.
  149. Tonneijck L *et al.* (2017) Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment. *Journal of the American Society of Nephrology* 28:1023–1039.
  150. Habib SL (2018) Kidney atrophy vs hypertrophy in diabetes: which cells are involved? *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 17:1683–1687.
  151. Stasch J-P *et al.* (2002) NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *British journal of pharmacology* 136:773–783.
  152. Wynn TA (2007) Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation* 117:524–529.
  153. Strutz F, Zeisberg M (2006) Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 17:2992–2998.

154. Saratlija Novakovic Z *et al.* (2012) The interstitial expression of alpha-smooth muscle actin in glomerulonephritis is associated with renal function. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 18:CR235-40.
155. Bülow RD, Boor P (2019) Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold. *The journal of histochemistry and cytochemistry* 67:643–661.
156. Adler SG *et al.* (2000) Glomerular type IV collagen in patients with diabetic nephropathy with and without additional glomerular disease. *Kidney international* 57:2084–2092.
157. Welsh GI, Coward RJ (2019) The Podocyte in Diabetic Nephropathy: Recent Advances. In: Roelofs JJ, Vogt L (Hrsg.) *Diabetic Nephropathy*. Springer, Cham, S. 171–182.
158. Kravets I, Mallipattu SK (2020) The Role of Podocytes and Podocyte-Associated Biomarkers in Diagnosis and Treatment of Diabetic Kidney Disease. *Journal of the Endocrine Society* 4:bvaa029.
159. Bieritz B *et al.* (2003) Role of alpha8 integrin in mesangial cell adhesion, migration, and proliferation. *Kidney international* 64:119–127.
160. Costa PZ, Soares R (2013) Neovascularization in diabetes and its complications. Unraveling the angiogenic paradox. *Life sciences* 92:1037–1045.
161. Horowitz JC, Thannickal VJ (2019) Mechanisms for the Resolution of Organ Fibrosis. *Physiology (Bethesda, Md.)* 34:43–55.
162. Hugo C, Daniel C (2009) Thrombospondin in renal disease. *Nephron. Experimental nephrology* 111:e61-6.
163. Murphy-Ullrich JE, Suto MJ (2018) Thrombospondin-1 regulation of latent TGF- $\beta$  activation: A therapeutic target for fibrotic disease. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* 68-69:28–43.
164. Like AA, Rossini AA (1976) Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science (New York, N.Y.)* 193:415–417.
165. Kolb-Bachofen V, Epstein S, Kiesel U, Kolb H (1988) Low-dose streptozocin-induced diabetes in mice. Electron microscopy reveals single-cell insulinitis before diabetes onset. *Diabetes* 37:21–27.
166. Weide LG, Lacy PE (1991) Low-dose streptozocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model. *Diabetes* 40:1157–1162.
167. Hall-Craggs M, Brenner DE, Vigorito RD, Sutherland JC (1982) Acute renal failure and renal tubular squamous metaplasia following treatment with streptozotocin. *Human Pathology* 13:597–601.
168. Tay Y-C *et al.* (2005) Can murine diabetic nephropathy be separated from superimposed acute renal failure? *Kidney international* 68:391–398.
169. Kellum JA *et al.* (2015) Classifying AKI by Urine Output versus Serum Creatinine Level. *Journal of the American Society of Nephrology* 26:2231–2238.
170. Moore PK, Hsu RK, Liu KD (2018) Management of Acute Kidney Injury: Core Curriculum 2018. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 72:136–148.
171. Ronco C, Bellomo R, Kellum JA (2019) Acute kidney injury. *The Lancet* 394:1949–1964.
172. Petrie JR, Guzik TJ, Touyz RM (2018) Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *The Canadian journal of cardiology* 34:575–584.
173. Katsimardou A *et al.* (2020) Treatment strategies for hypertension in patients with type 1 diabetes. *Expert opinion on pharmacotherapy* 21:1241–1252.

- 
174. Laffin LJ, Bakris GL (2015) Update on blood pressure goals in diabetes mellitus. *Current cardiology reports* 17:37.
175. Huang PL *et al.* (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377:239–242.
176. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale Versorgungs-Leitlinie - Nierenerkrankungen bei Diabetes im Erwachsenenalter – Langfassung, 1. Auflage. Version 6. 2010, zuletzt verändert: September 2015.  
Verfügbar unter: <http://www.dm-nierenerkrankungen.versorgungsleitlinien.de/> Abgerufen am: 22.06.2021.
177. Levey AS, Perrone RD, Madias NE (1988) Serum creatinine and renal function. *Annual review of medicine* 39:465–490.
178. Smith SA (1988) Estimation of glomerular filtration rate from the serum creatinine concentration. *Postgraduate medical journal* 64:204–208.
179. Wasung ME, Chawla LS, Madero M (2015) Biomarkers of renal function, which and when? *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 438:350–357.
180. Eisner C *et al.* (2010) Major contribution of tubular secretion to creatinine clearance in mice. *Kidney international* 77:519–526.
181. Liu W-S *et al.* (2012) Serum creatinine determined by Jaffe, enzymatic method, and isotope dilution-liquid chromatography-mass spectrometry in patients under hemodialysis. *Journal of clinical laboratory analysis* 26:206–214.
182. Cheuiche AV *et al.* (2013) Comparison between IDMS-traceable Jaffe and enzymatic creatinine assays for estimation of glomerular filtration rate by the CKD-EPI equation in healthy and diabetic subjects. *Clinical biochemistry* 46:1423–1429.
183. Jerums G, Premaratne E, Panagiotopoulos S, MacIsaac RJ (2010) The clinical significance of hyperfiltration in diabetes. *Diabetologia* 53:2093–2104.
184. Vallon V, Komers R (2011) Pathophysiology of the diabetic kidney. *Comprehensive Physiology* 1:1175–1232.
185. Vallon V, Thomson SC (2020) The tubular hypothesis of nephron filtration and diabetic kidney disease. *Nature reviews. Nephrology* 16:317–336.
186. Chagnac A, Zingerman B, Rozen-Zvi B, Herman-Edelstein M (2019) Consequences of Glomerular Hyperfiltration: The Role of Physical Forces in the Pathogenesis of Chronic Kidney Disease in Diabetes and Obesity. *Nephron* 143:38–42.
187. Mogensen CE, Andersen MJ (1975) Increased kidney size and glomerular filtration rate in untreated juvenile diabetes: normalization by insulin-treatment. *Diabetologia* 11:221–224.
188. Jones SC, Saunders HJ, Pollock CA (1999) High glucose increases growth and collagen synthesis in cultured human tubulointerstitial cells. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association* 16:932–938.
189. Ziyadeh FN *et al.* (1990) High glucose induces cell hypertrophy and stimulates collagen gene transcription in proximal tubule. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 259:F704–F714.
190. Wang X *et al.* (2014) Age, kidney function, and risk factors associate differently with cortical and medullary volumes of the kidney. *Kidney international* 85:677–685.
191. van der Sande NGC *et al.* (2017) Relation between Kidney Length and Cardiovascular and Renal Risk in High-Risk Patients. *Clinical journal of the American Society of Nephrology* 12:921–928.
192. Brenner BM (1985) Nephron adaptation to renal injury or ablation. *The American journal of physiology* 249.



- 
193. Czirok S *et al.* (2017) Cinaciguat ameliorates glomerular damage by reducing ERK1/2 activity and TGF- $\beta$  expression in type-1 diabetic rats. *Scientific reports* 7:11218.
  194. Gangadharan Komala M *et al.* (2014) Inhibition of kidney proximal tubular glucose reabsorption does not prevent against diabetic nephropathy in type 1 diabetic eNOS knockout mice. *PloS one* 9:e108994.
  195. Loeffler I, Wolf G (2019) Mechanisms of Interstitial Fibrosis in Diabetic Nephropathy. In: Roelofs JJ, Vogt L (Hrsg.) *Diabetic Nephropathy*. Springer, Cham, S. 227–251.
  196. Tang SCW, Yiu WH (2020) Innate immunity in diabetic kidney disease. *Nature reviews. Nephrology* 16:206–222.
  197. Ina K *et al.* (2002) Transformation of interstitial fibroblasts and tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *Medical electron microscopy: official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan* 35:87–95.
  198. Hohenadel D, van der Woude FJ (2004) Gene expression in diabetic nephropathy. *Current diabetes reports* 4:462–469.
  199. McLennan SV *et al.* (2002) Decreased matrix degradation in diabetic nephropathy: effects of ACE inhibition on the expression and activities of matrix metalloproteinases. *Diabetologia* 45:268–275.
  200. Rysz J *et al.* (2007) Serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and metalloproteinase tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in diabetic nephropathy. *Journal of nephrology* 20:444–452.
  201. Derosa G *et al.* (2007) Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. *Diabetes & metabolism* 33:129–134.
  202. Kim SS *et al.* (2017) Enhanced expression of two discrete isoforms of matrix metalloproteinase-2 in experimental and human diabetic nephropathy. *PloS one* 12.
  203. Takamiya Y *et al.* (2013) Experimental diabetic nephropathy is accelerated in matrix metalloproteinase-2 knockout mice. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 28:55–62.
  204. Dalla Vestra M, Saller A, Mauer M, Fioretto P (2001) Role of mesangial expansion in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Journal of nephrology* 14 Suppl 4:S51–57.
  205. Peng H *et al.* (2016) ROCK1 Induces Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Glomeruli to Aggravate Albuminuria in Diabetic Nephropathy. *Scientific reports* 6:20304.
  206. Pofi R *et al.* (2017) Phosphodiesterase-5 inhibition preserves renal hemodynamics and function in mice with diabetic kidney disease by modulating miR-22 and BMP7. *Scientific reports* 7:44584.
  207. Hinamoto N *et al.* (2014) Exacerbation of diabetic renal alterations in mice lacking vasohibin-1. *PloS one* 9:e107934.
  208. Uil M *et al.* (2020) Platelet inhibition by ticagrelor is protective against diabetic nephropathy in mice. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34:13750–13761.
  209. Silva C *et al.* (2019) Establishing a Link between Endothelial Cell Metabolism and Vascular Behaviour in a Type 1 Diabetes Mouse Model. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 52:503–516.
  210. Zent R, Pozzi A (2007) Angiogenesis in diabetic nephropathy. *Seminars in nephrology* 27:161–171.

- 
211. Toyoda M, Najafian B, Kim Y, Caramori ML, Mauer M (2007) Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration in human type 1 diabetic nephropathy. *Diabetes* 56:2155–2160.
212. Kelly DJ *et al.* (2002) Expression of the slit-diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy: differing effects of anti-proteinuric therapies. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 17:1327–1332.
213. Doublier S *et al.* (2003) Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. *Diabetes* 52:1023–1030.
214. Menne J *et al.* (2006) Nephrin loss in experimental diabetic nephropathy is prevented by deletion of protein kinase C alpha signaling in-vivo. *Kidney international* 70:1456–1462.
215. Kim J-J *et al.* (2007) Differential expression of nephrin according to glomerular size in early diabetic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 18:2303–2310.
216. Cooper ME, Mundel P, Boner G (2002) Role of nephrin in renal disease including diabetic nephropathy. *Seminars in nephrology* 22:393–398.
217. Ueda S *et al.* (2015) ENOS deficiency causes podocyte injury with mitochondrial abnormality. *Free radical biology & medicine* 87:181–192.
218. Weil EJ *et al.* (2012) Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy. *Kidney international* 82:1010–1017.
219. Nakagawa T (2013) Is endothelial dysfunction more deleterious than podocyte injury in diabetic nephropathy? *Kidney international* 83:1202–1203.
220. Rask-Madsen C, King GL (2007) Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism* 3.
221. Fu J, Lee K, Chuang PY, Liu Z, He JC (2015) Glomerular endothelial cell injury and cross talk in diabetic kidney disease. *American journal of physiology. Renal physiology* 308:F287-97.
222. Breyer MD *et al.* (2005) Mouse models of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology JASN* 16:27–45.
223. Yu L *et al.* (2012) Integrin  $\alpha$ 1/Akita double knockout mice on a Balb/c background develop advanced features of human diabetic nephropathy. *Kidney international* 81:1086–1097.
224. Eleftheriadis T, Antoniadi G, Pissas G, Liakopoulos V, Stefanidis I (2013) The renal endothelium in diabetic nephropathy. *Renal failure* 35:592–599.
225. Farkas K *et al.* (2004) Impairment of the NO/cGMP pathway in the fasting and postprandial state in type 1 diabetes mellitus. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology and German Diabetes Association* 112:258–263.
226. Khamaisi M *et al.* (2006) Role of renal nitric oxide synthase in diabetic kidney disease during the chronic phase of diabetes. *Nephron. Physiology* 102:p72-80.
227. Tessari P *et al.* (2010) Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with type 2 diabetes and nephropathy. *Diabetes* 59:2152–2159.
228. Zou M-H, Cohen R, Ullrich V (2004) Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium: journal of endothelial cell research* 11:89–97.
229. Meininger CJ *et al.* (2000) Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *The Biochemical journal* 349:353–356.

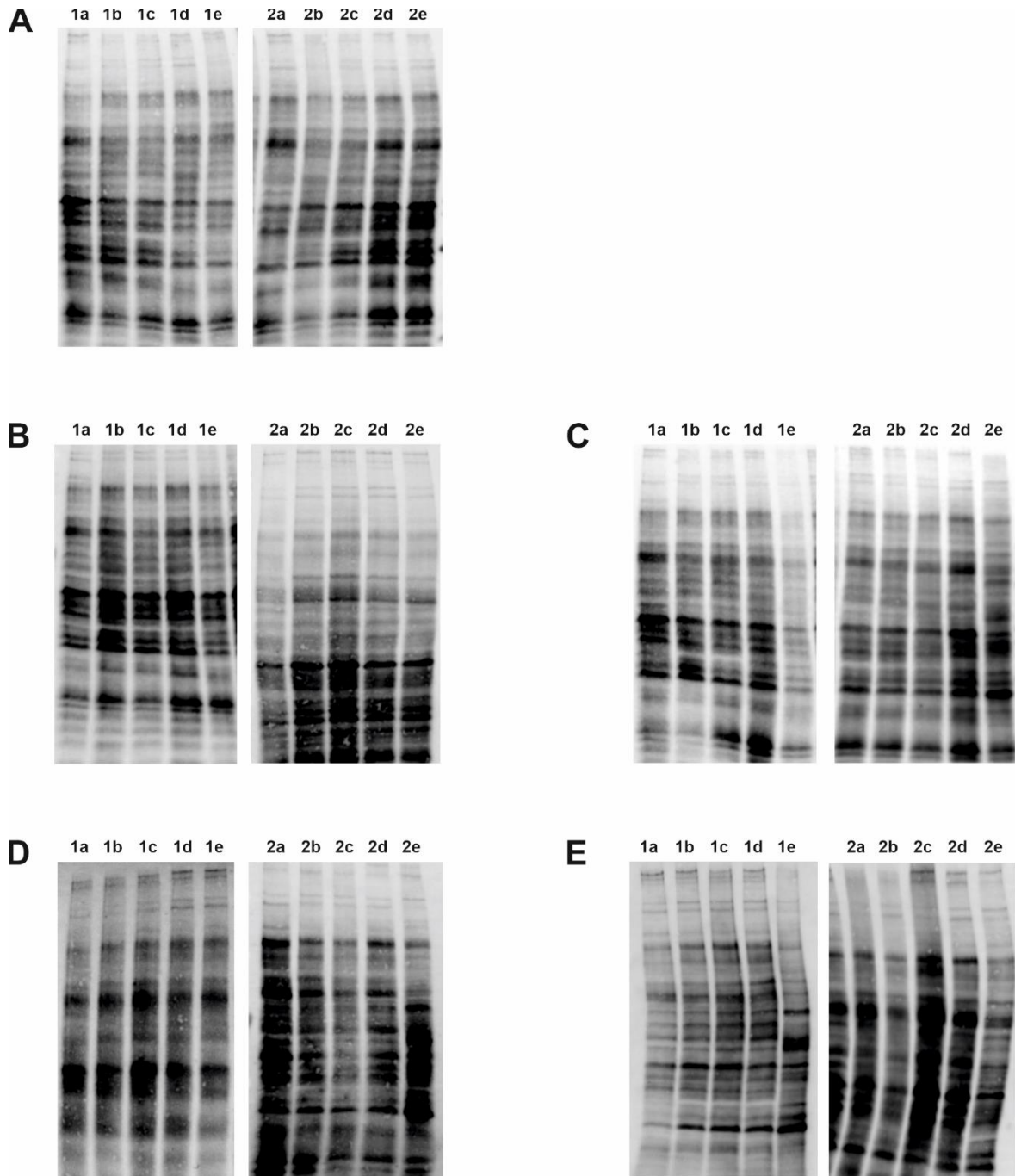
230. Prabhakar SS (2001) Tetrahydrobiopterin reverses the inhibition of nitric oxide by high glucose in cultured murine mesangial cells. *American journal of physiology. Renal physiology* 281:F179-88.
231. Dao VT-V *et al.* (2020) Non-canonical chemical feedback self-limits nitric oxide-cyclic GMP signaling in health and disease. *Scientific reports* 10:10012.
232. Schinner E, Schramm A, Kees F, Hofmann F, Schlossmann J (2013) The cyclic GMP-dependent protein kinase I $\alpha$  suppresses kidney fibrosis. *Kidney international* 84:1198–1206.
233. Obineche E *et al.* (2006) Alterations in atrial natriuretic peptide and its receptor levels in long-term, streptozotocin-induced, diabetes in rats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1084:223–234.
234. Moore KB *et al.* (2007) Atrial natriuretic peptide increases urinary albumin excretion in people with normoalbuminuric type-2 diabetes. *Irish journal of medical science* 176:67–73.
235. Malek V, Sharma N, Gaikwad AB (2019) Histone Acetylation Regulates Natriuretic Peptides and Nephrylsin Gene Expressions in Diabetic Cardiomyopathy and Nephropathy. *Current molecular pharmacology* 12:61–71.
236. Chaykovska L *et al.* (2018) Urinary cGMP predicts major adverse renal events in patients with mild renal impairment and/or diabetes mellitus before exposure to contrast medium. *PloS one* 13:e0195828.
237. Yang H, Yang L (2016) Targeting cAMP/PKA pathway for glycemic control and type 2 diabetes therapy. *Journal of molecular endocrinology* 57:R93-R108.
238. Tengholm A, Gylfe E (2017) cAMP signalling in insulin and glucagon secretion. *Diabetes, obesity & metabolism* 19:42–53.
239. Lee DI *et al.* (2015) Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease. *Nature* 519:472–476.
240. Fang L *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* 28:1751–1761.
241. Wang L *et al.* (2011) Phosphodiesterase-5 is a therapeutic target for peripheral neuropathy in diabetic mice. *Neuroscience* 193:399–410.
242. Hanna R *et al.* (2021) Cardiac Phosphodiesterases Are Differentially Increased in Diabetic Cardiomyopathy. *Life sciences* 283:119857.
243. Kokkonen K, Kass DA (2017) Nanodomain Regulation of Cardiac Cyclic Nucleotide Signaling by Phosphodiesterases. *Annual review of pharmacology and toxicology* 57:455–479.
244. Daniel C, Schaub K, Amann K, Lawler J, Hugo C (2007) Thrombospondin-1 is an endogenous activator of TGF-beta in experimental diabetic nephropathy in vivo. *Diabetes* 56:2982–2989.
245. Bayraktar M, Dündar S, Kirazli S, Teletar F (1994) Platelet factor 4, beta-thromboglobulin and thrombospondin levels in type I diabetes mellitus patients. *The Journal of international medical research* 22:90–94.
246. Wang S, Lincoln TM, Murphy-Ullrich JE (2010) Glucose downregulation of PKG-I protein mediates increased thrombospondin1-dependent TGF- $\beta$  activity in vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 298:C1188-97.
247. Wang S, Shiva S, Poczatek MH, Darley-USmar V, Murphy-Ullrich JE (2002) Nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase regulation of glucose-mediated thrombospondin 1-dependent transforming growth factor-beta activation in mesangial cells. *Journal of Biological Chemistry* 277:9880–9888.

248. Wang S, Wu X, Lincoln TM, Murphy-Ullrich JE (2003) Expression of constitutively active cGMP-dependent protein kinase prevents glucose stimulation of thrombospondin 1 expression and TGF-beta activity. *Diabetes* 52:2144–2150.
249. Kennelly PJ, Krebs EG (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *Journal of Biological Chemistry* 266:15555–15558.
250. Scheele W *et al.* (2016) Phosphodiesterase Type 5 Inhibition Reduces Albuminuria in Subjects with Overt Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 27:3459–3468.
251. Liu G *et al.* (2020) Praliciguat inhibits progression of diabetic nephropathy in ZSF1 rats and suppresses inflammation and apoptosis in human renal proximal tubular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 319:F697-F711.
252. Zimmer DP *et al.* (2020) Olinciguat, an Oral sGC Stimulator, Exhibits Diverse Pharmacology Across Preclinical Models of Cardiovascular, Metabolic, Renal, and Inflammatory Disease. *Frontiers in pharmacology* 11:419.
253. Boustany-Kari CM *et al.* (2016) A Soluble Guanylate Cyclase Activator Inhibits the Progression of Diabetic Nephropathy in the ZSF1 Rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 356:712–719.
254. Mátyás C *et al.* (2015) The soluble guanylate cyclase activator cinaciguat prevents cardiac dysfunction in a rat model of type-1 diabetes mellitus. *Cardiovascular diabetology* 14:145.
255. El-Mahdy NA, El-Sayad ME-S, El-Kadem AH (2016) Combination of telmisartan with sildenafil ameliorate progression of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic model. *Biomedicine & pharmacotherapy* 81:136–144.
256. Gheibi S, Ghasemi A (2020) Insulin secretion: The nitric oxide controversy. *EXCLI journal* 19:1227–1245.
257. Kashyap SR *et al.* (2005) Insulin resistance is associated with impaired nitric oxide synthase activity in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90:1100–1105.
258. Young ME, Radda GK, Leighton B (1997) Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro. *The Biochemical journal* 322:223–228.
259. Young ME, Leighton B (1998) Evidence for altered sensitivity of the nitric oxide/cGMP signaling cascade in insulin-resistant skeletal muscle. *The Biochemical journal* 329:73–79.
260. Ataei Ataabadi E *et al.* (2020) Nitric Oxide-cGMP Signaling in Hypertension: Current and Future Options for Pharmacotherapy. *Hypertension* 76:1055–1068.
261. Evgenov OV *et al.* (2006) NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nature reviews. Drug discovery* 5:755–768.
262. Stasch J-P, Dembowski K, Perzborn E, Stahl E, Schramm M (2002) Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies. *British journal of pharmacology* 135:344–355.
263. Schinner E *et al.* (2017) Inhibition of the TGFβ signalling pathway by cGMP and cGMP-dependent kinase I in renal fibrosis. *FEBS Open Bio* 7:550–561.
264. Zhou Z *et al.* (2008) Protein kinase G phosphorylates soluble guanylyl cyclase on serine 64 and inhibits its activity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28:1803–1810.
265. Jia T *et al.* (2019) Cinaciguat in combination with insulin induces a favorable effect on implant osseointegration in type 2 diabetic rats. *Biomedicine & pharmacotherapy* 118:109216.
266. Ridnour LA *et al.* (2005) Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:13147–13152.

- 
267. Hohenstein B, Daniel C, Wittmann S, Hugo C (2008) PDE-5 inhibition impedes TSP-1 expression, TGF-beta activation and matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23:3427–3436.
268. Schlöndorff D, Banas B (2009) The mesangial cell revisited: no cell is an island. *Journal of the American Society of Nephrology* 20:1179–1187.
269. Theilig F *et al.* (2001) Cellular distribution and function of soluble guanylyl cyclase in rat kidney and liver. *Journal of the American Society of Nephrology* 12:2209–2220.
270. Neubauer B *et al.* (2013) Endothelium-derived nitric oxide supports renin cell recruitment through the nitric oxide-sensitive guanylate cyclase pathway. *Hypertension* 61:400–407.
271. Piwkowska A, Rogacka D, Kasztan M, Angielski S, Jankowski M (2013) Insulin increases glomerular filtration barrier permeability through dimerization of protein kinase G type Ialpha subunits. *Biochimica et biophysica acta* 1832:791–804.
272. Heilig C *et al.* (1995) Immunogold localization of high-affinity glucose transporter isoforms in normal rat kidney. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 73:674–684.
273. Ayo SH, Radnik RA, Garoni JA, Glass WF, Kreisberg JI (1990) High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. *The American Journal of Pathology* 136:1339–1348.
274. Corbin JD, Turko IV, Beasley A, Francis SH (2000) Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *European journal of biochemistry* 267:2760–2767.
275. Murthy KS (2001) Activation of phosphodiesterase 5 and inhibition of guanylate cyclase by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle. *The Biochemical journal* 360:199–208.
276. Matei A-E *et al.* (2018) Protein kinases G are essential downstream mediators of the antifibrotic effects of sGC stimulators. *Annals of the rheumatic diseases* 77:459.
277. Schramm A *et al.* (2014) Function of cGMP-dependent protein kinase II in volume load-induced diuresis. *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 466:2009–2018.
278. Hahn MG *et al.* (2021) Discovery of the Soluble Guanylate Cyclase Activator Runcaciguat (BAY 1101042). *Journal of medicinal chemistry* 64:5323–5344.
279. Shao Y-x *et al.* (2014) Discovery of a Phosphodiesterase 9A Inhibitor as a Potential Hypoglycemic Agent. *Journal of medicinal chemistry* 57:10304–10313.

## 6 Anhang

### 6.1 Zugehörige Totalprotein-Spuren der Immunoblots in Abbildung 3-11.



---

## 7 Veröffentlichungen

### 7.1 Publikationen

**HARLOFF, M;** PRÜSCHENK, S; SEIFERT, R; SCHLOSSMANN, J (2021) Activation of sGC signalling with Cinaciguat improves impaired kidney function in diabetic mice. *British Journal of Pharmacology* 1-16. DOI: 10.1111/bph.15425.

FLEISCHMANN, D; **HARLOFF, M;** MASLANKA FIGUEROA, S; SCHLOSSMANN, J; GOEPFERICH, A (2021) Targeted Delivery of Soluble Guanylate Cyclase (sGC) Activator Cinaciguat to Renal Mesangial Cells via Virus-Mimetic Nanoparticles Potentiates Anti-Fibrotic Effects by cGMP-Mediated Suppression of the TGF- $\beta$  Pathway. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 2557. DOI: 10.3390/ijms22052557.

SCHRAMM, A., MUELLER-THUEMEN, P., LITTMANN, T., **HARLOFF, M.**, OZAWA, T., SCHLOSSMANN, J (2018) Establishing a Split Luciferase Assay for Proteinkinase G (PKG) Interaction Studies. *International Journal of Molecular Sciences* 19(4): 1180. DOI: 10.3390/ijms19041180.

### 7.2 Posterpräsentationen

Harloff, M; Hofmann, F; Schlossmann, J. (2019) Investigating the protective role of the NO/sGC/PKG pathway in Diabetic Nephropathy in vivo and in vitro. *9th International Conference on cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications (Mainz, Germany)*.

Harloff, M; Hofmann, F; Schlossmann, J. (2018) The role of cGMP/PKG signaling in diabetic nephropathy. *10th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (Oxford, UK)*

Harloff, M., Reinders, J., Schlossmann, J. (2017) The role of cGMP in a cell culture model of Diabetic Nephropathy. *5th International Symposium of the Collaborative Research Centre Sonderforschungsbereich 699 (Regensburg, Germany)*.

Harloff, M., Reinders, J., Schlossmann, J. (2017) The role of cGMP in a cell culture model of Diabetic Nephropathy. *8th International Conference on cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications (Bamberg, Germany)*.

## 8 Danksagung

Zum Schluss möchte ich all denjenigen meinen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jens Schlossmann für die Möglichkeit, diese Arbeit, über eine interessante Aufgabenstellung, in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können, die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung, sowie die Unterstützung während dieser Zeit.

Danke an Herrn Prof. Dr. Achim Göpferich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Roland Seifert und Frau Annette Garbe von der ZFA Metabolomics an der Medizinischen Hochschule Hannover, danke ich für die Bestimmung der cNMP-Konzentrationen.

Ein herzliches Dankeschön geht an Dr. Elisabeth Schinner, für die Einführung in die Welt der Niere und ihre Unterstützung, insbesondere zu Beginn dieser Arbeit.

Dr. Andrea Schramm danke ich besonders für die ständige Diskussionsbereitschaft, den zahlreichen wertvollen Ratschlägen und das kritische Korrekturlesen der Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön gebührt auch Sally Prüschenk für die angenehme und kurzweilige Zeit in unserem Büro und das große Engagement bei der praktischen Umsetzung der Reviewer-Anforderungen.

Für alle großen und kleinen Hilfen im Laboralltag, geht ein großer Dank an die technischen Assistenten, Gertraud Wilberg, Simon Kerler und insbesondere Astrid Seefeld, die mit viel Geduld und Mühe einen wichtigen Beitrag geleistet hat.

Unserer Sekretärin Martina Wechler möchte ich für die Unterstützung bei allerlei organisatorischen Dingen danken.

Auch allen anderen Mitgliedern des Lehrstuhls danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, den fachlichen Austausch, den kurzweiligen Mittagspausen und den vielen erheitenden Gesprächen.



## 9 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit 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 des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten 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.

.....  
(Ort, Datum)

.....  
(Unterschrift)