

Aus dem Lehrstuhl für Physiologie
Prof. Dr. Hayo Castrop
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

**Albumin enthaltende Vesikel im Harn –
ein neuer Marker für Defekte der renalen Filtrationsbarriere**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Rike Felgner

2025

Aus dem Lehrstuhl für Physiologie
Prof. Dr. Hayo Castrop
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

**Albumin enthaltende Vesikel im Harn –
ein neuer Marker für Defekte der renalen Filtrationsbarriere**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Rike Felgner

2025

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolf Hayo Castrop
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Matthias Mack
Datum der Disputation:	25.06.2026

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Die Niere	9
1.2	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	10
1.2.1	Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere	11
1.2.2	Das Endothel.....	12
1.2.3	Die Glomeruläre Basalmembran	12
1.2.4	Die Podozyten.....	12
1.3	Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere.....	14
1.3.1	Die Filtration von Albumin	16
1.3.1	Resorption von Albumin	18
1.4	Proteinurie.....	21
1.5	Neue Wege der Proteinurie.....	22
1.5.1	Podozyten und Endozytose	23
1.5.2	Folgen der Proteinendozytose für die Podozyten.....	25
1.5.3	Foot Process Effacement.....	29
1.5.4	Folgen der Entdifferenzierung: Ablösung von der GBM und Apoptose	31
1.5.5	Folgen der Proteinendozytose für die Zellen des proximalen Tubulus	34
1.6	Pathophysiologie der Albuminurie	35
1.6.1	Pathophysiologische Effekte des Renin-Angiotensin-Aldosteron- Systems	39
1.6.2	Protektion durch Früherkennung.....	41
2	Fragestellung	43
2.1	Hintergrund	43
2.2	Problemstellung.....	43
2.3	Ziel der Arbeit.....	44
3	Material und Methoden	45

3.1	Material	45
3.1.1	Reagenzien	45
3.1.2	Antikörper	47
3.1.3	Geräte	47
3.1.4	Software	49
3.1.5	Verbrauchsmaterial	49
3.2	Methoden	51
3.2.1	Auswahl der Probandinnen und Probanden	51
3.2.2	Exosomenisolation	52
3.2.3	Osmolaritätsmessung	53
3.2.4	Elektrophorese und Western Blot	53
3.2.5	Proteinquantifizierung mit Image Lab	55
4	Ergebnisse	57
4.1	Methodische Vorarbeiten	57
4.1.1	Charakterisierung der Vesikel	57
4.2	AugUR2-Kohorte	59
4.2.1	Geschlechterverteilung	59
4.2.2	Altersverteilung	59
4.2.3	Vorerkrankungen in der Kohorte	59
4.2.4	Nierengesundheit in der Kohorte	60
4.3	Ergebnisse der Vesikelanalyse der AugUR-Studie	65
4.3.1	Vesikuläres Albumin und Podocalyxin	65
4.3.2	Geschlechtsabhängige Unterschiede bei vesikulärem Albumin und Podocalyxin	68
4.3.3	Zusammenhang zwischen vesikulärem Albumin und Podocalyxin	70
4.3.4	Regressionsanalyse – Wie viel Prozent des gemessenen vesikulären Albumins lassen sich durch freies Albumin erklären?	71
4.3.5	Vesikuläres Albumin, Podocalyxin und Nierengesundheit	73

4.3.6	Vesikel und Entzündungsmarker.....	77
4.3.7	Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf die Vesikel: Vesikuläres Albumin unter der Einnahme von RAAS-Inhibitoren	79
5	Diskussion.....	81
5.1	Interpretation der Ergebnisse	82
5.1.1	Charakterisierung der AugUR2 Kohorte.....	82
5.1.2	Nachweis der Exosomenmarker und Podozytenmarker in den Vesikelsuspensionen nicht aber im Vollurin	82
5.1.3	Albuminurie und vesikuläres Albumin	83
5.1.4	Vesikuläres Albumin und vesikuläres Podocalyxin.....	84
5.1.5	Vesikuläres Albumin, Podocalyxin und Nierengesundheit	85
5.1.6	Vesikuläres Albumin und Podocalyxin im Zusammenhang mit systemischer Inflammation	88
5.1.7	Geschlechtsabhängige Unterschiede.....	89
5.2	Implikationen: Vesikuläre Biomarker als Indikatoren für Nierenfunktion, Alterungsprozesse und therapeutische Interventionen	106
5.2.1	Zusammenhang zwischen eGFR, Alter und vesikulärem Podocalyxin 107	
5.2.2	Nierenerkrankung und vesikuläres Albumin	109
5.2.3	Systemische Inflammation und vesikuläre Biomarker	109
5.2.4	Pharmakologische Modulation der Vesikelproduktion durch RAAS- Inhibitoren.....	110
5.3	Fazit, Limitationen und offene Fragen	112
5.3.1	Limitationen und Stärken der Arbeit	113
5.3.2	Zukünftige Forschungsfragen.....	114
6	Zusammenfassung.....	115
7	Literatur	124
8	Abbildungsverzeichnis	117

8.1	Formeln	117
8.2	Abbildungen	122
8.3	Tabellen	120
9	Abkürzungsverzeichnis	122
10	Lebenslauf	124
11	Danksagung.....	155

1 Einleitung

1.1 Die Niere

Die Nieren sind lebenswichtige Organe, die eine zentrale Rolle im menschlichen Stoffwechsel spielen. Ihre Hauptfunktion besteht in der Filtration des Blutes. Dabei werden Abfallprodukte und überschüssige Substanzen aus dem Blut entfernt und als Urin ausgeschieden. Gleichzeitig regulieren die Nieren über die Zusammensetzung des Urins Volumen und Elektrolytzusammensetzung des Extrazellulärraums.

Darüber hinaus produzieren die Nieren als endokrine Organe Calcitriol, Erythropoetin und Klotho und greifen damit in den Knochenstoffwechsel, die Blutbildung und Alterungsprozesse des Körpers ein. Die Nieren sind somit essenziell für die Aufrechterhaltung der Homöostase und spielen eine entscheidende Rolle bei der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen zur Entgiftung des Organismus (1–4).

Die renale Anatomie spiegelt diese Aufgaben wider: Die kleinste funktionelle Einheit der Harnproduktion ist das Nephron. Jede Niere enthält etwa 1,4 Millionen Nephrone (1, 5). Sie bestehen aus Corpusculum renalis (Nierenkörperchen) und Tubulus renalis (Nierenkanälchen). In den Nierenkörperchen wiederum befinden sich die Kapillarschlingen des Glomerulus und die Capsula renalis, die auch Bowman-Kapsel genannt wird. Die Kapillarschlingen des Glomerulus werden durch die Vasa afferentes gespeist, die das Blut der Nierenarterien führen. Nach Durchlaufen des Glomerulus wird das Blut über Vasa efferentes in ein zweites Kapillarbett geführt und über dieses peritubuläre Kapillarsystem mit seinen entlang der Nierenkanälchen auf- und absteigenden Vasa recta wird das Blut und resorbierte Flüssigkeit wieder den Nierenvenen und somit dem systemischen Kreislauf zugeführt (6). Die Bowman-Kapsel umhüllt mit ihrem viszeralen Blatt die Kapillarschlingen des Glomerulus und mit ihrem parietalen Blatt das Nierenkörperchen gegen seine Umgebung ab. Zwischen den beiden Blättern liegt der Kapselraum. Das im Nierenkörperchen über die glomeruläre Filtrationsbarriere erzeugte zellfreie Filtrat des Blutes wird Primärharn genannt und wird durch den Kapselraum am Harnpol des Glomerulus in die Nierenkanälchen weitergeleitet. Die Epithelien der Nierenkanälchen passen dann die Zusammensetzung des Urins genau an die momentanen Bedürfnisse des Körpers an: In den verschiedenen Abschnitten des angeschlossenen Tubulussystems erfolgt eine Adaption der Konzentration des Harns sowie eine spezifische Änderung der Elektrolyt-Zusammensetzung und des pH-Werts, um die

Homöostase zu sichern. Entlang der Nierenkanäle werden zudem Proteine, Aminosäuren, Laktat und Glukose resorbiert und harnpflichtige Stoffe, wie Harnstoff, Harnsäure, Ammoniak und Xenobiotika in den Urin sezerniert (3). Über Verbindungstübuli und Sammelrohre gelangt schließlich der Endharn aus den individuellen Nierenkanälchen der Nephrone über Verbindungstübuli und Sammelrohre in das Nierenbecken und wird über den Ureter der Blase zugeführt und schließlich bei der Miktion abgegeben (6).

1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

In der Sicherung der Homöostase durch die Nieren erfüllt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine vitale Funktion: Es hält die Natrium-Konzentration in Blutplasma aufrecht und reguliert den arteriellen Blutdruck (2, 7–11).

Namensgebend für das RAAS sind die beteiligten Hormone:

- Renin ist eine von den Zellen des juxtaglomerulären Apparates sezernierte Protease, die das in der Leber und im Fettgewebe synthetisierte Angiotensinogen zu Angiotensin I spaltet. Renin wird deswegen auch als Angiotensinogenase bezeichnet. Die Sekretion von Renin wird ausgelöst durch arterielle Hypotonie, Hypovolämie, erniedrigte Natriumchloridplasmakonzentration (wahrgenommen über die Hypochlorämie) und direkt durch die Aktivierung des sympathischen Nervensystems (7, 10–12).
- Angiotensin I ist das Produkt der Protease Renin. Es handelt sich um ein Glykoprotein. Angiotensin I wird durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) zu Angiotensin II gespalten. Angiotensin II vermittelt durch Bindung an den AT1-Rezeptor die klassische Wirkung des RAAS (10, 12). Angiotensin II wirkt so vasoaktiv: Es löst eine Kontraktion in glatten Muskelzellen aus und steigert so Blutdruck und Herzfrequenz. Außerdem wirkt es prothrombotisch auf das Gerinnungssystem. Angiotensin II löst weiter Durstgefühl und Salzappetit sowie die Freisetzung von antidiuretischem Hormon (ADH) aus der Neurohypophyse aus (12, 13). ADH wirkt ebenfalls vasokonstriktorsch und stimuliert die Wasserrückresorption über den Einbau von Aquaporinmolekülen in distalem Tubulus und Sammelrohr (13, 14). In der Niere bewirkt der Angiotensin-II-Einfluss eine gesteigerte Rückresorption von Natrium und Wasser im proximalen Tubulus sowie eine

Verengung des Vas efferens, um trotz der verminderten renalen Durchblutung die glomeruläre Filtration aufrechtzuerhalten. In der Nebenniere stimuliert Angiotensin II die Synthese von Aldosteron (7, 14).

- Aldosteron ist ein Mineralokortikoid, das in der Nebennierenrinde synthetisiert wird. Es entfaltet seine Wirkung im Sammelrohr und im Verbindungstubulus, wo es die Retention von Wasser und Natrium fördert, sowie die Kalium- und Protonensekretion steigert, was wiederum die Natriumretention erleichtert (12, 14, 15).

So vermittelte das RAAS eine Steigerung des Extrazellulärvolumens und des systemischen Blutdrucks. Eine Hemmung des RAAS geschieht über negative Rückkopplung: Aldosteron und Angiotensin II hemmen die Reninfreisetzung (8–12, 14).

1.2.1 Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere

Die Bildung des Harns ist eine lebensnotwendige Aufgabe der Nieren zur Aufrechterhaltung des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts. Der Primärharn wird an der glomerulären Filtrationsbarriere (GFB) gebildet. Die GFB wird auch Blut-Harn-Schranke genannt und fungiert als semipermeable Membran: Sie lässt Wasser, Ionen, Glukose und kleine Moleküle sowie die bereits angesprochenen harnpflichtigen Substanzen passieren und hält und gleichzeitig Plasmaproteine und Blutzellen zurück (16–18). So werden täglich etwa 150 L Primärharn gebildet. Im Verlauf des tubulären Systems können mehr als 99% des filtrierten Wassers und 90% der gelösten Substanzen resorbiert werden. Es resultieren – je nach Flüssigkeitszufuhr – etwa 1,5 L aufkonzentrierter Endharn am Tag (3, 17).

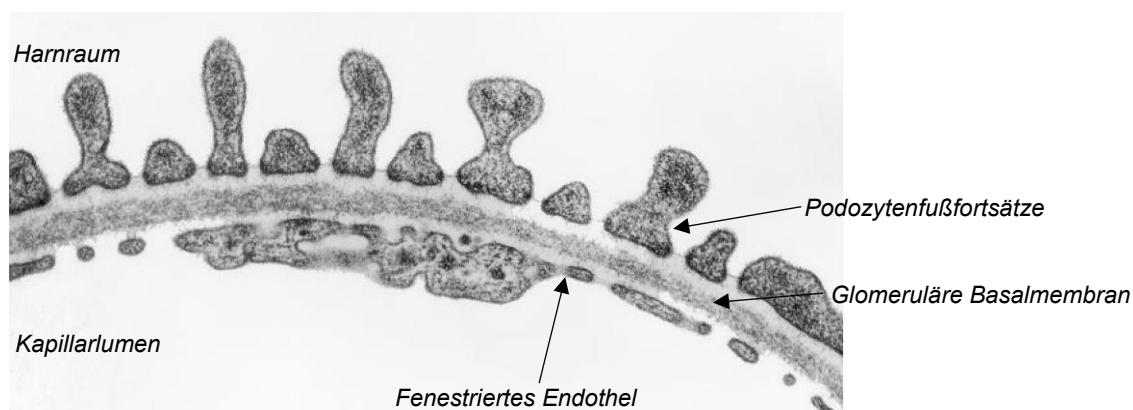


Abbildung 1: **Transmissionselektronenmikroskopie der drei Schichten der Glomerulären Filtrationsbarriere.** In den Harnraum hineinragend sitzen die Podozytenfußfortsätze der Glomerulären Basalmembran auf. Kapillarseitig sind Anteile der Endothelzellen und ihrer Fenestrae erkennbar. Abbildung übernommen aus „Cell biology of the glomerular podocyte“ (19).

1.2.2 Das Endothel

Das Kapillarknäul des Glomerulus besteht aus etwa 30-40 Schlingen. Diese ragen in den Harnraum hinein. Die Gefäßschlingen werden von einer dünnen Zellschicht, dem Endothel, ausgekleidet (20). Das spezialisierte Endothel der glomerulären Filtrationsbarriere besitzt Fenestrae (Durchmesser 70-100 nm) ohne Diaphragmen. Circa 20-50% der Endotheloberfläche werden von solchen Fenestrae gebildet (17). Jedoch wird nicht jedes Molekül mit einem Durchmesser kleiner als 70 nm filtriert, denn lumenwärtig trägt das Endothel eine ca. 400 nm hohe Glykokalyx. Diese ist durch die enthaltenen Proteoglykane, Glykoproteine und Glykosaminoglykane negativ geladen und überspannt auch die Fenestrae. Der Durchfluss von Blutzellen sowie Makromolekülen wird so verhindert (17).

1.2.3 Die Glomeruläre Basalmembran

Zwischen Endothel und Podozyten befindet sich eine Schicht aus spezialisierter Extrazellulärmatrix: Die glomeruläre Basalmembran (GBM). Sie ist mit 300 nm ungewöhnlich breit, was ihrer Dreischichtigkeit geschuldet ist (21). Dem Endothel zugewandt befindet sich die Lamina rara interna, mittig die widerstandsfähige Lamina densa und podozytenseitig die Lamina rara externa. Der Ursprung dieses charakteristischen Aufbaus liegt in der Glomerulogenese: Bei der Nierenentwicklung kommt es zu einer Fusion der zwei Basalmembranen von Endothel und Podozyten, die so gemeinsam die glomeruläre Basalmembran formen (22). Auch über die Embryonalentwicklung hinaus werden die Bestandteile der GBM teils vom Endothel und teils von den Podozyten gebildet (22, 23). In die Laminae densae, die aus Kollagen-IV, Laminin-521, Nidogen und Proteoglykanen wie Agrin bestehen, ragen die Adhärenzmoleküle beider Zelltypen – des Endothels sowie der Podozyten – hinein (20, 24, 25). Durch Heparansulfat-Proteoglykane erhält die GBM ebenfalls eine negative Ladung (21).

1.2.4 Die Podozyten

Die Podozyten sitzen der glomerulären Basalmembran harnseitig auf. Hier produzieren sie den Großteil der extrazellulären Matrix der GBM und sorgen durch die Abgabe von Endothelwachstumsfaktor (VEGF) für die Integrität des fenestrierten Endothels. Die Podozyten stellen somit das viszerale Blatt der Bowman-Kapsel dar. Ihre Zellleiber flotieren im Primärharn und entsenden dicke Primärfortsätze, welche Sekundär- und durch weitere Verzweigungen schließlich Tertiärfortsätze abgeben.

An der apikalen Plasmamembran tragen die Podozyten ebenfalls eine Art Glykokalyx. Hierbei spielt das Protein Podocalyxin eine Rolle, welches mit seinen vielen anionischen Ladungen in den Harnraum ragt. (18, 26–28).

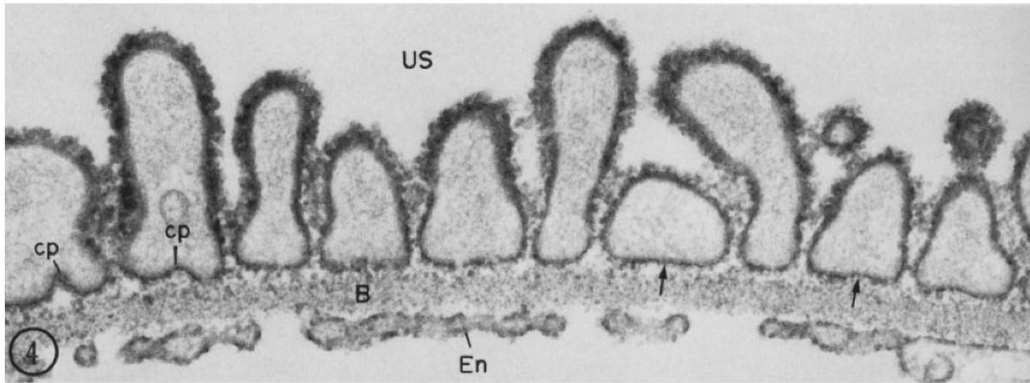


Abbildung 2 **Identifikation und Charakterisierung von Podocalyxin.** Transmissionselektronenmikroskopie der präparierten Glykokalyx, übernommen aus „Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell.“ (26).

Um dem Druck der Kapillaren standzuhalten, besitzen die Podozyten ein hochdifferenziertes, kontraktiles Zytoskelett. Mikrotubuli und Intermediärfilamente (Vimentin, Desmin) stabilisieren die Primär- und Sekundärfortsätze (29). Die tertiären Fuß-Fortsätze werden v.a. durch Aktinfilamente geformt, die über Integrine und Dystroglykan mit der glomerulären Basalmembran verbunden sind. Über diese Fokalkontakte hält sich der Podozyt an der GBM fest (29). Die Fußfortsätze interdigitieren und decken so die glomeruläre Basalmembran fast vollständig ab. Es ergeben sich zwischen den Fußfortsätzen ca. 40 nm breite Filtrationsschlitze, die durch Schlitzdiaphragmen überbrückt werden (30–32).

1.2.4.1 Aufbau der Schlitzdiaphragmen

Die Schlitzdiaphragmen stellen eine einzigartige Form des Zell-Zell-Kontakts dar, aufgebaut aus Proteinen, die in Zonula Adhärens oder Zonula Occludens-Kontakten vorkommen, wie Zonula-Occludens-1 (ZO-1) und P-Cadherin (33–35). Aber auch das Podozyten-spezifische Transmembranmolekül Nephrin spielt eine Rolle: Es ist über Podocin in der Plasmamembran der Podozyten verankert (36, 37). Von hier aus durchspannt es den Filtrationsschlitz und stößt auf Nephrinmoleküle benachbarter Fußfortsätze. Die Nephrinmoleküle überlappen reißverschlussartig in der Mitte zwischen den Fortsätzen. Daneben bleiben Filtrationsporen bestehen (30).

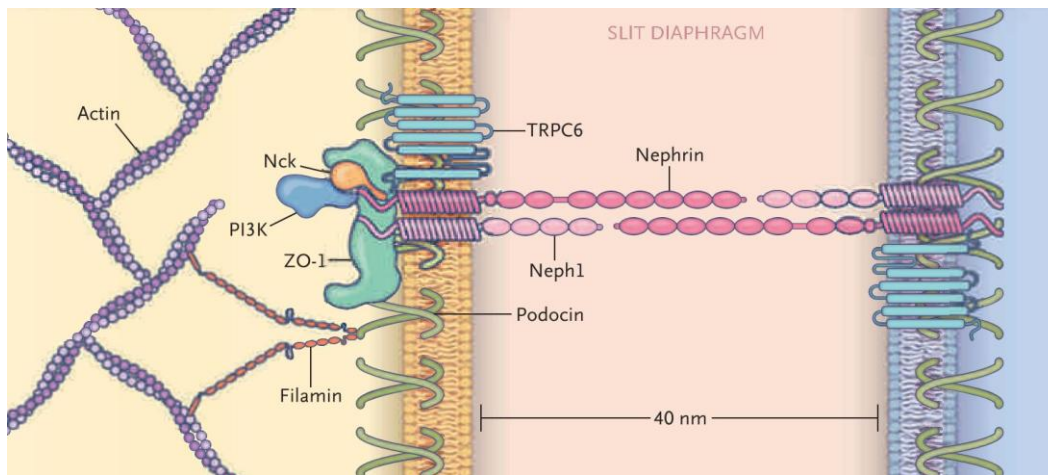


Abbildung 3: **Schematischer Aufbau der Schlitzdiaphragmen.** Abbildung übernommen aus „Insights into Glomerular Filtration and Albuminuria“ (38).

So aufgebaut stellt die glomeruläre Filtrationsbarriere die komplexeste Biomembran des menschlichen Körpers dar, um ihrer lebenswichtigen Funktion nachgehen zu können: Elektrolyte, kleine Solute und Wasser gelangen durch sie hindurch in den Harnraum, während Blutzellen und Makromoleküle zurückgehalten werden (16, 17).

1.3 Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere

Die Solut-Eigenschaften Größe, Ladung und Konfiguration, aber auch das Konzentrationsgefälle und der Flüssigkeitsfluss über die Membran beeinflussen das Ausmaß der Filtration (17).

Der Siebkoeffizient für verschiedene Moleküle nimmt mit zunehmendem Moleküldurchmesser ab (17). Wegen der negativen Ladung der Filtrationsbarriere passieren kationische Verbindungen außerdem deutlich leichter als neutrale oder anionische. Hierbei spielen besonders die zellulären Anteile der GFB eine wichtige Rolle (17, 30, 38, 39). Auch der Konfiguration der Moleküle spielt eine Rolle: Moleküle, die als bewegliche Knäule oder längliche Fäden angeordnet sind, passieren die GFB leichter als rundliche, sphärische Moleküle (17). Man spricht von Permselektivität. Unter physiologischen Umständen gelangen nur solche Moleküle in den Endharn, deren Durchmesser 4 nm oder kleiner ist und die ein Molekulargewicht unter 50 kDa aufweisen. Die meisten Plasmaproteine sind zudem negativ geladen, was ihre Filtration zusätzlich erschwert (39).

Es werden verschiedene Theorien zur genauen Funktionsweise der glomerulären Filtrationsbarriere diskutiert. Die verbreitetste Theorie ist die von Karl Tryggvason, der das Schlitzmembranprotein Nephrin (s.o.) entdeckte (30). Tryggvason sah die Schichten der glomerulären Filtrationsbarriere als drei in Reihe geschaltete Filter, deren Porendurchmesser – vom Endothel, über die glomeruläre Basalmembran bis zur Podozytenschlitzmembran – immer kleiner werden. Er schrieb der Feinfilterfunktion des Nephrins die finale Größenselektion zu (16, 17, 30, 40, 41).

Oliver Smithies entwickelte ein Alternativkonzept. Seine Theorie basiert auf der Frage nach dem Verbleib solcher Proteine, die zwar die GBM überwinden können, aber die feinen Poren der Schlitzmembranen nicht (24). Der Filter müsse über die Jahre verstopfen und die Proteine im subpodozytären Raum akkumulieren. Das Smithies-Konzept sieht die Größenselektion deshalb als Funktion der glomerulären Basalmembran an. Die Schlitzmembranen der Podozyten regulieren seiner Meinung nach hingegen vorgeblich den Flüssigkeitsfluss über die Barriere (23, 24).

Obwohl die Meinungen zum Beitrag der einzelnen Schichten zu der Gesamtbarrierefunktionen der GFB sehr wohl auseinander gehen, ist klar, dass nur das Zusammenwirken aller Komponenten eine gute Nierenfunktion garantiert (17, 41). Den Beweis hierfür liefern auch die klinischen Erscheinungsbilder von Gendefekte verschiedener Schlüsselproteine der glomerulären Basalmembran und Podozyten:

- Kongenitales nephrotisches Syndrom vom finnischen Typ: Defekte des für Nephrin kodierenden Gens NPHS1 führen zu einer familiären Form des nephrotischen Syndroms (42, 43)
- Autosomal-rezessives steroidresistentes nephrotisches Syndrom: Dieses Syndrom, das mit starker Proteinurie und Schädigungen des Glomerulus einhergeht, geht auf eine Mutation im Podocin-Gen NPSH2 zurück (44)
- Alport-Syndrom: Obwohl Sir Arthur Alport selbst eine Anfälligkeit gegenüber Streptokokken als Ursache dieser Form der familiären Proteinurie vermutete, ist mittlerweile bekannt, dass Defekte der für Kollagen-Typ 4 kodierenden Gene COL4A3, COL4A4COL4A5 zugrunde liegen (17, 23, 36, 45)

- Pierson-Syndrom: Defekt des LAMB2-Gens, der mit einer gestörten Bildung von Laminin-521 einhergeht und die Beschaffenheit der glomerulären Basalmembran verändert (45, 46)

Es kommen auch vermehrt Publikationen auf, die das Endothel und seine Glykokalyx in der Debatte um die Filterfunktion zu Unrecht vernachlässigt sehen: Obwohl die Größe der Fenestrae vermuten lässt, dass Makromoleküle frei passieren können, kommt unter physiologischen Umständen beinahe kein Albumin durch das Endothels (17, 41, 47, 48, 48). Grund hierfür ist wahrscheinlich die Glykokalyx (17, 48, 49). Auch vor der Glykokalyx machen pathophysiologische Prozesse keinen Halt. Im Rahmen von Entzündungen, Hypertonie oder Diabetes Mellitus treten Veränderungen in der Zusammensetzung der Glykosaminoglykane, Glykoproteine und Proteoglykane auf. Dadurch, sowie durch die permeabilitätserhöhende Wirkung von Zytokinen, resultieren diese Erkrankungen in einer vermehrten Filtration von Proteinen durch das Endothel (47, 49).

Zusammengefasst handelt es sich bei der Glomerulären Filtrationsbarriere um ein komplexes System, das aus mehreren hochspezialisierten Komponenten besteht. Jede dieser Strukturen erfüllt spezifische Aufgaben, um die Filtrationsfunktion der Nieren zu ermöglichen. Wenn eine dieser Komponenten geschädigt wird oder ihre Funktion verliert, hat dies weitreichende Konsequenzen für die gesamte Barriere. Besonders bedeutsam sind Wechselwirkungen und Cross-Talk-Mechanismen zwischen den verschiedenen Zelltypen. Ein Defekt in einer der Komponenten bleibt daher nicht isoliert, sondern kann eine Kaskade von Störungen auslösen, die die Funktion der gesamten Glomerulären Filtrationsbarriere beeinträchtigen und zu einer systemischen Dysfunktion führen, die Proteinurie und langfristig auch Niereninsuffizienz nach sich ziehen (17, 23).

1.3.1 Die Filtration von Albumin

Albumin ist das häufigste Protein im Plasma und erfüllt dort wichtige Aufgaben: Das annähernd sphärisch aufgebaute Protein hält den kolloidosmotischen Druck in den Gefäßen aufrecht und fungiert als Trägermolekül für viele Hormone, Metabolite, Medikamente und wasserunlösliche Vitamine (50–52). Außerdem kann es als Ampholyt sowohl Kationen als auch Anionen abpuffern und trägt so zur Aufrechterhaltung des physiologischen Blut-pH-Wertes bei. Albumin hat einen

Moleküldurchmesser von 3,4 nm und ein Molekulargewicht von 69 kDa. Der isoelektrische Punkt von Albumin liegt bei einem pH-Wert von 4,6. Albumin trägt also viele negative Ladungen (39, 52–54).

Die oben genannten Mechanismen der Selektivität der GFB lassen einen geringen Fluss von Albumin über die glomeruläre Filtrationsbarriere erwarten. Das Maß für die Albuminfiltration ist der glomeruläre Siebkoeffizient (GSC_a), der Quotient der Albuminkonzentrationen in Harnraum und Kapillarlumen.

$$GSC_a = \frac{c_{Albumin}(Harnraum)}{c_{Albumin}(Kapillarraum)}$$

Formel 1: Berechnung des glomerulären Siebkoeffizienten, der als Maß für die Albuminfiltration über die Glomeruläre Filtrationsbarriere dient

Die Konzentration von Albumin im Harnraum kann auf verschiedene Arten gemessen werden.

- Häufig erfolgt die Ermittlung der Albuminkonzentration im Harnraum über *in-vivo* Mikropunktionsversuche: Mit einer feinen Pipette werden Proben aus dem Harnraum sowie den Kapillaren entnommen und die Albuminkonzentrationen bestimmt. Hieraus resultieren Werte zwischen 0,00027 – 0,00062 (55–58).
- Andere Arbeitsgruppen haben versucht, *in-vitro* den modulierenden Einfluss des Tubulussystems auf die Proteinkonzentration zu unterbinden, indem sie eine einzelne perfundierte Niere auf 8°C runterkühlten, um so die Aktivität der Tubuluszellen auszuschalten. Dies ergab Werte von 0,0018 – 0,0019 (59, 60).
- Alternativ kann die Rückresorption des filtrierte Albumins durch die Zellen des proximalen Tubulus (s.u.) auch mittels eines Überangebots an L-Lysin gehemmt werden. Auf diesem Weg ermittelten Jan Tencer und Inga-Maria Frick einen Siebkoeffizienten von 0,000331 (61).
- Für Aufsehen sorgten auch Publikationen von Russo et al., die mithilfe der Intravital-2-Photonen-Mikroskopie eine unerwartet große Durchlässigkeit der GFB beschrieben. Ihren Ergebnissen zufolge liegt der GSC_a bei 0,0341 (62), was eine völlig neue Betrachtung der renalen Funktionsweise zur Folge hätte. Demnach wäre also eine Albuminurie fast ausschließlich Folge eines

Reabsorptionsproblems im proximalen Tubulus, die glomeruläre Filtrationsbarriere würde nur noch eine untergeordnete Rolle für die Integrität der Nierenfunktion spielen (16). Jedoch konnten diese hohen GSC_a -Werte kaum bestätigt werden. Im Gegenteil, viele Arbeitsgruppen sind mithilfe derselben Methode (Intravital-2-Photonen-Mikroskopie) zu Ergebnissen gelangt, die um ein Vielfaches geringer ausfallen ($GSC_a \sim 0,002-0,004$) (63–67).

Die gemessenen Konzentrationen im Harnraum und daraus resultierende Werte des GSC_a schwanken sehr stark in Abhängigkeit der verwendeten Methode, aber auch zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen, die dieselbe Methode verwendet haben. Und so ist die Diskussion um die Filtration von Albumin immer noch nicht abschließend geklärt. Doch auch jetzt schon steht fest: Bei einem angenommenen Siebkoeffizienten für Albumin von 0,0005, einer Primärharnmenge von 180 l und einer durchschnittlichen Plasmaalbuminkonzentration von 4,0 g/dL würden am Tag etwa 3,6 g Albumin filtriert (64, 68).

$$0,0005 \times 40 \frac{g}{L} \times 180L = 3,6g$$

Die täglich ausgeschiedene Albuminmenge beläuft sich jedoch unter physiologischen Umständen auf weniger als 30 mg/24h, also weniger als 1% des errechneten Wertes (16, 24, 51, 62, 64, 69, 70).

Die Ursache für die Diskrepanz zwischen filtriertem und ausgeschiedenem Albumin findet sich im proximalen Tubulus, wo eine Rückresorption von Proteinen stattfindet (50, 62, 71–74).

1.3.1 Resorption von Albumin

Die Zellen des proximalen Tubulus (proximal tubular cells – PTC) sind für die Massenresorption von Soluten aus dem Primärharn zuständig. Über membranständige Transporter, Diffusion und den sogenannten solvent drag werden > 60% des filtrierten Natriums und Wassers sowie 95% des Bikarbonats und > 99% der Glukose aus dem Harnraum wieder dem Blut zugeführt. Parazellulär werden Chlorid und Calcium über durchlässige tight junctions rückresorbiert. Ebenfalls werden über Transporter an der luminalen Zellmembran freie Aminosäuren praktisch vollständig

resorbiert. Im Symport mit Protonen werden auch Di- und Tripeptide dem Blutstrom wieder zugeführt (1, 3).

Größere Proteine und Polypeptide können endozytotisch in die Zellen des proximalen Tubulus aufgenommen werden. So auch das filtrierte Albumin: Bereits 1966 konnte Arvid Maunsbach die Endozytose von Albumin im proximalen Tubulus sowie den lysosomalen Abbau des Proteins innerhalb der PTC nachweisen, indem er mit einer Mikropipette Jod-125-markiertes Albumin in den proximalen Tubulus injizierte und dessen Resorption und Abbau elektronenmikroskopisch verfolgte (75, 76). Er bemerkte, dass bereits 10 Minuten nach Eingabe das markierte Albumin fast vollständig in apikalen Vakuolen der Tubuluszellen nachweisbar war. Nach 60 Minuten war das Label überall in den PTC in heterogenen Vakuolen sichtbar. Hier wurde auch saure Phosphatase-Aktivität nachgewiesen, die typisch ist für Lysosomen (50, 51, 75).

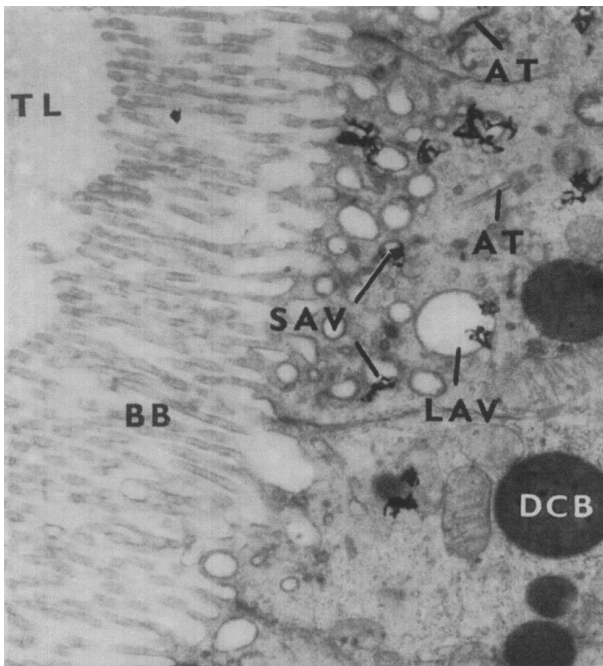


Abbildung 4: Aufnahme des mit Iod-125 markierten Albumins durch die proximalen Tubuluszellen
Elektronenmikroskopische Darstellung, übernommen aus „Absorption of I¹²⁵-labeled homologous albumin by rat kidney proximal tubule cells“
(Maunsbach 1966, S. 215)

Die Kinetik der Absorption von Albumin legte nahe, dass es sich um einen selektiven, sättigbaren Prozess handelt (72). Weitere Arbeitsgruppen konnten dies bestätigen: Eine spezifische Bindungsstelle für Albumin im proximalen Tubulus muss zugrunde liegen (51). 1992 konnten Christensen et al. Megalin als Rezeptor-Molekül identifizieren (71, 73, 77). Acht Jahre später entdeckten Birn et al. Cubilin als Bindeprotein für Albumin, welches ebenfalls an der Rezeptor-vermittelte Endozytose von Albumin durch die Zellen des Proximalen Tubulus beteiligt ist (78).

Diese Erkenntnisse wurden durch viele Experimente weiter vertieft, sodass der Resorptionsmechanismus inzwischen sehr gut aufgeklärt werden konnte: Die apikale Zellmembran im proximalen Tubulus imponiert mit einem stark aufgeprägten

Endozytose-Apparat. Hierbei spielen die zwei großen membranassoziierten Rezeptormoleküle Megalin (früher: GP330, ~ 600 kDa) und Cubilin (~ 460 kDa) eine wichtige Rolle. Diese befinden sich in Bereichen der Clathrin-Coated Pits und der Mikrovilli. Cubilin findet sich neben der Niere ebenfalls im Darm, wo es Intrinsic Factor bindet. Es handelt sich um Multi-Liganden-Rezeptoren, welche die Aufnahme verschiedenster Proteine in das Zellinnere vermitteln – auch die Aufnahme von Albumin. Wahrscheinlich interagiert der Komplex aus Albumin und Cubilin mit Megalin und daraufhin kommt es zur Internalisierung des gesamten Rezeptor-Liganden-Komplexes (78, 79). Am Mikrovilisaum der PTC und den Clathrin-Coated Pits, wird Albumin aufkonzentriert. Die Invaginationen schnüren sich als Vesikel ins Zellinnere ab. Die Rezeptoren befinden sich dann im Inneren der Vesikel (51, 62, 78–80). Die Vesikel werden zum endosomalen Zellkompartiment transportiert. Durch Anreicherung von Protonen im Vesikelinneren sinkt nun der pH, was eine veränderte Rezeptor-Liganden-Interaktion zur Folge hat: Das gebundene Albumin löst sich vom Megalin/Cubilin-Komplex und wird abgebaut. Der Rezeptorkomplex wird recycelt und wieder zur apikalen Zellmembran transportiert (51, 79). Schließlich werden die Endosomen zu Lysosomen und das enthaltene Albumin wird proteolytisch in seine Aminosäuren zerlegt. Diese verlassen die Zelle in Richtung Blutstrom über die basolaterale Membran, via Aminosäure-Natrium-Austauscher (51, 72, 77).

Defekte dieses Resorptionsapparats zeigen sich unter anderem beim Imerslund-Gräsbeck-Syndrom und beim Fanconi-Syndrom:

- Dem Imerslund-Gräsbeck-Syndrom liegt eine Mutation des Cubilin-Gens zugrunde, die mit einer intestinalen Malabsorption von Cobalamin/Vitamin-B12 sowie Albumin einhergeht (78, 79, 81–83).
- Das renale Fanconi-Syndrom äußert sich in einer generalisierten Resorptionsschwäche des proximalen Tubulus. Proteine, Aminosäuren, Glukose, Phosphat und Bikarbonat können nicht wieder dem Blut zugeführt werden. Norden, Lapsley et al. gehen von einer derart eingeschränkten Resorptionsfunktion aus, dass sie mithilfe des Endharns von Menschen mit Fanconi-Syndrom zum ersten Mal einen GSC-Schätzwert für humane Nieren publizierten: ~0,00008 (67, 84).

Beide Syndrome führen im proximalen Tubulus zu einer verminderten RückSORption von Albumin und in der Konsequenz zu starker Proteinurie (78).

Zusammengefasst spiegelt die Menge an Albumin im Endharn das dynamische Zusammenspiel zweier Mechanismen wider: der Filtration an der glomerulären Filtrationsbarriere (GFB) und der Resorption im proximalen Tubulus. Die GFB fungiert als Schranke, die den Übertritt von Proteinen in den Primärharn verhindert. Dabei wird die Filtrationskapazität durch die Struktur und Funktion der Endothelzellen, der glomerulären Basalmembran und der Podozyten bestimmt. Jede Störung in diesem fein abgestimmten System – sei es durch entzündliche Prozesse, strukturelle Defekte oder eine veränderte elektrische Ladung – kann zu einer erhöhten Filtration von Albumin führen (s.o.)

Der proximale Tubulus übernimmt die Aufgabe, die filtrierte Proteine zurückzugewinnen. Insbesondere der megalin- und cubilin-vermittelte Endozytoseweg spielt hierbei eine entscheidende Rolle (Gekle 1998, S. 10). Erst eine Überschreitung der Resorptionskapazität führt zu einer klinisch signifikanten Proteinurie (51, 62, 64, 71).

1.4 Proteinurie

Den Nachweis der Proteinurie liefert eine laborchemische Analyse von 24h-Sammelurin: Von einer pathologischen Ausscheidung spricht man dann, wenn die Menge an Eiweiß im Endharn 150 mg am Tag überschreitet oder alternativ die spezifische Exkretion von Albumin über 30 mg am Tag liegt. Um im Alltag nicht auf die fehleranfällige Kollektion von Sammelurin angewiesen zu sein, hat sich die Berechnung des Albumin-Kreatinin-Quotienten (ACR) bewährt (17, 70, 85).

Anhand des ACR wird eine Stadieneinteilung der Albuminurie vorgenommen:

Stadium	Albumin-Exkretions-Rate [mg/24 h]	Albumin-Kreatinin-Quotient [mg/g]	Beschreibung
A1	< 30 mg/24 h	< 30 mg/g	Normal to mildly increased
A2	30-300 mg/24 h	30-300 mg/g	Moderately increased
A3	> 300 mg/24 h	> 300 mg/g	Severely increased

Tabelle 1: Stadieneinteilung der Albuminurie nach KDIGO anhand der Albumin-Kreatinin-Ratio bzw. der Menge an Albumin im 24h-Urin (69, 70)

Im Einklang mit den oben dargestellten Forschungsergebnissen, wird Proteinurie auch nach Ursachen kategorisiert (72). Man unterscheidet prärenale, renale und postrenale Formen:

- Die prärenale Proteinurie wird auch Überlaufproteinurie genannt und ist bedingt durch ein pathologisch vermehrtes Vorkommen von niedermolekularen, frei filtrierbaren Proteinen im Serum. Durch die massenhafte Filtration der kleinen Proteine wird die Resorptionskapazität des proximalen Tubulus überschritten. Ursächlich sind beispielsweise eine verstärkte Hämolyse, Rhabdomyolyse oder ein Bence-Jones-Protein produzierendes Plasmozytom. Infolgedessen treten im Endharn wie auch im Blut vermehrt kleine Markermoleküle auf, wie das Hämoglobin, Myoglobin oder Bence-Jones-Protein (72, 86, 87).
- Liegt der Ursprung der Proteine im Endharn in der Niere, spricht man von renaler Proteinurie. Im Einklang mit den oben beschriebenen Erkenntnissen unterscheidet man weiter nach glomerulären Formen, die mit einer erhöhten Filtration von Protein einhergehen und tubulären Formen, denen eine herabgesetzte Rückresorption zugrunde liegt (17, 69).
- Bei postrenalen Proteinurien findet sich die Eiweißquelle in den ableitenden Harnwegen. Sie tritt als Folge von lokalen Blutungen oder Infektionen der Harnleiter, Harnblase oder Urethra auf. Hinweisgebend hierfür ist das Vorkommen von großen Molekülen wie dem α_2 -Makroglobulin und IgM im Endharn. Mit Molekulargewichten von 750-800 kDa wären diese Globuline selbst bei kompromittierter Filtrationsfunktion nicht nierengängig (88).

1.5 Neue Wege der Proteinurie

Die komplexe Dynamik der Proteinurie wird durch das fein abgestimmte Zusammenspiel von glomerulärer Filtration und tubulärer Resorption geprägt. Während Störungen an der glomerulären Filtrationsbarriere den Übertritt von Albumin in den Primärharn ermöglichen, entscheiden die Mechanismen der tubulären Resorption über den endgültigen Proteinverlust im Endharn. Doch über die klassischen Wege der Filtration und Resorption hinaus rücken zunehmend alternative Transportmechanismen in den Fokus der Forschung wie der transzelluläre Transport von Proteinen wie Albumin und Immunglobulin G (IgG) über

die Podozyten der GFB. Dieser Mechanismus, der durch Vesikel vermittelt wird, stellt eine Ergänzung zum etablierten Modell der parazellulären Filtration von Proteinen dar und wird durch aktuelle Arbeiten vielfach bestätigt. Im Folgenden wird die Rolle dieses transzellulären Weges des Albumins über die glomeruläre Filtrationsbarriere und seine Bedeutung für die glomeruläre Funktion und Dysfunktion sowie eine prospektive diagnostische Bedeutung genauer beleuchtet (16, 40, 64, 89).

1.5.1 Podozyten und Endozytose

Das klassische Modell nach Tryggvason beschreibt die glomeruläre Filtrationsbarriere als drei aufeinanderfolgende Filterschichten, deren Porendurchmesser kontinuierlich abnehmen, sodass die Schlitzdiaphragmen der Podozyten als die finale größenselektive Barriere angenommen werden (17, 30, 90).

Obgleich das fenestrierte Endothel und die glomeruläre Basalmembran starke selektive Eigenschaften aufweisen, können nach der Theorie von Tryggvason bestimmte Proteine aufgrund ihres Durchmessers die glomeruläre Basalmembran passieren, jedoch nicht die engmaschigen Schlitzdiaphragmen. Diese Proteine sammeln sich im sogenannten subpodozytären Raum an – einem schmalen Kompartiment zwischen der Basalmembran und dem Zelleib der Podozyten (29, 89, 91).

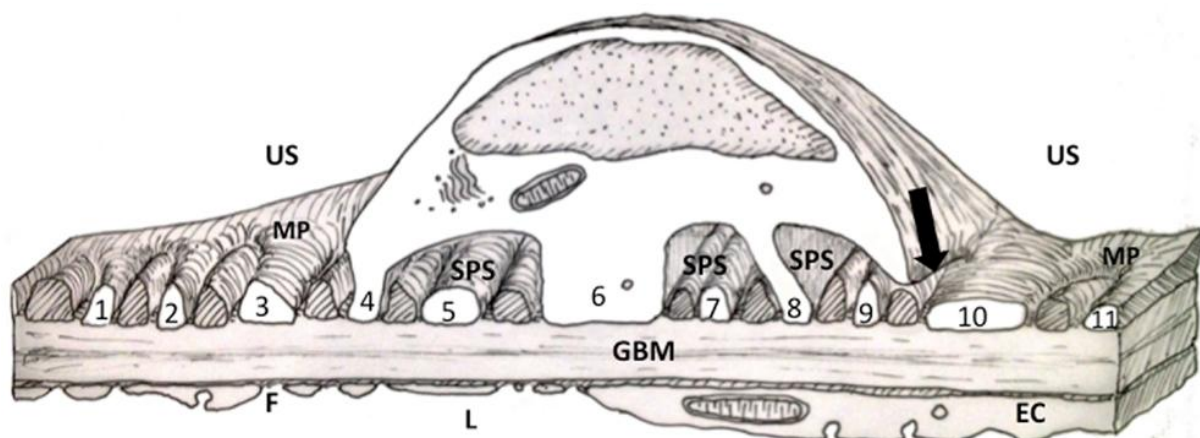


Abbildung 5: Schematische Darstellung des subpodozytären Raums
 Querschnitt durch den Zellkörper eines Podozyten. Die Fußfortsätze (foot processes – FP), die von den Hauptfortsätzen (major processes – MP) abzweigen, sind mit Zahlen von 1 bis 11 gekennzeichnet, sie verzahnen sich mit Fußfortsätzen anderer Podozyten, die schraffiert dargestellt sind. Ebenfalls abgebildet sind die anderen Bestandteile der GFB mit glomerärer Basalmembran (GBM) und Endothelzellen (endothelial cell – EC), die Fenestrae (F) zum Kapillarlumen (L) haben
 Abbildung übernommen aus „Podocytes ... What's Under Yours? (92)

Eine mögliche Aufnahme der in diesem Raum akkumulierten Proteine durch Podozyten bietet eine überzeugende Erklärung für die von Oliver Smithies postulierte Frage, warum dieser subpodozytäre Raum nicht verstopft. Podozyten könnten durch Endozytose aktiv dazu beitragen, den Proteinüberschuss zu entfernen und die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere zu erhalten. Demnach fungieren die Podozyten mit ihren Schlitzdiaphragmen nicht nur als Barriere für Makromoleküle, sondern erfüllen auch eine wichtige Reinigungsfunktion für die glomeruläre Filtrationsbarriere (40, 93, 94). Und tatsächlich konnten viele Arbeitsgruppen zeigen, dass das im Filtrat enthaltene Albumin von den Podozyten endozytiert wird (16, 95).

Die Endozytose von Albumin in die Podozyten findet sowohl in vivo als auch in vitro bevorzugt basal – also kapillarseitig – statt (16, 16, 94). Die zugrundeliegenden Mechanismen konnten auf molekularer Ebene noch nicht restlos aufgeklärt werden (96). Verschiedene Abläufe kommen hierfür infrage: Sowohl die Voraussetzungen für eine Aufnahme über Caveolae als auch über Clathrin-Coated Pits sind in den Podozyten gegeben. Auch wenn einige Autorinnen und Autoren postuliert haben, dass Podozyten vor allem über Clathrin-Mediated Endocytosis (CME) Proteine aufnehmen (34), legen Experimente von Dobrinskikh et al. nahe, dass Albumin von den Podozyten vermutlich vollständig Caveolin-1-abhängig endozytiert wird. Welche Rolle Clathrin dann in diesem Zusammenhang spielt ist noch nicht abschließend geklärt (16, 96–98).

Für die Endozytose spielt Megalin als Rezeptormolekül für Albumin eine Rolle, wie Schießl et al. mithilfe der 2-Photonen-Mikroskopie sichtbar machen konnten (94, 94). Megalin konnte sowohl im Tierversuch mit Ratten als auch in der menschlichen Niere mit den albuminhaltigen Vesikeln kolokalisiert werden. Auch führt eine kompetitive Hemmung von Megalin mit Gentamicin zu reduzierter Aufnahme von Albumin in die Podozyten, was die Rolle des Rezeptormoleküls weiter bestätigt (91, 94). Schießl et al. widmeten sich auch dem weiteren Schicksal des von den Podozyten endozytierten Albumins und wiesen so im Tierversuch nach, dass etwa 14% des aufgenommenen Albumins in sauren Lysosomen abgebaut wird. Die restlichen 86% jedoch fusionieren zu großen Vakuolen im Zytoplasma der Podozyten, die wiederum als intakte Vesikel in den Harnraum des Glomerulus entlassen werden (40, 94). Auch Dobrinskikh et al. konnten mithilfe von kultivierten human urine-derived podocyte-like epithelial cells (HUPEC) die Transzytose des Albumins durch die Zellen abbilden

(16). Es handelt sich hierbei um einen sehr dynamischen Vorgang, der innerhalb weniger Minuten vonstattengeht (94). Eine wichtige Rolle in diesem Prozess nimmt der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn) ein. FcRn ist ein major histocompatibility complex class I (MHC I)-ähnlicher Rezeptor, der sowohl Albumin als auch IgG binden kann (97). Nach heutigem Kenntnisstand sind Megalin und FcRn in der Lage, die Transzytose von Albumin und IgG zu initialisieren. Allerdings benötigt FcRn eine leicht saure Umgebung, um Albumin und IgG zu binden, wie sie zu Beispiel in den Endosomen vorkommt (97). Am besten verstanden ist dieser Vorgang für die Transzytose von Immunglobulin G (IgG): FcRn bindet das IgG in den Endosomen und lenkt diese zur Harnseite der Podozyten. Somit sorgt FcRn dafür, dass der Inhalt der Vesikel nicht durch Lysosomen abgebaut wird, sondern basoapikal gerichtet in den Harnraum exozytiert wird. Im Einklang damit wurde gezeigt, dass in den Podozyten FcRn-defizienter Mäuse keine derartige Transzytose von IgG stattfindet, sondern das in die Podozyten aufgenommene IgG vollständig in Lysosomen degradiert wird. Bei den FcRn-defizienten Mäusen kam es im subpodozytären Raum vermehrt zur Akkumulation der Immunglobuline. Resultat der FcRn-Defizienz war also eine stark herabgesetzte Reinigungsfunktion der Podozyten und somit wurden die Mäuse anfällig für glomeruläre Schäden (91, 97).

Die Proteinaufnahme und Transzytose durch die Podozyten bietet neben dem klassischen parazellulären Weg also eine weitere Möglichkeit für Albumin, über die glomeruläre Filtrationsbarriere zu gelangen und trägt dazu bei, die renale Filtrationsfunktion aufrechtzuerhalten. Dieser Vorgang geht jedoch nicht spurlos an den Podozyten vorüber (91, 99).

1.5.2 Folgen der Proteinendozytose für die Podozyten

Je mehr Albumin durch die glomeruläre Basalmembran gelangt und im subpodozytären Raum akkumuliert, desto aktiver endozytieren die Podozyten die anfallenden Proteine (94). Kommt es jedoch zu einer übermäßigen Endozytose durch die Podozyten, reagieren diese empfindlich: Die Anreicherung von Albumin im Inneren der Zelle kann zur Zersetzung der Lysosomenmembranen führen und damit zur Freisetzung der lysosomalen Enzyme in das Zytoplasma (40, 93). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden aus den zahlreichen Mitochondrien der Podozyten freigesetzt. Das endoplasmatische Retikulum der Podozyten gerät unter Stress. Es werden proinflammatorische und proapoptotische Zytokine ausgeschüttet, wie

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α). In den Podozyten bewirkt TNF- α eine Hochregulation des neonatalen Fc-Rezeptors (FcRn) und damit eine weitere Steigerung der energieaufwendigen Transzytoseaktivität. Besonders relevant sind diese Vorgänge für Patientinnen und Patienten mit diabetischer Nephropathie, da glykierte Reaktionsprodukte (AGE) über glucose-regulated protein 78 (GRP) ebenfalls endoplasmatischen Stress auslösen und die beschriebene Reaktion weiter aggravieren (40, 97, 100, 100, 101).

Es kommt zu einer Entzündungsreaktion der glomerulären Filtrationsbarriere. Viele verschiedene Signalwege werden parallel aktiviert. Mithilfe von kultivierten Podozyten sowie im Tiermodell haben Agrawal, Guess et al. mehrere Spieler der Entzündungsregulation in den Podozyten identifizieren können (102). In Ihrem Versuchsaufbau wurde Ratten Serumalbumin infundiert. In der Folge wurde vermehrt Albumin in die Podozyten aufgenommen und – kohärent mit den oben geschilderten pathophysiologischen Veränderungen – die Tiere entwickelten eine Glomerulopathie mit resultierender kräftiger Albuminurie. Die Arbeitsgruppe hatte so die Möglichkeit, Profile der Genexpression zu erstellen und sie mit denen gesunder, nicht-exponierter Tieren zu vergleichen. Auch die kultivierten Podozyten wurden mit BSA inkubiert und es wurden Genexpressionsprofile erstellt. Es konnten eine Hochregulation der Genexpression der Cyclooxygenase-2, von Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Chemokin-CXC-Ligand 1 (CXCL 1), Transforming Growth Factor β (TGF- β), Endothelin-1 (ET-1) sowie vielen weiteren Zytokinen nachgewiesen werden (50, 86, 102).

In der Diskussion Ihrer Forschungsergebnisse betonen die Arbeitsgruppen um Shipra Agrawal und Marina Morigi vor allem die Bedeutung des NF κ B-Signalwegs: Nuclear Factor Kappa B (NF κ B) ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren in der Physiologie der Entzündungsreaktionen (102, 103). NF- κ B bindet an das κ B-Motiv. Hierbei handelt es sich um ein DNA-Motiv, das aus 10 Basenpaaren besteht und sich an zahlreichen regulatorischen Bereichen der DNA wiederfindet. Es reguliert die Transkription vieler Gene, die bei der Immunantwort, Apoptose und Proliferation eine Rolle spielen. Eine Aktivierung von NF κ B geht in wenigen Minuten vonstatten, da das Molekül nicht erst gebildet werden muss, sondern in den meisten Zellen zytoplasmatisch vorliegt. Stimuli für die Aktivierung können TNF α und IL-1 β sein (99, 104).

Die Bedeutung des NFκB-Signalwegs wurde in den letzten Jahren durch viele Experimente bestätigt: Eine spezifische Deletion des NFκB essential modulator (NEMO) führt in den Zellen zu einer Inaktivität des NFκB-Signalwegs. Mäuse mit induzierter Glomerulonephritis profitierten von der Deletion des NEMO. Es kam zur Rekonvaleszenz der glomerulären Entzündung (105). Obwohl es nicht zu einem Rückgang der Makrophagen oder T-Lymphozyten im Interstitium kam, wurde die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (CCL2, CCL5 und CCL7) – provoziert durch Stimulation mit TNFα und Interleukin-1 (IL-1) – in den Podozyten reduziert (99, 104). Es sei erwähnt, dass dieser Effekt in den Experimenten von Brähler et al. Nur für das Zytokin CCL5 statistisch signifikant war, für die anderen beiden Zytokine konnte ein richtungsweisender Trend nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz resultierte aus der Hemmung des NFκB-Signalwegs in den Podozyten eine rasche elektronenmikroskopisch nachweisbare Verbesserung der glomerulären Entzündung (104). Dies betont einmal mehr die pathophysiologische Relevanz der podozytären Entzündungsreaktion als Folge übermäßiger Albuminendozytose.

In den albuminexponierten Podozyten führt eine Aktivierung des NFκB-Transkriptionsfaktors zu einer verstärkten Transkription der abhängigen proinflammatorischen Gene. Unter anderem ist die Transkription der Cyclooxygenase-2 (COX-2) betroffen, der eine tragende Rolle bei der Entzündungsreaktion in Glomerulus und Interstitium zukommt (102, 104, 106). In den exponierten Podozyten kam es sowohl zu einer vermehrten Bildung als auch zu einer verbesserten Stabilität der COX-2-mRNA. Beide Mechanismen bewirken eine verstärkte Expression des Enzyms (102). Dieser Vorgang ist abhängig von der mitogen activated protein Kinase (MAP-K) (s.u.). Die COX-2 ist ein Schlüsselenzym in der induzierten, katabolen, Prostaglandin-abhängigen Entzündungsreaktion. Sie befindet sich im Inneren des endoplasmatischen Retikulums und im Golgi-Apparat, wo sie die Oxidation von Arachidonsäure zu Prostaglandinen katalysiert, weswegen sie auch als Prostaglandinsynthase-2 (PGHS-2) bezeichnet wird. Es handelt sich um Signalmoleküle, die an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt sind, einschließlich der Regulation des Blutflusses über die glomeruläre Filtrationsbarriere. Durch die gesteigerte Expression der COX-2 kommt es zu einer verstärkten Produktion von Prostaglandinen, die in die Regulation der Reninproduktion eingreifen, Vasokonstriktion und Permeabilitätssteigerung auslösen und so zur

Schädigung und Dysfunktion der Nieren beitragen und die Nieren daran hindern, Abfallprodukte effektiv zu filtern und den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt zu regulieren (102).

NF- κ B reguliert neben der Transkription der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-2 (IL-2) und Interleukin-7 (IL-7) (106) auch die Transkription des vasoaktiven Peptids Endothelin-1 (ET-1). Morigi et al. konnten zeigen, dass nach Albumin-Exposition die Menge an vorhandenem ET-1 in der Zelle stark anstieg (103, 103). Die Wirkung von Endothelin-1 auf die Podozyten ist noch nicht abschließend aufgeklärt. Es liegt aber nahe, dass es den Kapillartonus im Glomerulus, die Kontraktilität der Mesangialzellen sowie die Permeabilität der glomerulären Kapillaren steigert, was zu einer sich weiter steigenden Hyperfiltration von Albumin führen würde (103, 103).

Weitere Signalwege, die bei der Entzündungsreaktion der Podozyten eine Rolle spielen sind unter anderem der MAP-K-Signalweg, der Adenosinmonophosphat-aktivierte Kinase (AMPK) Signalweg, mTOR-Signalweg, sowie der Rho/ROCK Signalweg (107):

- Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAP-K) bezeichnen eine Gruppe von Kinasen, die in Phosphorylierungskaskaden eingebunden sind, welche durch verschiedene interne und externe Stressoren ausgelöst werden. Je nach Art des Auslösers, werden unterschiedliche Faktoren aktiviert und unterschiedliche Signalwege eingeleitet. So führt eine Aktivierung über Mitogene zu einer Aktivierung der Extracellular Signal Kinases 1 und 2 (ERK 1/2) was zu Zelldifferenzierung und Proliferation führt, wie sie unter anderem bei der Tumorentwicklung eine Rolle spielt (108). Die Aktivierung über Zytokine, wie zum Beispiel TNF- α oder Interleukin-1 hingegen führt über p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen (p38 MAPK) zu vermehrter Induktion der Apoptose, Entzündung oder Wachstum. Das erklärt die pro-apoptotische Wirkung, die TNF- α in den Podozyten hat (100). Ein dritter Aktivierungsweg geschieht über UV-Licht, Hitzeschock oder osmotischen Schock und führt über stress activated phosphokinasen (SAPK) ebenfalls zu vermehrter Apoptose, Wachstum und auch Zelldifferenzierung (107, 107).

- Die Adenosinmonophosphat-aktivierte Kinase (AMPK) ist verantwortlich dafür, die Zelle vor dem ATP-Mangel zu schützen. AMP ist ein Abbauprodukt des energiereichen Adenosintriphosphats und somit ein Indikator für Energiemangel in der Zelle. Die Aktivierung der AMPK sorgt durch Hemmung der Phosphorylierung mehrerer Enzyme, die für die Cholesterin und Fettsäure-Synthese verantwortlich sind für einen geringeren ATP-Verbrauch. Außerdem vermittelt die AMPK die durch Energiemangel induzierte Autophagie der Podozyten. Sie sorgt ebenfalls für eine gesteigerte Transkription der COX-2 (101, 102).
- mammalian target of rapamycin (mTOR) ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die ihren Namen von der immunsuppressiv wirkenden Substanz Rapamycin hat, die die Kinase inhibieren kann. mTOR kommt in einer Vielzahl von Geweben vor und besteht aus 2 Komplexen: mTORC1 und mTORC2. Der mTOR-Signalweg wird aktiviert durch AGE (Advanced Glycation Endproducts) und endoplasmatischen Stress und beeinflusst ebenfalls die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Gleichzeitig kann die Proteinkinase den Abbau von Proteinen induzieren, pro-apoptotisch wirken und eine Hypertrophie der Podozyten auslösen (101, 109).

Kurzum, eine Hyperfiltration von Albumin und die damit einhergehende Akkumulation von Albumin im subpodozytären Raum induziert in den Podozyten eine Steigerung der Endozytose von Albumin und löst so im Nierenkörperchen eine Entzündungsreaktion aus, die auf der Aktivierung verschiedenster Signalkaskaden wie MAP-K, AMPK und mTOR. Es lohnt sich, die molekularen Mechanismen dieser Signalkaskaden und die daraus resultierenden Kompromittierungen der Podozytenfunktion genau zu untersuchen, da sie für ein pathophysiologisches Verständnis der Komplexität von Proteinurie wichtig sind und einige dieser Signalwege auch therapeutische Targets darstellen können (110, 111).

1.5.3 Foot Process Effacement

Neben der Hochregulation von Entzündungssignalwegen in den Podozyten führt die Hyperfiltration von Albumin und die daraus resultierende gesteigerte Endozytose auch zu einer Herabregulation charakteristischer, strukturgebender Proteine. Dies beeinträchtigt die Integrität der komplexen Zellstruktur und führt letztlich zu einem Verlust der charakteristischen Architektur der Podozyten (29, 29, 101, 105, 107, 112,

113). Morigi et al. konnten mithilfe von Zellkulturen zeigen, dass Podozyten, die humanem Serum Albumin (HSA) ausgesetzt werden, weniger Synaptopodin exprimieren, als Zellen der Kontrollgruppe (103). In Vitro bestätigten Jim et al. einige Jahre später durch Untersuchungen von Nierenbiopsien von Patientinnen und Patienten mit diabetischer Nephropathie eine verminderte Expression der podozytären Proteine Synaptopodin, Nephrin und Podocin (114).

Podozyten sind hochdifferenzierte Zellen, deren komplexer Aufbau ein hohes Maß an zytoskelettaler Organisation voraussetzt. Das ist die Bedingung dafür, dass die Podozyten dem Druck in den glomerulären Kapillaren standhalten, den Fluss des Primärharns über die GFB regulieren und eine Barriere für Makromoleküle darstellen können (107). Man kann sich leicht vorstellen, dass fein abgestimmte Kommunikation zwischen benachbarten Podozyten die Grundlage für die Entwicklung und Funktion der interdigitierenden Fußfortsätze und der korrespondierenden Moleküle der Schlitzdiaphragmen ist. Hierfür sind die Signalwirkungen von Nephrin, Synaptopodin und Podocin mitverantwortlich (86, 114, 115).

- Synaptopodin ist ein wichtiger Regulator der GTPasen der Rho-Familie (110, 112). Kleine GTPasen wie RhoA, Rac1 und Cdc42 spielen eine wichtige Rolle in der Organisation des Zytoskeletts der Podozyten. Rac1 und Cdc42 ermöglichen Zellmotilität, Kontraktilität, die Ausbildung von Stressfasern und Pseudopodien. Die verminderte Expression von Synaptopodin, bei der wahrscheinlich TGF- β und der Komplementfaktor C5b auslösende Rollen spielen, sorgt dafür, dass sich die Aktinbindungen des Zytoskeletts verändern (110, 111, 113).
- Auch die Bedeutung von Nephrin, dem Hauptprotein des Schlitzdiaphragmas, geht in diesem Zusammenspiel über die Funktion als bloßes „Sieb“ für Makromoleküle hinaus. Mit der kleinen intrazellulären Domäne bindet es viele zytoplasmatische Moleküle und nimmt so Einfluss auf die Polarität der Podozyten, Kalzium-Ausschüttung, die Zusammensetzung der Membranproteine und des Aktin-Zytoskeletts (34)
- Podocin verstärkt die Signalkaskaden, die Nephrin auslöst (116) und gibt mechanische Stimuli von den Schlitzdiaphragmen über CD2AP und TRPC6

an das Zellinnere weiter. Es fungiert so als Verbindungsprotein zwischen der Zellmembran und dem Zytoskelett (117, 118)

Auch ET-1 (s.o.) wird Rho-abhängig reguliert. Eine Hemmung des Zytoskeletumbaus durch Inhibierung der Rho-Kinasen ging in den Experimenten von Morigi et al. mit einer verminderten Expression von ET-1 einher. Gleichzeitig wurde auch eine Aktivierung des oben beschriebenen NFκB-Signalwegs unterbunden. Diese Erkenntnisse untermauern zusätzlich die Bedeutung des Zytoskeletts im Hinblick auf die Signaltransduktion innerhalb der Zelle und der Zellen untereinander (103).

Mit dem Aufbau des Zytoskeletts verändert sich auch die Morphologie der Zelle (103). Es kommt zur Hypertrophie der Zelleiber und die hochspezialisierte Fußfortsätze verlieren ihre charakteristische Form und Funktion. Sie werden dysmorph, flachen ab, ziehen sich zurück und verschmelzen schließlich. Man spricht von Foot Process Effacement (FPE), also der Auflösung der Fußfortsätze. Damit geht die physiologisch relevante Anatomie der glomerulären Filtrationsbarriere zugrunde (103).

Podozyten reagieren auf Hyperfiltration von Albumin in stereotypischer Art und Weise. Ihr Zytoskelett wird in Abhängigkeit von den beschriebenen Rho-Kinasen umfassenden Umbauprozessen unterworfen. Damit werden die Zell-Zell sowie die Zell-Matrix-Interaktionen gestört. Die Zusammensetzung der Oberflächenproteine verändert sich. Die Schlitzdiaphragmen gehen zugrunde und werden durch Tight Junctions ersetzt. Die negative Ladung der Membranproteine der Podozyten kann nicht mehr aufrechterhalten werden. Es kommt zu einer Entdifferenzierung der Podozyten mit schwerwiegenden Folgen für die Nierenfunktion (17, 34, 93, 119–121).

1.5.4 Folgen der Entdifferenzierung: Ablösung von der GBM und Apoptose
Die Podozyten haften über ihre Fortsätze an der Basalmembran, während der Zellkörper selbst frei im Harnraum des Glomerulus floriert. Da besonders die Fußfortsätze von den Umbauprozessen im Rahmen der Albuminexposition betroffen sind, kann es zur Ablösung der Zellen von der glomerulären Basalmembran kommen, denn durch die Neuorganisation des Aktins wird auch α3β1-Integrin

beeinflusst, welches den Haftkontakt der Podozyten zur Basalmembran vermittelt (101, 110, 118). Zusätzlich üben die veränderten Druck- und Flussgradienten über der Blut-Harn-Schranke mechanischen Stress auf die Podozyten aus. Diese abgelösten Zellen werden in den Harnraum geschwemmt, sie tauchen dann vermehrt im Urin auf (119). Auch gesunde Menschen verlieren von Zeit zu Zeit lebensfähige Podozyten über den Harn. Allerdings geht aus Ergebnissen von Yin et al. heraus, dass kultivierte Podozyten aus dem Urin gesunder Patientinnen und Patienten eine signifikant geringere Überlebensdauer in Kultur zeigen als solche aus dem Urin nierenkranker Menschen. Dieser Unterschied könnte auf eine herabgesetzte Zellmortalität infolge des Entdifferenzierungsprozesses der Podozyten zurückzuführen sein, der durch die veränderte Mikroumgebung in den Nephronen nierenkranker Patientinnen und Patienten begünstigt wird. Diese Mikroumgebung ist durch pathologische Veränderungen wie Entzündungen, oxidativen Stress und eine gestörte Zellinteraktion geprägt, was das Überleben und die Funktion der Podozyten beeinträchtigt. Die Entdifferenzierung ermöglicht es den Podozyten, länger in einer proliferativen oder weniger spezialisierten Form zu überleben (118, 122).

Durch die Vergrößerung der Fußfortsätze verändert sich die Filtrationsfläche des Glomerulus. Die Meinungen zu den physikalischen Konsequenzen dieser veränderten Mikroanatomie gehen auseinander: Während Kriz und Lemley postulieren, dass FPE die Podozyten vor mechanischem Stress und vor Ablösung von der GFB schützt, kommen Benzing und Salant zu dem Schluss, dass durch die reduzierte Filtrationsfläche infolge des FPE die Scherkräfte, die auf die Podozyten wirken, noch verstärkt werden (38, 123).

Ob sich die Podozyten nun trotz oder wegen der verkürzten Fortsätze von der GBM lösen, beiden Theorien gemeinsam ist die Konsequenz, dass die morphologisch veränderten Podozyten nicht mehr in der Lage sind, die Integrität der glomerulären Basalmembran aufrechtzuerhalten, worauf diese sich verdickt und Makromoleküle nur noch unzureichend am Passieren hindert. Diese Theorien bieten somit eine elegante Antwort auf die Frage, warum sich beim Fortschreiten einer Nierenerkrankung die glomeruläre Filtrationsrate verringert, während die Filtration von Albumin exazerbiert (38, 123).

Prologierter Stress des endoplasmatischen Retikulums – wie er im Rahmen der Filtration und Endozytose von Albumin auftritt – führt außerdem zu apoptotischem Zelltod (124). Wie bereits oben erläutert, werden im Rahmen der Entzündungsreaktion auch pro-apoptotische Mediatoren wie TGF- β freigesetzt. He et al. haben in Ihren Versuchen gezeigt, dass Caspasen und Chaperone, die die ER-Stress-induzierte Apoptose vermitteln (v.a. Caspase-12 und GRP78) vermehrt produziert werden, wenn die Podozyten Albumin endozytieren. Diese Mehrproduktion von Caspasen und Chaperonen ist dosisabhängig: Proportional zur eingesetzten Menge an Albumin steigt damit auch die Apoptoserate der kultivierten Podozyten. Diese Veränderungen fügen sich nahtlos in die Erkenntnisse zur Albuminwirkung im proximalen Tubulus ein, die weiter unten näher erläutert werden (101, 124).

Neben intrinsischer Apoptose und Ablösung wurden viele weitere Wege beschrieben (Anoikose, extrinsische Apoptose, Nekrose, Autophagie, Mitose-Katastrophen), wie Podozyten den Nephronen verloren gehen. Obwohl es in den letzten Jahren großes Interesse an der Rolle der Podozyten und ihrer Schädigung im Kontext mit diversen Nierenerkrankungen gegeben hat, bleibt der Stellenwert der einzelnen Vorgänge weitestgehend unklar (100, 118).

Der Verlust von Podozyten stellt für die Niere ein zentrales Problem dar. Die Regenerationskapazitäten dieses Zelltypes sind beschränkt. Es handelt sich um derart hochdifferenzierte Zellen, dass eine Zellmigration oder gar Zellteilung immer mit Funktionsverlust einhergeht und nicht selten in der Ablösung der Zellen mündet (122). Nach einer Ablösung – seien es apoptotische, nekrotische oder lebende Zellen gewesen – liegen die entsprechenden Bereiche der GBM frei (89, 93, 103). Die verbliebenen Podozyten versuchen den Defekt zu decken, indem sie weiter hypertrophieren – wiederum zulasten ihrer Feinmorphologie. Der Verlust von Podozyten löst über Cross-Talk Mechanismen und Zytokine außerdem pathophysiologische Reaktionen in anderen Podozyten aber auch in den umgebenden Zellen wie dem Endothel und den interstitiellen Zellen aus. Nagata et al. führten hierfür den Begriff des „Podocyte Domino Effect“ ein, bei dem der Verlust einzelner Zellen die Stabilität der glomerulären Filtrationsbarriere weiter schwächt und dadurch eine Kaskade von weiteren Zellablösungen, strukturellen Schäden und letztlich die Progression der Grunderkrankung auslöst (118, 125).

Es ist also wichtig zu verstehen, dass die Endozytose von Albumin aus dem subpodozytären Raum zu einer aggravierten Entzündungsreaktion in den Nierenkörperchen führt, die über unterschiedlichste Signalwege eine Verformung der Podozyten und Basalmembran sowie eine progrediente Reduktion der Podozytenzahl zur Folge hat: Die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere wird kompromittiert. Proteine, die normalerweise im Blut zurückgehalten werden sollten, gelangen in den Harnraum und das angeschlossene Tubulussystem und führen dort zu weiteren Problemen, was im Folgenden genauer beleuchtet wird (40, 100, 105).

1.5.5 Folgen der Proteinendozytose für die Zellen des proximalen Tubulus

Die Zellen des proximalen Tubulus (PTC) können die anfallenden Proteinmengen nicht dauerhaft rückresorbieren, ohne Schaden zu nehmen (37, 47). Die Exposition ihrer apikalen Zellmembran gegenüber Albumin und anderen filtrierten Proteinen wie Transferrin und Immunglobulin G führt in den PTC dazu, dass vermehrt inflammatorische und fibrogene Mediatoren wie die bereits oben erwähnten TGF- β , ET-1, MCP-1, IL-8 und Regulated And Normal T-cell Expressed and Secreted CCL-5 (RANTES) exprimiert werden. Auch hier spielt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) eine entscheidende Rolle (64, 99, 99, 105, 126). Zytokine werden aus den PTC vermehrt basolateral und damit an das renale Interstitium abgegeben (99). Hier wirken sie als Induktoren des fibrotischen Umbaus und der Entzündungsvorgänge durch die Rekrutierung von Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten und die damit verbundene Produktion von extrazellulärer Matrix. Die aktivierten Leukozyten wiederum geben TNF- α und IL-1 β an ihre Umgebung ab und stimulieren so wiederum deren Zytokin-Produktion in den PTC im Sinne eines positiven Feedbackmechanismus (99, 99). Das Nierengewebe wird bindegewebig umgebaut und die PTC verlieren ihre Integrität: Der Bürstensaum verformt sich, die lysosomale Kapazität sinkt. Im Verlauf der Nierenerkrankung verliert der proximale Tubulus seine Resorptionskapazität (50).

Kurz gesagt zieht die Hyperfiltration von Albumin über die GFB auch im proximalen Tubulus verheerende Schäden nach sich: Durch die herabgesetzte Resorptionskapazität des Tubulussystems fällt nun auch vermehrt Eiweiß im Endharn an (50). Jedoch hat nicht nur die Glomerulopathie Einfluss auf die pathophysiologischen Prozesse im proximalen Tubulussystem: Kohärent mit den oben beschriebenen Erkenntnissen über die ganzheitliche Betrachtung der

Nierengesundheit treiben auch die tubulointerstitiellen Entzündungsvorgänge über Cross-Talk-Mechanismen die Degeneration der glomerulären Filtrationsbarriere weiter voran (99, 110, 127).

1.6 Pathophysiologie der Albuminurie

Diese Zusammenhänge zwischen Albuminfiltration und Resorption sowie die resultierende entzündungsbedingte Abwärtsspirale der Nierenfunktion werden wichtig, wenn man sich mit der Diagnostik der chronischen Niereninsuffizienz (chronic kidney disease - CKD) und ihren Komplikationen beschäftigt. Proteinurie wird gemeinhin als Symptom einer zugrundeliegenden Nierenerkrankung wahrgenommen – als Konsequenz der glomerulären Schädigung. Erst langsam setzt sich die Erkenntnis durch, dass Proteinurie mehr Krankheit als Symptom darstellt: Die Nierenfunktion verschlechtert sich infolge der Proteinurie und den resultierenden Schädigungen an allen Schichten der glomerulären Filtrationsbarriere und des Tubulussystems (47, 64, 69, 78, 89).

Wie oben beschrieben, tauchen im Endharn zunächst nur Spuren des ursprünglich filtrierten Albumins auf. Eine Proteinurie oder Albuminurie wird erst nachweisbar, wenn die Resorptionskapazität des proximalen Tubulus überschritten ist. Bis dieser Zeitpunkt erreicht ist, ist in der Niere bereits eine Kaskade an Stressreaktionen losgetreten worden, die zum Teil nicht reversibel sind (24, 51, 62, 64).

Wenn die Nierenschädigung einen bestimmten Punkt überschreitet, verschlechtert sich die renale Funktion also unabhängig von der zugrundeliegenden Erkrankung und deren Verlauf (50, 93, 128). Es ist daher nicht verwunderlich, dass Proteinurie ein wichtiger prädiktiver Faktor für die Gesundheit der Niere ist. (50, 129). So konnten Iseki et al. bereits 2003 zeigen, dass Proteinurie ein unabhängiger Prädiktor für die Entwicklung eines Nierenversagens (end-stage renal disease – ESRD) ist: In ihrer klinischen Studie ermittelten Sie die Wahrscheinlichkeit für Patientinnen und Patienten, ein Nierenversagen zu entwickeln. Diese Wahrscheinlichkeit war sehr viel höher in der Gruppe derjenigen Patientinnen und Patienten, die zum Zeitpunkt der Baseline-Messung proteinuretisch waren, verglichen mit der Gruppe, deren Proteinausscheidung im Harn unauffällig war. Nach 17 Jahren haben in der Gruppe ohne Proteinurie weniger als 1% der Patientinnen und Patienten ein Nierenversagen

entwickelt. In der Gruppe mit starker Proteinurie waren es über 15%. Auch die Dauer von der Erstdiagnose einer Niereninsuffizienz bis zum Zeitpunkt der Dialysepflicht wurde ermittelt. Für diejenigen Patientinnen und Patienten, die bei der Erstdiagnose keine Proteinurie aufwiesen, war der Zeitraum signifikant länger, als für solche Patientinnen und Patienten, bei denen eine Proteinurie nachweisbar war (141.4 Monate vs. 103.9 Monate) (129). Diese Ergebnisse konnten in den folgenden Jahren von vielen Arbeitsgruppen bestätigt werden (47, 130–132).

Um Marker für die Verlaufsprognose der beginnenden Niereninsuffizienz hin zum Nierenversagen zu ermitteln, analysierte das Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium in einer groß angelegten Metaanalyse 2011 verschiedene Risikofaktoren. Nach Ihren Erkenntnissen sind sowohl eine erniedrigte glomeruläre Filtrationsrate als auch das Vorhandensein einer Proteinurie unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung von ESRD (133). Aus diesen Erkenntnissen wurde die Forderung abgeleitet, die Einschätzung der Prognose von Patientinnen und Patienten mit Niereninsuffizienz nicht länger an die Ursache oder klinische Präsentation ihrer Erkrankung zu knüpfen, sondern viel mehr an die Parameter der eGFR und besonders der Albuminurie, deren prognostischen Mehrwert in der Analyse betont wurde. Diese Erkenntnisse wurden seitdem vielfach bestätigt und erhielten Einzug in die KDIGO-Leitlinien. Die betreffenden Studien betonen auch einmal mehr die Überlegenheit der Bestimmung des ausgeschiedenen Albumins verglichen mit einer unspezifischen Quantifizierung des vorhandenen Proteins. Zusammen mit dem Wissen über die Pathomechanismen der Albuminurie lässt sich also sagen, dass Albuminurie per se chronische Nierenkrankheiten aggraviert – eine Erkenntnis, die ebenfalls von der International Society of Nephrology übernommen wurde (69, 86, 131, 133–136).

Aber neben den lokalen Konsequenzen an den Nieren ist auch das kardiovaskuläre System des Körpers betroffen. Bereits 1836 fiel dem Arzt Richard Bright in einer Zusammenstellung von klinischen Fällen ein Zusammenhang zwischen hypertrophierten Herzen und fortgeschrittenen Nierenerkrankungen auf. Bright legt somit den Grundstein für das Konzept, dass kardiovaskuläre Krankheiten auch in der Niere begründet sein können (137, 138). Noch heute ist Richard Bright deshalb als der „Vater der Nephrologie“ bekannt (139). Seit dem 19. Jahrhundert wurde die von Bright beschriebene Assoziation vielfach bestätigt.

Studien zeigen, dass Menschen mit einer eingeschränkten glomerulären Filtrationsrate ein signifikant höheres Risiko haben, Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, koronare Herzkrankheit oder Herzrhythmusstörungen zu entwickeln, verglichen mit Menschen, deren GFR im Normalbereich liegt (138, 140). Dieser Zusammenhang ist jedoch bei pathologisch erhöhter Albuminurie noch stärker ausgeprägt als bei einer erniedrigten GFR. Wie Shuvy et al. 2020 zeigen, korreliert die Menge an ausgeschiedenem Albumin direkt mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz, der durch die NYHA-Klassifikation bestimmt wird: Je mehr Albumin über den Urin ausgeschieden wird, desto schwerer ist die Herzinsuffizienz (29, 47, 140–143).

Lange Zeit ging man davon aus, dass dies vor allem darauf zurückzuführen ist, dass es gemeinsame Risikofaktoren für beide Krankheitszustände gibt, wie zum Beispiel Hypertonus, Diabetes mellitus, Rauchverhalten oder Hypercholesterinämie (144). Aber große Metanalysen konnten darlegen, dass auch nachdem für andere Risikofaktoren adjustiert wurde, die Zusammenhänge zwischen Albuminurie und kardiovaskulärem Outcome signifikant bleiben. Auch sind diese zusätzlichen Risikofaktoren in Studien oft ähnlich verteilt zwischen den Kohorten mit und ohne Albuminurie (143). Andersherum gibt es viele Menschen, die ohne die genannten Risikofaktoren eine chronische Nierenfunktionsstörung mit Proteinurie aufweisen und auch dann ist ihr Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse ist deutlich erhöht (145). Der Einfluss der Nierengesundheit auf das kardiovaskuläre System ist derart stark, dass Menschen mit einer milden bis moderaten Nierenfunktionsstörung ein höheres Risiko haben, an den Folgen für ihr Herz-Kreislauf-System zu sterben, als jemals dialysepflichtig zu werden. Nur für Patientinnen und Patienten in KDIGO-Stadium 4 überwiegt das Risiko, ESRD zu entwickeln (130, 136, 138, 146–151). Diese Erkenntnis verschiebt den Fokus des Risikomanagements und sie bietet eine weitere Erklärung dafür, dass mit vermehrter Albuminurie auch eine gesteigerte Mortalität und eine geringere Lebenserwartung einhergeht (131, 133, 140, 152–154).

Neben dem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (cardiovascular diseases - CVD) sind auch weitere Organsysteme betroffen. Die herabgesetzte Nierenfunktion geht mit einer Entzündungsreaktion einher, die in die Endothelfunktion eingreift, Thromboembolien und Gefäßkalzifizierungen begünstigt, so sind Patientinnen und Patienten mit CKD besonders susceptibel für Demenzen

und zentralnervöse Ischämien (155). Pathophysiologische Veränderungen der zentralnervösen Gefäße, die mit der Entwicklung einer Demenz einhergehen sind eine Verdickung der Basalmembran, Verlust der Struktur der Perizyten, herabgesetzte Autoregulation der Blut-Hirn-Schranke mit Hyperpermeabilität und erhöhtem oxidativem Stress – ähnliche Vorgänge wie sie auch an der glomerulären Filtrationsbarriere beschrieben wurden (50, 65, 145). Auch für diese zerebrovaskulären Komorbiditäten stellt das Vorhandensein einer Albuminurie einen prädiktiven Faktor da, wie Barzilay et al. Herausfanden. Mit zunehmender Albuminurie steigt auch das Risiko für die Entwicklung von Demenzen vom vaskulären Typ und vom Alzheimer-Typ. Diese Assoziation bleibt auch nach der Adjustierung für kardiovaskuläre und demographische Risikofaktoren statistisch signifikant (145, 156). Sandsmark et al. haben sich der Frage gewidmet, ob die Nierenfunktion mit dem Schlaganfallrisiko assoziiert ist und sie konnten ähnliche Erkenntnisse über die Risikobewertung für betroffene Patientinnen und Patienten gewinnen: Obwohl die eGFR (nach Adjustierung für Confounder) nicht mit einem erhöhten Ischämierisiko vergesellschaftet ist, geht eine Albuminurie > 30 mg/d mit einem signifikant erhöhten Schlaganfallrisiko einher (155).

Es stellt sich also deutlich das organübergreifende Risikoprofil von Patientinnen und Patienten dar, deren Nierenfunktion bereits so weit in die Abwärtsspirale eingetreten ist, dass eine Albuminurie nachweisbar geworden ist. Traditionelle Risikofaktoren wie Hypertonie, Hypercholesterinämie, Insulinresistenz und Übergewicht allein erklären nicht das Ausmaß der vitalen Bedrohung von Patientinnen und Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen. Für ein umfassendes Verständnis der Krankheit und ein verbessertes klinisches Management muss der Fokusbereich daher um ergänzende Risikofaktoren wie oxidativen Stress, Volumenstatus und chronische Entzündungsprozesse, erweitert werden. Ein maßgeblicher Mediator und damit ein prognostisch wie therapeutisch wichtiges Bindeglied ist hierbei das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (157–159).

1.6.1 Pathophysiologische Effekte des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems
Neben seiner Rolle bei der Regulation von Blutdruck und Elektrolythaushalt, ist das RAAS an vielen pathophysiologischen Vorgängen beteiligt. Im Rahmen einer Niereninsuffizienz wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert (159).

- Angiotensin II induziert eine Vasokonstriktion der efferenten Arteriole, der intravasale Druck der glomerulären Kapillaren erhöht sich. Durch den steigenden hydrostatischen Druck kommt es zu einem Verlust der Größenselektivität der glomerulären Filtrationsbarriere. Es gelangen unter Aktivierung des RAAS durch den erhöhten Filtrationsdruck vermehrt Makromoleküle in den Harnraum (38, 49, 160).
- Aber auch unabhängig von der Wirkung als Vasopressor beeinflusst Angiotensin II die Filtration von Albumin an der GFB. So konnten Schießl und Castrop 2013 mittels Multiphotonen-Mikroskopie sichtbar machen, dass der glomeruläre Siebkoeffizient für Albumin sich unter dem Einfluss von Angiotensin auch dann steigert, wenn der renale Perfusionsdruck mittels einer Schlinge konstant gehalten wurde (94, 161, 162)
- Darüber hinaus handelt sich bei Angiotensin II auch um einen Induktor von Entzündungsvorgängen und Fibrosierung. Die Aktivierung des RAAS stimuliert die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), den Transkriptionsfaktoren NF κ B und TGF- β und Zytokinen wie dem IL-6, TNF- α oder ET-1 und weiteren proinflammatorischen Zytokinen (s.o.). So nimmt Angiotensin II eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Verschlechterung von Proteinurie und Nierenversagen ein (49, 101, 125, 138, 163, 164).

Im Rahmen eines metabolischen Syndroms – einer häufigen Komorbidität zu CKD – wird diese Hormonachse noch zusätzlich aktiviert. Das zirkulierende Angiotensin II steigt proportional mit dem Body Mass Index (BMI), der Adipositas und der Insulinresistenz. Außerdem ist Angiotensin II auch direkt am pathologischen kardialen Remodelling im Rahmen der Herzinsuffizienz und -hypertrophie beteiligt, was das kardiovaskuläre Risiko weiter nach oben treibt (12, 163, 165).

Ein starker Hinweis auf die Relevanz der Renin-Angiotensin-Aldosteron-Achse bei der Entstehung und dem Verlauf von CKD ist der therapeutische Erfolg der Behandlung mit RAAS-Inhibitoren wie ACE-Hemmern, Angiotensin-Rezeptor-

Blockern (ARB) und Aldosteron-Antagonisten deren nephroprotektiver Einfluss über die blutdrucksenkende Wirkung hinausgeht (130, 144, 146, 149, 166). Vielmehr scheint sie auf die Reduktion der Albuminurie zurückzuführen zu sein (141, 142). Doch obwohl die Einführung der RAAS-Inhibitoren einen großen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der CKD-Patientinnen und Patienten hatte und die Progression der Erkrankung verlangsamt, kann sie doch nicht komplett verhindert werden (167). Die Therapie der CKD gestaltet sich besonders in fortgeschrittenen Stadien als schwierig und im Endstadium (ESRD) sind die Patientinnen und Patienten abhängig von Nierenersatzverfahren wie Hämodialyse, Hämofiltration oder Organtransplantation. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung verschlechtert sich das Outcome drastisch. Die Mortalitätsraten unter Hämodialyse schwanken zwischen 20 bis 50% innerhalb von zwei Jahren (121).

Es lässt sich also zusammenfassen, dass Menschen mit eingeschränkter Nierenfunktion zu einer Hochrisikogruppe für vaskuläre Ereignisse gehören. Sie sollten besonders aufmerksam dahingehend untersucht werden und vorhandenen Risikofaktoren für das Herz-Kreislauf-System minimiert werden, um eine optimale Versorgung zu garantieren. Im klinischen Alltag zeigt sich jedoch ein anderes Bild. Nur wenige Leitlinien berücksichtigen diese Faktoren und oftmals sind niereninsuffiziente Patientinnen und Patienten in Bezug auf ihre kardiovaskuläre Komorbiditäten unterdiagnostiziert, weil ihre Beschwerden sich untypisch präsentieren oder als Symptome der Niereninsuffizienz abgeschrieben werden (130, 138, 163). Die Aufklärung der betroffenen Patientinnen und Patienten über sekundäre Präventionsmaßnahmen ist oft mangelhaft und auch in der Akutdiagnostik von kardiovaskulären Ereignissen sind niereninsuffiziente Patientinnen und Patienten im Nachteil. So werden Sie – trotz der Neigung zur Hyperkoagulabilität – weniger oft einer Thrombolyse zugeführt und auch der Zugang zu Koronarangiographien wird erschwert, da das verwendete Kontrastmittel renal ausgeschieden wird und die Indikation zurückhaltend gestellt wird, um kontrastmittel-assoziierte Nephropathien zu verhindern (138, 163). Desweiteren werden Patientinnen und Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen meist von klinischen Studien ausgeschlossen, was die Datenlage zu den Behandlungsoptionen weiter verschlechtert (135, 168). Gansevoort et al. prangern die unterdurchschnittliche Behandlung, die CKD-Patientinnen und Patienten im klinischen Alltag zuteilwird als „therapeutischen

Nihilismus“ an und schließen mit der Forderung, CKD-Patientinnen und Patienten stärker in den Fokus zu stellen, um evidenzbasierte Behandlungsstrategien zu entwickeln und die medizinische Versorgung dieser häufig benachteiligten Patientengruppe nachhaltig zu verbessern (138).

1.6.2 Protektion durch Früherkennung

In Anbetracht der unzureichenden Behandlungsoptionen, ist es also umso wichtiger, eine Kompromittierung der Nierenfunktion schnell und zuverlässig zu detektieren, bevor die oben beschriebenen irreversiblen Konsequenzen eintreten (150, 169, 170).

Jedoch gestaltet die Diagnostik sich schwierig: Oftmals geht CKD nicht mit charakteristischen Symptomen einher und häufig verlassen sich Ärztinnen und Ärzte bei der Beurteilung der Nierengesundheit Ihrer Patientinnen und Patienten auf die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) (88, 150). Die eGFR wird mithilfe von Serumkreatinin-konzentration, Alter, Geschlecht und Hautfarbe ermittelt. Hierbei kommen unterschiedliche Formeln zum Einsatz. Eine fehleranfällige und aufwendige 24h-Urin-Sammlung entfällt. Jedoch ist die Aussagekraft der eGFR limitiert und nicht ausreichend, um fundierte klinische Entscheidungen treffen zu können (171). So schließt eine normwertige eGFR eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion nicht aus, da die Serumkreatininkonzentration und die Nierenfunktion nicht in einer linearen, sondern einer hyperbolischen Beziehung zueinanderstehen. Dies hat zur Folge, dass die Serumkreatininkonzentration erst dann als pathologisch auffällt, wenn die Nierenfunktion bereits um mehr als 50% vermindert ist. Man spricht vom Kreatinin-blinden Bereich. Die ermittelte eGFR wird dementsprechend meist überschätzt. Verlässt man sich also auf die eGFR, fallen viele Patientinnen und Patienten erst in einem späteren Krankheitsstadium auf und die Möglichkeiten, präventiv und renoprotektiv einzugreifen, sind nur mehr limitiert (88, 150).

Um die Diagnostik sinnvoll zu ergänzen wird eine Bestimmung der Albuminurie empfohlen (155). In den Leitlinien zu CKD wird eine Urinausscheidung von mehr als 30 mg/d als pathologisch bewertet (70, 153). In den letzten Jahren mehren sich jedoch die Erkenntnisse, dass selbst kleinste Mengen an Albumin im Urin, die mit den herkömmlichen Methoden weder erfasst noch als Albuminurie klassifiziert werden, weitreichende Folgen haben. Blecker et al., Shuvy et al. sowie viele weitere

Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass auch eine Albumin-Ausscheidung von < 30 mg/d im Urin mit einem schlechteren Outcome assoziiert ist. Ihre Daten legen eine lineare Beziehung zwischen Albuminausscheidung im Urin und kardiovaskulärem Risiko sowie Mortalität nahe (140, 141, 157). Blecker et al. sowie Stevens und Levin formulieren daraus die Forderung, dass das „Stufenkonzept“ der Albuminurie – wie es in den Leitlinien verankert ist – abgelöst werden soll, zugunsten einer linearen Risikobewertung des Urin-Albumin-Kreatinin-Quotienten (69, 130, 153, 157).

Die oben beschriebenen Erkenntnisse über die Verschlechterung der Nierenfunktion durch die Proteinurie sowie die Auswirkungen auf das Gefäßsystem bilden die physiologische Erklärung für diese Forderungen. Hervorzuheben sind hierbei drei Probleme, die sich gegenseitig beeinflussen:

- Zum Ersten wird die glomeruläre Problematik zunächst maskiert, da eine Albuminurie erst nachweisbar wird, wenn die Resorptionskapazität des proximalen Tubulus bereits überschritten ist
- Zweitens kommt es durch die Albuminurie und die resultierenden proinflammatorischen und prothrombotischen Reaktionen per se zu progredienten Schäden an der Niere und anderen Organsystemen
- Zum Dritten sind die Möglichkeiten der therapeutischen Interventionen limitiert und die Lebensqualität der CKD-Patientinnen und Patienten ist stark reduziert

(47, 50, 64, 142, 150, 172). Um diesen Problemen im klinischen Alltag begegnen zu können, muss ein neuer Marker etabliert werden, der besser geeignet ist, Nierenschäden frühzeitig zu identifizieren, um gezielte Maßnahmen zu ermöglichen und irreversible Schäden an der Niere und anderen Organsystemen abzuwenden.

2 Fragestellung

2.1 Hintergrund

Chronische Niereninsuffizienz (CKD) betrifft mehr als 10% der Weltbevölkerung und ist mit einer deutlich reduzierten Lebenserwartung verbunden (38, 69, 153). Mit zunehmendem Durchschnittsalter und einer steigenden Prävalenz der Hauptrisikofaktoren – Diabetes mellitus und Hypertonie – wird ein weiterer Anstieg der CKD-Fälle und der damit verbundenen Mortalität erwartet (150). Eine frühzeitige Diagnose ist essenziell, um die Progression der Erkrankung zu verlangsamen und eine renoprotektive Therapie rechtzeitig einzuleiten. Aktuell fehlen jedoch Marker, die glomeruläre Schäden in einem frühen Stadium zuverlässig detektieren können (88, 119, 135).

2.2 Problemstellung

Podozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere. Sie nehmen Albumin über transzytotische Mechanismen auf und geben es teilweise in Form von Vesikeln wieder ab. Dieser Proteintransport wird als Reinigungsfunktion der Podozyten verstanden. Fällt vermehrt Albumin im subpodozytären Raum an, wird dieses auch vermehrt endozytiert. Erleichtert werden diese Vorgänge durch den Einfluss des RAAS (94). Während ein Teil der so entstandenen albuminhaltigen Vesikel in den podozytären Lysosomen abgebaut wird, verlässt ein Großteil des endozytierten Albumins die Podozyten als intakte Vesikel (s.o.) (94). Da die Proteine in Vesikeln durch ihre umgebende Membran vor der Resorption im proximalen Tubulus geschützt sind, könnten diese direkt im Endharn detektiert werden (79). Im Einklang damit stehen Untersuchungen im Tierversuch, die nachweisen, dass etwa 3-10% der im Harn ausgeschiedenen Proteine in Vesikeln vorliegen (94, 173). Nach dem Stand der Literatur liegt es also nahe, dass Albumin-enthaltenden Vesikel im Endharn einen Marker für eine Kompromittierung der glomerulären Filtrationsbarriere darstellen, der frühzeitig nachweisbar wird und nicht erst nachdem die Resorptionskapazität des renalen Tubulussystems überschritten ist. Seit vierzig Jahren ist bekannt, dass Podozyten Makromoleküle in ihr Zytoplasma aufnehmen (174, 175). Bereits 1986 haben Yoshikawa et al. sogenannte Vakuolen in den Podozyten identifiziert, die durch die Endozytose von Plasmaproteinen in die Podozyten entstanden sind. Ihren Beobachtungen nach führte das Vorhandensein solcher Vakuolen zu einem

schlechteren Outcome der betroffenen Patientinnen und Patienten. Trotzdem ist unser Wissen über die Aussagekraft dieser Vesikel sehr limitiert. Erst in den letzten Jahren ist die diagnostische Bedeutung von Vesikeln in den Fokus vieler Arbeitsgruppen gerückt, denn ihre einzigartige Zusammensetzung aus Zytoplasmaproteinen und Oberflächenmolekülen macht sie zu attraktiven Biomarkern. Die Isolation und Analyse von Exosomen werten Urinproben zu einer „flüssigen Biopsie“ auf, die einen exzellenten Einblick in die Gesundheit spezifischer Nierenzellen erlauben (162, 173, 176–179).

2.3 Ziel der Arbeit

Diese Dissertation zielt darauf ab, ein besseres Verständnis für die Rolle von albuminhaltigen Vesikeln im Harn zu entwickeln. Im Einzelnen sollen folgende Hypothesen überprüft werden:

- Wir nehmen an, dass die Erkenntnisse zur Präsenz von albuminhaltigen Vesikeln im Harn aus Tierversuchen auf den Menschen übertragen werden können.
- Wir gehen davon aus, dass die Bestimmung von vesikulärem Albumin bietet einen diagnostischen Mehrwert im Vergleich zur Bestimmung der herkömmlichen Nierenparameter, insbesondere der Bestimmung des freien Albumins im Harn.
- Wir hypothesieren weiterhin, dass albuminhaltige Vesikel einen prognostischen Vorhersagewert hinsichtlich der Progression der Niereninsuffizienz haben.

Durch diese Arbeit soll geklärt werden, ob albuminhaltige Vesikel als Biomarker für eine frühe Kompromittierung der glomerulären Filtrationsbarriere dienen können und wie sie zur Verbesserung der Diagnostik und Prognose von CKD beitragen können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien

Exosomenisolation		
Protease- Phosphatase- Inhibitor Cocktail (100X)	ThermoFisher Scientific, Halt™, enthält EDTA, AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E-64, Leupeptin und Pepstatin A, stabilisiert in Dimethylsulfoxid	Waltham, USA
Elektrophorese und Western Blot		
Lane Marker Reducing Sample Buffer (5X)	ThermoFisher Scientific, Pierce™ 0.3M Tris-HCl, 5% SDS, 50% glycerol, 100mM dithiothreitol (DTT), pink tracking dye	Waltham, USA
Lane Marker Non- Reducing Sample Buffer (5X)	ThermoFisher Scientific; Pierce™ 0.3M Tris-HCl, 5% SDS, 50% glycerol, pink tracking dye	Waltham, USA
Längenstandard	ThermoFisher Scientific; PageRuler™ 62.5 mM Tris-H ₃ PO ₄ (pH 7.5 at 25°C), 1 mM EDTA, 2% SDS, 10 mM DTT, 1 mM NaN ₃ and 33% glycerol	Waltham, USA
Chemilumineszenz Substrat	Advansta; WesternBright Sirius ECL-HRP-Substrat	San Jose, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, 0,1%Ponceau S(w/v) in 5% Essigsäure (v/v)	St. Louis, USA
Puffer		
DPBS	Sigma-Aldrich; Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	St. Louis, USA

Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)	25mM Tris	Sigma-Aldrich, Trizma®-Base, ≥99.9%	St. Louis, USA
	200mM Glycin	Sigma-Aldrich, ≥ 99.7%	St. Louis, USA
	1% SDS	Sigma-Aldrich, ≥98.5	St. Louis, USA
Transferpuffer nach Bjerrum Schafer-Nielsen (Western Blot)	48mM Tris	Sigma-Aldrich, Trizma®-Base, ≥99.9%	St. Louis, USA
	39mM Glycin	Sigma-Aldrich, ≥ 99.7%	St. Louis, USA
	20% Methanol	FisherScientific, ≥99.9%	Loughborough, UK
Waschpuffer (Western Blot)	18,8mM Tris	Sigma-Aldrich, Trizma®-Base, ≥99.9%	St. Louis, USA
	81,2mM TrisHCl	Sigma-Aldrich, Trizma®- Hydrochlorid, ≥99.0%	St. Louis, USA
	0,1M NaCl	Carl Roth GmbH+Co.KG, ≥ 99.5%	Karlsruhe, Deutschland
	2,5mM MgCl ₂ × 6 H ₂ O	Merck KGaA, analytical grade	Darmstadt, Deutschland
	0,05% Tween 20	Bio-Rad Laboratories,	Hercules, USA
Blockierlösung (Western Blot)	4% skim milk powder	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
	96% Waschpuffer	s.o.	s.o.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Reagenzien

3.1.2 Antikörper

Primäre Antikörper		Sekundäre Antikörper	
Anti-mouse Serum Albumin antibody	Abcam (ab19194)	Mouse-anti-goat	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Alix antibody [3A9]	Abcam (ab117600)	mIgGk BP-HRP	Santa Cruz Biotechnology
Anti-CD9 antibody [ERP2949]	Abcam (ab92726)	Goat-anti-Rabbit	ThermoScientific
Anti-CD63 antibody	Abcam (ab1180307)	Goat-anti-Rabbit	ThermoScientific
Anti-Heatshock-Protein-70 antibody [2F7]	ABR Affinity Bioreagents	mIgGk BP-HRP	Santa-Cruz
Anti-Human Serum Nephtrin antibody	Origene (BP5030)	Rabbit-anti-Guinea Pig	Acris
Podocalyxin-like 1 antibody [4F10]	Santa Cruz Biotechnology (sc-23903)	mIgGk BP-HRP	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Human Podocin antibody	IBL (Tecan) (29040)	Goat-anti-Rabbit	ThermoScientific
Anti-Synaptopodin antibody	Santa Cruz Biotechnology (sc-21537)	Mouse-anti-goat	Santa Cruz Biotechnology

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten primären und sekundären Antikörper.

3.1.3 Geräte

Pipetten	GILSON, PIPETMAN® L Fixed-Pipetten	Middleton, USA
Pipettierhelfer	BRAND GMBH + CO KG, accu-jet® pro	Wertheim, Deutschland
Waagen		
	OHAUS; Pioneer™ Precision	Nänikon, Schweiz

Zentrifugen und Rotoren	Eppendorf AG, Centrifuge 5415 R	Hamburg, Deutschland
	Eppendorf AG, Centrifuge 5804 R	Hamburg, Deutschland
	Beckman Optima L-80XP Rotoren: Kontron Festwinkelrotor TFT 70.13 und TFT 55.38	Brea, USA
	Beckman OptimaMax Rotor: Beckman Coulter Festwinkelrotor TLA 55	Brea, USA
Ultrazentrifugations- röhrchen	Beckman Coulter, Centrifuge Bottles Polycarbonate, 70ml, 38x102mm	Brea, USA
	Beckman Coulter, Centrifuge Bottles Polycarbonate, 26,3ml, 25x89mm	Brea, USA
	Beckman Coulter, Centrifuge Bottles Polycarbonate, 10 ml, 16x76mm	Brea, USA
	Beckman Coulter, Microfuge Tube Polypropylen, 1,5ml, 9.5x38mm	Brea, USA
Wasserbad	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Aqua Line AL12	Lauda-Königshofen, Deutschland
Power-Supply	Peqlab; peqPOWER 250V	
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, Criterion™ Cell	Hercules, USA
Blotting-Kammer	Peglab	

Thermomixer	Eppendorf AG, Thermomixer compact	Hamburg, Deutschland
	Analytik Jena AG, TMix	Jena, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, MR Hei-Standard	Schwabach, Deutschland
Imager	Bio-Rad Laboratories, ChemiDoc Imaging System	
Schüttler	neoLab Migge GmbH, Shaker DOS-10L	Heidelberg, Deutschland
Vortex	Bender & Hobein AG; Vortex Genie	Zürich, Schweiz
Osmometer	Gonotec; Osmomat 030 Cryoscopic Osmometer	Berlin, Germany

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Geräte

3.1.4 Software

Microsoft Office 365	Microsoft Word (Version 2411 Build 16.0.18227.20082)	Redmond, USA
Image Lab	Bio-Rad Laboratories; Image Lab 6.1, Software for Windows	Hercules, USA
Statistik-Software	IBM®; SPSS Statistics Version 25	Armonk, USA
Zitier-Software	Swiss Academic Software; Citavi 6	Wädenswil, Schweiz

Tabelle 5: Übersicht über die verwendete Software.

3.1.5 Verbrauchsmaterial

0,5ml Reagiergefäße	SARSTEDT AG&Co; Reagiergefäße 0.5ml, PP	Nümbrecht, Deutschland
1,5ml Reagiergefäße	SARSTEDT AG&Co, Reagiergefäß 1,5ml, PP	Nümbrecht, Deutschland
15ml Reagiergefäße	SARSTEDT AG&Co, Röhre 15ml	Nümbrecht, Deutschland
50ml Reagiergefäße	SARSTEDT, AG&Co, Röhre 50ml	Nümbrecht, Deutschland

Stabpipetten	SARSTEDT AG&Co, Serologische Pipette	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	SARSTEDT AG&Co, Biosphere Filter Tips	Nümbrecht, Deutschland
	Nerbe plus GmbH & Co. KG, Filterspitze PP	Winsen/Luhe, Deutschland
Gele	Bio-Rad Laboratories, 4-15% Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gels	Hercules, USA
Whatman Papier	Whatman™ Global Life Sciences Solutions (Cytiva), Chromatographiepapiere aus Cellulose, 3mm	Marlborough, USA
Nitrocellulosemembran	Bio-Rad Laboratories, 0.45µm	Hercules, USA

Tabelle 6: Übersicht über verwendetes Verbrauchsmaterial

3.2 Methoden

3.2.1 Auswahl der Probandinnen und Probanden

Für diese Arbeit wurden freundlicherweise Urinproben und Daten von 103 zufällig ausgewählten Probandinnen und Probanden der AugUR2-Studie vom Lehrstuhl für Epidemiologie des Universitätsklinikums Regensburg zur Verfügung gestellt. Bei der AugUR-Studie (Altersbezogene Untersuchungen zur Gesundheit der Universität Regensburg) handelt es sich um eine prospektiv angelegte Kohortenstudie zum besseren Verständnis chronischer Erkrankungen im Alter. 1316 Personen haben an der Studie teilgenommen. Die Probandinnen und Probanden sind zufällig ausgewählte Personen, die mindestens 70 Jahre alt, zumeist kaukasischer Herkunft, im Landkreis Regensburg wohnhaft und mobil sind. Die Teilnahme basiert auf Freiwilligkeit (180). Details zu Rekrutierungsprozess und Studiendesign sind bereits publiziert worden (181).

Im Rahmen der AugUR-Studie wurden standardisierte Interviews zu soziodemographischen Faktoren, Lebensqualität und Lebensstil geführt, die Krankengeschichte, aktuelle Diagnosen und Medikation dokumentiert. Außerdem wurde Probenmaterial gesammelt, das Biobanking umfasst Urin-, Serum-, Plasma- und Vollblutproben. Des Weiteren wurden allgemeine, ophthalmologische, kardiovaskuläre und diabetesspezifische klinische Untersuchungen durchgeführt. Der Blutdruck wurde maschinell bestimmt (Omron M10-IT; Omron Healthcare, Kyoto, Japan; Dreifachmessung, Berechnung des Mittelwert aus Messung 2 und 3) (182). Die Arbeitsgruppe um Iris Heid und Klaus Stark hat es sich zum Ziel gesetzt, mit dieser Datenbank die klinische Versorgung älterer Patientinnen und Patienten zu verbessern, indem sie die Ätiologie und den Verlauf chronischer Krankheiten beleuchten, eine Kontrollgruppe für diverse Parameter erstellen sowie Daten zu Prävalenz und Inzidenz von chronischen Krankheiten in dieser Altersgruppe zusammentragen. Denn obwohl diese Altersgruppe den Großteil der hospitalisierten Menschen ausmacht, ist sie in Studien meist unterrepräsentiert (181).

Die Probengewinnung und die standardisierten Interviews fanden im Zeitraum vom 20.09.2019 bis zum 06.11.2019 statt. Bis zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit besteht die AugUR2-Studie aus Baseline-Daten. Es sind Follow-Ups alle drei Jahre geplant.

3.2.2 Exosomenisolation

Die Exosomen wurden mittels Ultrazentrifugation aus dem Urin isoliert, was dem Goldstandard entspricht (162, 183).

Da die Proben bei -80 °C lagerten, wurden sie zunächst schonend im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Für die kommende Osmolaritätsmessung wurden 5 µl der Urinprobe abgenommen.

Das verwendete Probenvolumen aus der AugUR2-Studie betrug 24 ml. Es wurden 240 µl des Protease-Phosphatase-Inhibitors zugefügt. Anschließend wurde bei 3155 g bzw. 4200 rpm für 20 min zentrifugiert, um Zelltrümmer und Debris zu entfernen. 21 ml des geklärten Überstands wurde in Ultrazentrifugationsröhrchen gefüllt und bei 202.400 g bzw. 41.000 rpm für 60 min zentrifugiert. Die Exosomen setzten sich hierdurch als Pellet ab. Der Überstand wurde verworfen. Das gewonnene Pellet wurde in 21 ml PBS resuspendiert und erneut bei 202.400 g bzw. 41.000 rpm für 60 min ultrazentrifugiert. Dies diente als Waschschrift. Wieder sedimentierten die Exosomen. Dieses Pellet wurde in 1,2 ml PBS in Polypropylen-Ultrazentrifugations-gefäße aufgenommen und bei 186.000 g bzw. 55.000 rpm erneut für 60 min zentrifugiert. Nach der dritten Ultrazentrifugation wurde das Pellet in 50µl PBS aufgenommen, der zuvor mit dem Protease-Phosphatase-Inhibitor versetzt worden war. Die Exosomensuspension wurde gevortext sofort bei -80°C eingefroren.

1	20min	Eppendorf Centrifuge 5804 R	3155 g	Abzentrifugation von Zelltrümmern und Debris
2	60min	Beckman Optima L-80XP Rotor TFT 55.38	202.400 g	Ultrazentrifugation zur Isolation der Exosomen
3	60min	Beckman Optima L-80XP Rotor TFT 55.38	202.400 g	Waschschrift
4	60min	Beckman OptimaMax Rotor TLA 55	186.000 g	Ultrazentrifugation zur Konzentration der Exosomensuspension

Tabelle 7: Zusammenfassung des Zentrifugationsprotokolls zur Vesikelisolation aus dem Urin

3.2.3 Osmolaritätsmessung

5 µl des Ausgangsurins wurden aus jeder Urinprobe entnommen und mit 45 µl Reinstwasser verdünnt. Die Osmolaritätsmessung dieser 1:10-Verdünnung erfolgte über die Messung der Gefrierpunktserniedrigung mithilfe des Osmometers (s.o.).

3.2.4 Elektrophorese und Western Blot

3.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts, um sie spezifisch analysieren zu können.

Um die Albumin- und Podocalyxinkonzentration in der eingesetzten Exosomensuspension quantifizieren zu können, wurde eine Protein-Verdünnungsreihe zur Referenz eingeführt: Die ersten vier Spuren jedes Gels dienen als Standardkurve und waren einem Albuminstandard und seinen Verdünnungen vorbehalten. Aus vorbereiteten Albuminlösungen wurden je 10 µl in die Spuren 1-4 des Gels aufgetragen und mit weiteren 8 µl Nuklease-freiem Wasser auf 18 µl Volumen aufgefüllt.

Spur 1	10 µl + 8 µl H ₂ O	1:1 unverdünnt
Spur 2	10 µl + 8 µl H ₂ O	1:3 Verdünnung
Spur 3	10 µl + 8 µl H ₂ O	1:6 Verdünnung
Spur 4	10 µl + 8 µl H ₂ O	1:12 Verdünnung

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Albumin-Verdünnungen im Western Blot

Diese dienen der internen Qualitätskontrolle der Blots und wurden als Referenz für die relative Quantifikation der Albumin- und Podocalyxinkonzentrationen der Exosomenisolate verwendet (s.u.).

Aus den wie oben beschrieben gewonnen Exosomensuspensionen wurden 18 µl entnommen. Alle Proben wurden mit jeweils 6 µl des 5X Reducing Sample Buffer sowie des 5X Non-Reducing Sample Buffer versetzt, um die finale Konzentration von 2% Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) in den Proben zu erhalten, die notwendig ist, um die Exosomen zu denaturieren und den Inhalt vollständig freizusetzen. Die so präparierten Proben wurden für 15 min bei 800 rpm und 56 °C in den Thermomixer gestellt und anschließend kurz abzentrifugiert. Auch 5 µl des PageRuler™-Längenstandards wurden mit 25 µl Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt, um den Exosomensuspensionen und den Referenzproben im Volumen zu

entsprechen. Die Geltaschen wurden mit dem Längenstandard sowie den Proben beladen und die elektrische Spannung angelegt. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgt anhand ihres Molekulargewichts. Die Agarosegradierung des Gels ermöglichte eine besonders zuverlässige Separation.

1	30 min	Konstante Stromstärke: 30 mA; ca. 40V
2	60 min	Konstante Stromstärke: 70 mA; ca. 80V

Tabelle 9: Protokoll der verwendeten Dauer, Stromstärken und -spannungen für die Gelelektrophorese

3.2.4.2 Western Blot

Der Western Blot dient dem Proteintransfer aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran, um eine spezifische Detektion der Proteine zu ermöglichen. Dazu wurden je Gel vier Lagen Whatman-Papier und eine Membran in methanolhaltigem Transferpuffer (s.o.) getränkt. Zwischen den zwei Doppellagen Whatman-Papier befanden sich Membran und Gel, alle Komponenten wurden ohne Luft einschlüsse aufeinander platziert. Die Membran befand sich anodenseitig im Tank. Der Transfer der negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran wurde durch das Anlegen der elektrischen Spannung gestartet.

105 min	Konstante Stromstärke: 150 mA pro Membran, entspricht $1.5 \text{ mA/cm}^2 \times (13,5 \text{ cm} \times 7,5 \text{ cm})$
---------	--

Tabelle 10: Protokoll der verwendeten Dauer, Stromstärke und -spannung für den Western Blot

Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran bei Raumtemperatur 2 h unter Agitation in Blockierlösung (s.o.) platziert, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verhindern. Anschließend wurden die in Blockierlösung verdünnten primären Antikörper auf die Membran aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen im Abstand von je 5 min mit Waschpuffer (s.o.) wurde der sekundäre Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, in Blockierlösung verdünnt aufgetragen und lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Erneut wurde sechs Mal gewaschen. Das 2-Komponenten-Lumineszenz-Substrat wurde erst unmittelbar vor der Verwendung angemischt und gleichmäßig auf die zu belichtende Membran aufgetragen. Nach 2-minütiger Inkubationszeit ohne Lichteinwirkung konnte das Bild im ChemiDoc Imager (s.o.) entwickelt werden.

3.2.5 Proteinquantifizierung mit Image Lab

Mithilfe des Programms Image Lab (Bio-Rad) wurden die aus den Western Blot resultierten spezifischen Banden der Albumin-Standardreihe sowie der Exosomen-Proben ausgewählt und densitometrisch analysiert.

Anhand der eingegebenen internen Albuminstandard konnte die Qualität des Blots kontrolliert werden. Es wurden nur solche Blots in die Analyse eingeschlossen, die alle vier Referenzbanden klar abbildeten und deren gemessene Intensitäten den eingegebenen Verdünnungen entsprachen. Die Intensitäten der Albumin-Standardreihe wurden errechnet und mit Ihrer Hilfe die Albuminmenge der verbleibenden Banden relativ zur Referenzbande bestimmt. Die Vorversuche hatten ergeben, dass die Bande in Spur 1 (= Unverdünnter Albuminstandard) in ihrer gemessenen Intensität am konstantesten war, weshalb sie als Referenzbande (Intensität = 1.00) für die zu messenden Exosomenisolate dient. Proben, deren Albuminbanden in ihrer Intensität außerhalb des linearen Bereichs der Eichkurve lagen, wurden verdünnt und erneut geblottet.

Auf dieselbe Art wurde auch Podocalyxin quantifiziert. Hier diente ebenfalls die Albuminbande in Spur 1 als Referenzbande mit dem Wert 1.00.

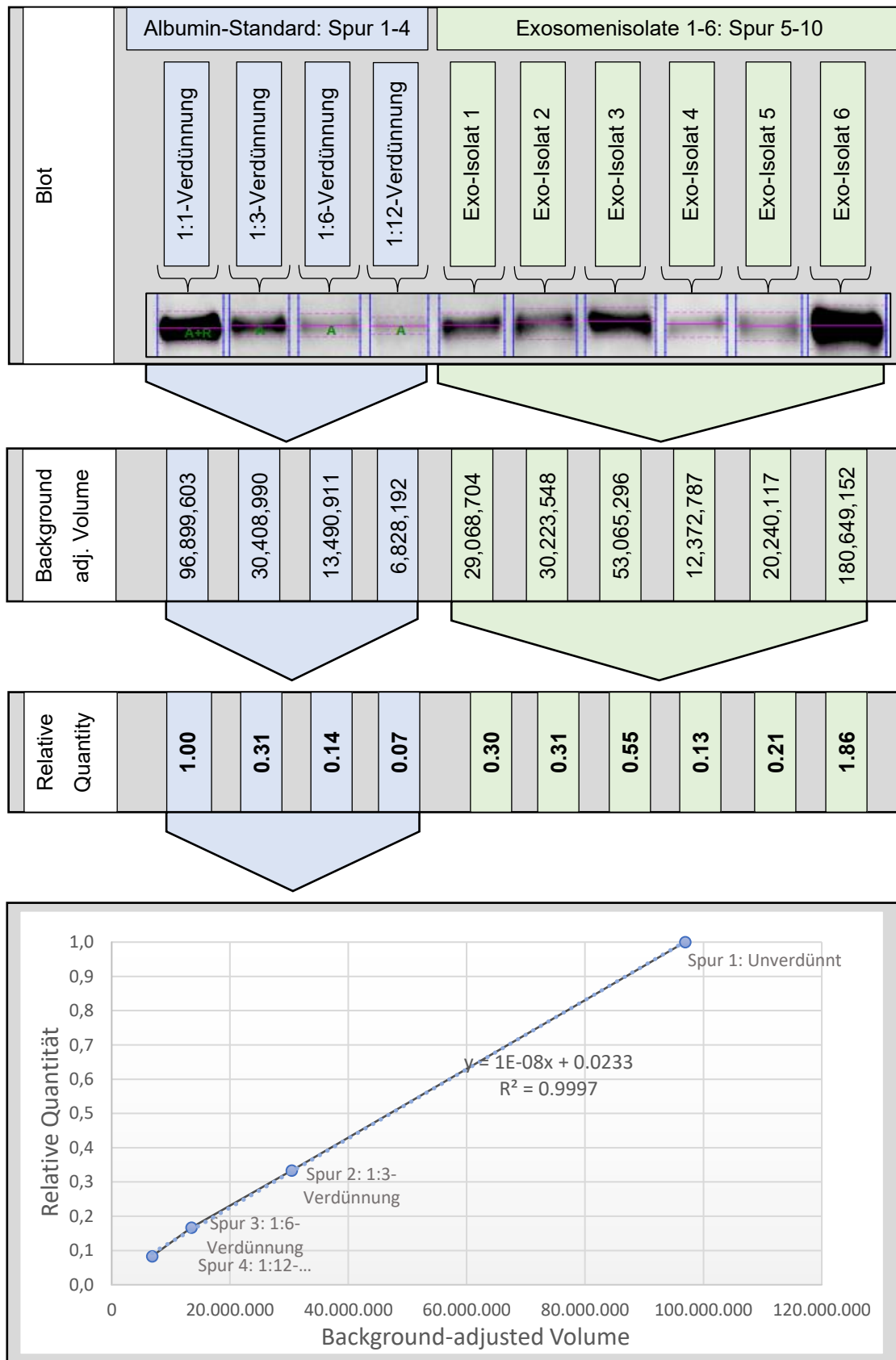


Abbildung 6: Proteinquantifizierung mit Image Lab anhand eines Beispiel-Western Blots
Zunächst werden die Banden der einzelnen Spuren ausgewählt und ihr Volumen bestimmt, der Hintergrundwert wird abgezogen, dann wird anhand der Albuminstandardreihe die Qualität des Western Blots kontrolliert, es werden nur solche Western Blot in die Analyse miteinbezogen, auf denen alle 4 Referenzbanden klar erkennbar sind und die aufgetragene Proteinmenge der Verdünnungsreihe mit der densitometrischen Messung übereinstimmt – die Bande in Spur 1 dient als Referenzmessung, ihre Intensität wird gleich 1.00 gesetzt und die Intensitäten der restlichen Banden berechnen sich relativ zu ihr, liegen die errechneten Werte außerhalb des linearen Bereichs der Eichkurve (in diesem Beispiel: Exosomenisolat 6) werden die Proben verdünnt und erneut geblottet

4 Ergebnisse

4.1 Methodische Vorarbeiten

4.1.1 Charakterisierung der Vesikel

Die nach dem oben beschriebenen Protokoll gewonnenen Exosomensuspensionen wurden untersucht: Mithilfe von Western Blots wurden Exosomenmarker, Podozytenmarker sowie Albumingehalt der Exosomensuspension sowie dem korrespondierenden Vollurin nachgewiesen.

4.1.1.1 Exosomenmarker

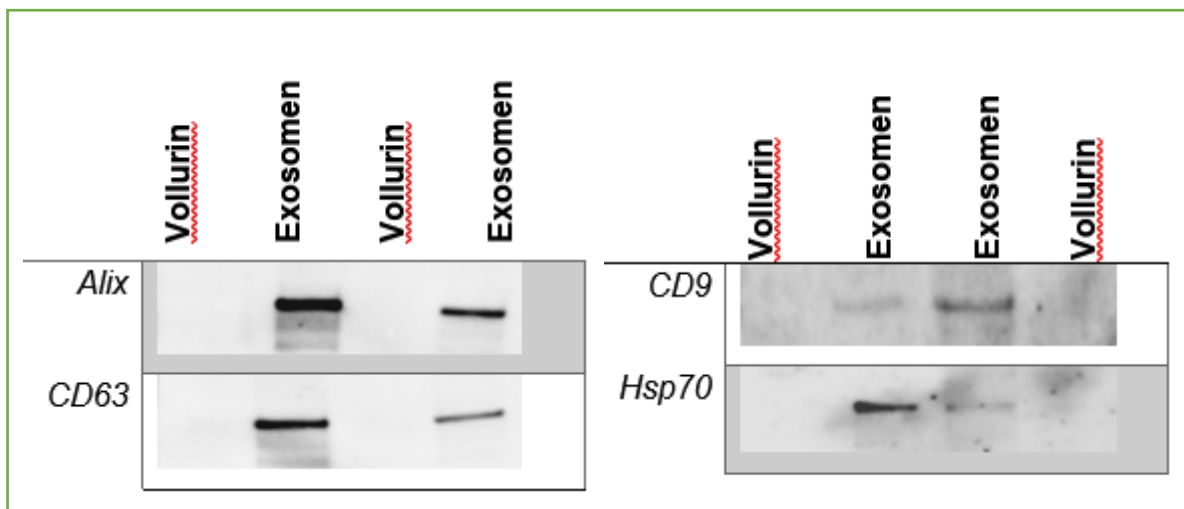


Abbildung 7: Nachweis der Exosomenmarker im Western Blot
Abgebildet sind die Banden für die Exosomenmarker Alix (Anti-Alix antibody [3A9] (ab117600)), CD9 (Anti-CD9 antibody [ERP2949] (ab92726)), CD63 (Anti-CD63 antibody (ab1180307)) und Hsp70 (Anti-Heatshock-Protein-70 antibody [2F7] (ABR Affinity Bioreagents)) – der Nachweis spezifischer Banden für Exosomen-Markerproteine gelang nur in den Exosomensuspensionen, in den Spuren des korrespondierenden Vollurins sind keine Banden sichtbar

Es gelang der Nachweis vieler verschiedener Exosomenmarker in den Suspensionen, nicht jedoch im korrespondierenden Vollurin.

4.1.1.2 Podozytenmarker

Es gelang der Nachweis vieler verschiedener podozytenspezifischer Markerproteine in der Exosomensuspension, nicht jedoch im korrespondierenden Vollurin.

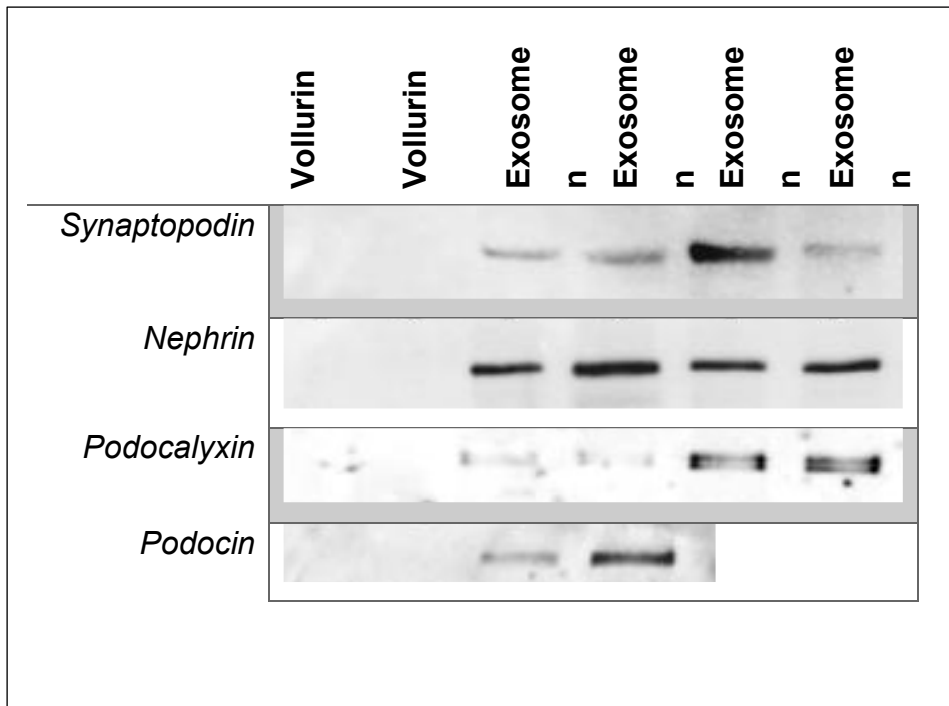


Abbildung 8: Nachweis der Podozytenmarker im Western Blot

Abgebildet sind die spezifischen Banden für die Podozyten-Markerproteine Synaptopodin, Nephrin, Podocalyxin und Podocin.

4.1.1.3 Albumin

Der Nachweis von Albumin gelingt sowohl in der Exosomensuspension als auch im korrespondierenden Vollurin.

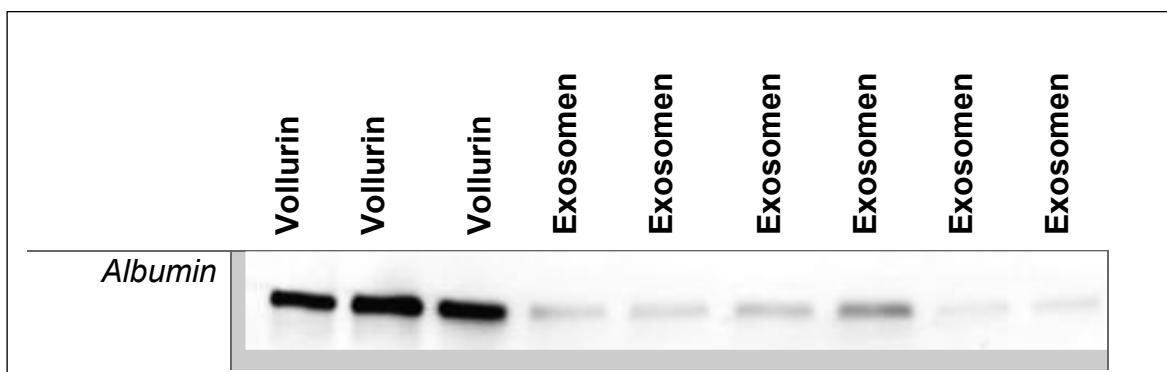


Abbildung 9: Nachweis von Albumin im Western Blot

Abgebildet sind die Banden für Albumin. Sowohl in den Exosomensuspensionen als auch im korrespondierenden Vollurin zeigen sich spezifische Banden

4.2 AugUR2-Kohorte

4.2.1 Geschlechterverteilung

Bei den 103 Probandinnen und Probanden handelt es sich um 45 Männer (43,7%) und 58 Frauen (56,3%).

4.2.2 Altersverteilung

Die Probandinnen und Probanden waren zum Zeitpunkt der Untersuchung zwischen 72 und 93 Jahren alt. Das mittlere Alter beträgt 79,95 Jahre mit einer Standardabweichung von 4,53 Jahren und der Median der Altersverteilung liegt bei 79,22 Jahren. Es gibt innerhalb der Kohorte keine signifikanten Unterschiede bei der Altersverteilung zwischen Männern und Frauen ($80,84 \pm 4,87$ bzw. $79,27 \pm 4,16$).

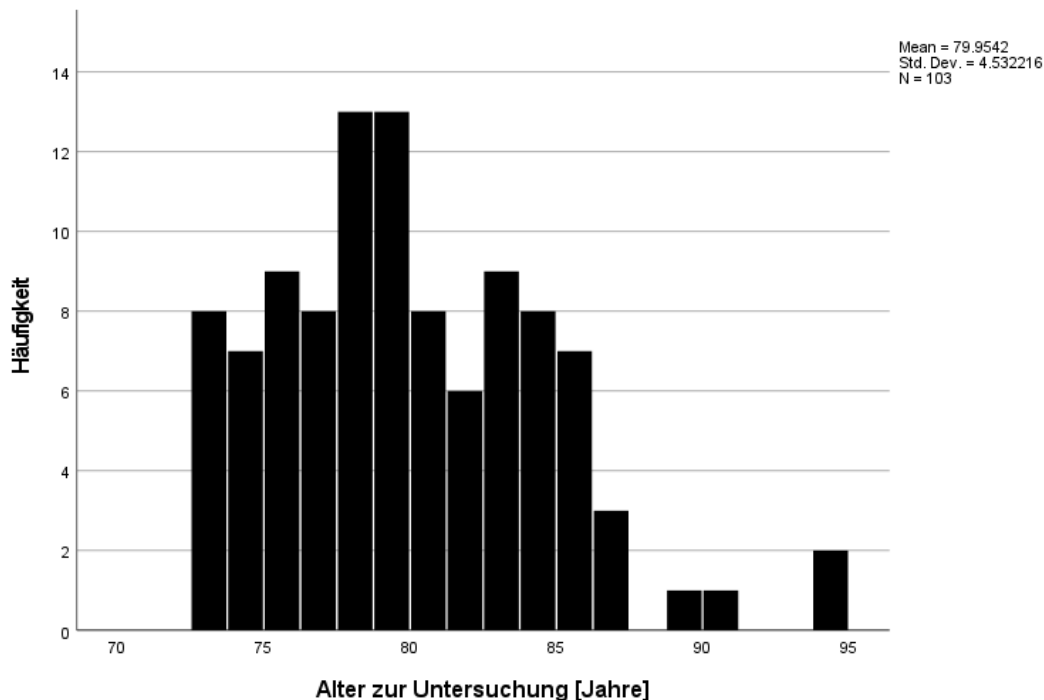


Abbildung 10: Histogramm der Altersverteilung der AugUR2-Kohorte

4.2.3 Vorerkrankungen in der Kohorte

77 Probandinnen und Probanden (74,8%) – 36 Männer (80,0% der Männer) und 41 Frauen (70,7% der Frauen) – geben an, unter Bluthochdruck zu leiden. 22 Probandinnen und Probanden (21,4%) – 14 Männer (31,3%) und 8 Frauen (13,8%) – geben eine Herzinsuffizienz an und 17 Probandinnen und Probanden (16,5%), davon 9 Männer (20,0%) und 8 Frauen (13,8%), geben an, mit Diabetes mellitus diagnostiziert worden zu sein.

Merkmal	Frauen (n=58)	Männer (n=45)
Alter [Jahre] (MW $\pm$ σ)	79,27 $\pm$ 4,16	80,84 $\pm$ 4,87
Body Mass Index [kg/m ²] (MW $\pm$ σ)	26,87 $\pm$ 4,24	27,57 $\pm$ 3,26
Waist-to-hip Ratio (MW $\pm$ σ)	0,86 $\pm$ 0,07	0,99 $\pm$ 0,07
Prävalenz Diabetes (%)	8 (13,8%)	9 (20,0%)
HbA1c [%] (MW $\pm$ σ)	5,65% $\pm$ 0,59	5,69 $\pm$ 0,58
HbA1c > 6,5% (%)	3 (5,2%)	5 ^a (11,1%)
Prävalenz Hypertonie (%)	41 (70,7%)	36 (80,0%)
Systol. Blutdruck [mmHg]	129,62 $\pm$ 17,65	132,36 $\pm$ 17,77
Diastol. Blutdruck [mmHg]	76,13 $\pm$ 9,61	72,77 $\pm$ 10,65
Prävalenz Herzinsuffizienz (%)	8 (13,8%)	14 (31,3%)
Aktive Raucherinnen und Raucher (%)	2 (3,4%)	1 (2,2%)

*Tabelle 11: Übersicht über die Verteilung von Risikofaktoren und Vorerkrankungen innerhalb der Kohorte
MW = Mittelwert, σ = Standardabweichung, ^a Einer der 5 Probanden erfüllt mit einem HbA1c-Anteil von > 6,5% die diagnostischen Kriterien eines Diabetes mellitus, ohne dies bei seinen Vorerkrankungen genannt zu haben (s. 4.2.4)*

Die Verteilung von Risikofaktoren innerhalb der Kohorte entspricht mit Ausnahme des geringen Anteils an Raucherinnen und Rauchern dem Durchschnitt in dieser Altersklasse (184).

4.2.4 Nierengesundheit in der Kohorte

30 Probandinnen und Probanden (29,1%) – 13 Männer (28,9%) und 17 Frauen (29,3%) – geben an, eine Nierenerkrankung zu haben. Davon geben 12 Probandinnen und Probanden (11,7%) – 8 Männer (17,8%) und 4 Frauen (6,9%) – an, unter Nierensteinen zu leiden. Bei 5 Probandinnen und Probanden (4,9%) – 1 Mann (2,2%) und 4 Frauen (6,9%) – lägen Nierenzysten vor. 3 Probandinnen und Probanden (2,9%) – 1 Mann (2,2%) und 2 Frauen (3,4%) – haben eine Nierenschwäche angegeben. Für die restlichen Fälle ist die Nierenerkrankung nicht genauer spezifiziert. Niemand in der Kohorte gab an, dialysepflichtig zu sein.

Merkmal	Frauen (n=58)	Männer (n=45)
Nierenerkrankung ^a	17 (29,3%)	13 (28,9%)
Nierensteine ^a	4 (6,9%)	8 (17,8%)
Nierenzysten ^a	4 (6,9%)	1 (2,2%)
Nierenschwäche ^a	2 (3,4%)	1 (2,2%)

*Tabelle 12: Übersicht über Parameter der Nierengesundheit innerhalb der Kohorte
^a Daten beruhen auf den Selbstangaben der Probandinnen und Probanden*

Die angegebenen Prävalenzen beruhen auf den Selbstangaben der Probandinnen und Probanden. Sie dienen dazu, einen Überblick über den Gesundheitszustand der Kohorte zu erlangen und die Repräsentativität der Stichprobe und damit die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf die Allgemeinheit zu sichern. Selbstangaben sind jedoch keine unproblematischen Items. Probandinnen und Probanden vergessen oder verwechseln ihre Diagnosen, missinterpretieren Aussagen ihrer behandelnden Ärztinnen und Ärzte oder antworten sozial erwünscht. Deshalb kann es zu erheblichen Unterschieden zwischen den berichteten Diagnosen und dem tatsächlichen Gesundheitszustand kommen. Steinkirchner et al. haben sich in ihrer Forschung mit der Übereinstimmung von Selbsteinschätzung und ärztlich dokumentierten Diagnosen innerhalb der AugUR-Kohorte beschäftigt und herausgefunden, dass insbesondere bei symptomarmen Krankheitsbildern wie Bluthochdruck oder Nierenerkrankungen erhebliche Differenzen vorliegen (180). Aus diesem Grund beruhen die weiteren Berechnungen und statistischen Berechnungen ausschließlich auf messbaren Laborparametern.

Auf der Basis des Serumkreatininwerts wird nach der CKD-EPI-Formel (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) von 2017 die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate berechnet.

$$eGFR_{cr} = 141 \times \min(S_{cr}/\kappa, 1)^\alpha \times \max(S_{cr}/\kappa, 1)^{-1,209} \times 0.993^{Alter}$$

Bei Frauen wird zusätzlich mit 1,018 multipliziert, bei schwarzer Hautfarbe mit 1,159

S_{cr} = Serumkreatinin [mg/dL]

κ = geschlechtsabhängiger Faktor $\kappa = 0.7$ (Frauen) bzw. 0.9 (Männer)

α = geschlechtsabhängiger Faktor $\alpha = -0.241$ (Frauen) bzw. -0.302 (Männer)

$\min(S_{cr}/\kappa, 1)$ = Minimum von S_{cr}/κ oder 1

$\max(S_{cr}/\kappa, 1)$ Maximum von S_{cr}/κ oder 1

Alter = Lebensalter [Jahre]

Formel 2: Berechnung der eGFR nach der CKD-EPI-Formel von 2017

Der Mittelwert liegt bei 65,96 ml/min/1.73m² mit einer Standardabweichung von 16,46. Der niedrigste berechnete Wert ist 9,89 ml/min/1.73m², der höchste ist 92,48 ml/min/1.73m². In 2 Fällen (1,9%) liegt die eGFR bei über 90 ml/min/1.73m². Der Großteil der Kohorte wies eine eGFR zwischen 60 und 89 ml/min/1,73m² auf (65 Personen, 63,1%). In 30 Fällen (29,1%) liegt die eGFR zwischen 30 und 59 ml/min/1,73m². 2 Personen (1,9%) haben eine mit 15-29 ml/min/1.73m² stark

verminderte eGFR und 1 Mann (1,0%) erfüllt die Kriterien der terminalen Niereninsuffizienz mit einer eGFR von unter 15 ml/min/1.73m².

Im Urin werden die Albumin- und Kreatininkonzentrationen bestimmt. Die Albumin-Kreatinin-Ratio wird berechnet. Auch hier ist eine die Spannweite groß. Die ACR-Werte reichen von < 5 mg/g (unterhalb der Nachweisgrenze) bis 662,94 mg/g (Makroalbuminurie). Der Median liegt bei 14,64 mg/g, der Mittelwert bei 49,82 mg/g mit einer Standardabweichung von 108,87. Der Großteil der Probandinnen und Probanden (74 Personen, 71,8%) weisen eine ACR < 30 mg/g auf, was normalen bis leicht erhöhten Werten entspricht. 26 Personen (25,2%) fallen in das KDIGO Stadium A2 mit ACR-Werten von 30 bis 300 mg/g. 3 Männer (2,9%) fallen mit hochpathologischen Werten > 300 mg/g auf.

Merkmal			Frauen (n=58)	Männer (n=45)
Serum-Kreatinin [mg/dl] (MW ± σ)			0,87 ± 0,26	1,18 ± 0,67
eGFR [CKD-EPI; ml/min/1,73m ²] (MW ± σ)			66,62 ± 15,87	65,13 ± 17,34
Albumin-Kreatinin-Ratio [mg/g] (MW ± σ)			32,80 ± 52,16	71,78 ± 151,91
Stadium 1	Normal bis leicht erhöht	< 30	42 (72,4%)	32 (71,1%)
Stadium 2	Mikroalbuminurie	30-300	16 (27,6%)	10 (22,2%)
Stadium 3	Makroalbuminurie	> 300	0 (0,0%)	3 (6,7%)
Prävalenz CKD ^a (%)			26 (44,8%)	21 (46,7%)
Stadium 1	Normale/erhöhte eGFR	≥ 90	1 (1,7%)	1 (2,2%)
Stadium 2	Leicht verminderte eGFR	60-89	38 (65,5%)	27 (60,0%)
Stadium 3a	Mäßig verminderte eGFR	45-59	11 (19,0%)	12 (26,3%)
Stadium 3b	Mäßig verminderte eGFR	30-44	5 (8,6%)	2 (4,5%)
Stadium 4	Stark verminderte eGFR	15-29	1 (1,7%)	1 (2,3%)
Stadium 5	Terminale Niereninsuffizienz	< 15	0 (0,0%)	1 (2,3%)

Tabelle 13: Übersicht über Parameter der Nierengesundheit innerhalb der Kohorte

MW = Mittelwert, σ = Standardabweichung, ^a Definition CKD nach KDIGO: ACR > 30mg/g oder eGFR < 60 ml/min/1.73m²

Die eGFR ist zwischen den Geschlechtern gleich verteilt, das beruht auf der geschlechtsadaptierten Berechnung der eGFR (s.o.), denn die Serum-Kreatininkonzentration ist sehr wohl unterschiedlich zwischen Männern und Frauen. Kreatinin ist ein Metabolit des Muskelstoffwechsels. Da Männer durchschnittlich eine größere Muskelmasse aufweisen als Frauen, haben sie im Durchschnitt auch höhere

Serumkreatinin-Werte. Das zeigt sich auch in unserer Kohorte: Der Mittelwert ($\pm$ Standardfehler des Mittelwerts) beträgt $1,18 \pm 0,101$ mg/dl (Männer) verglichen mit $0,87 \pm 0,035$ mg/dl (Frauen) (185, 186).

Insgesamt lassen sich im Hinblick auf die Nierenfunktionsparameter weitere geschlechtsspezifische Unterschiede feststellen: Die männlichen Probanden scheiden im Mittel ($\pm$ Standardfehler des Mittelwerts) signifikant mehr Albumin mit dem Urin aus als die weiblichen Probandinnen ($65,53 \pm 20,69$ mg/l verglichen mit $17,81 \pm 4,70$ mg/l). Die Kreatininkonzentration ist auch im Urin und nicht nur im Serum bei den männlichen Studienteilnehmern höher als bei den weiblichen Teilnehmerinnen ($1049,29 \pm 91,22$ mg/l verglichen mit $647,84 \pm 65,02$ mg/l). Trotz dieser Unterschiede ist die Albumin-Kreatinin-Ratio im Urin der männlichen Probanden signifikant erhöht im Vergleich zur weiblichen Studienpopulation ($73,03 \pm 22,65$ mg/g verglichen mit $33,53 \pm 6,85$ mg/g).

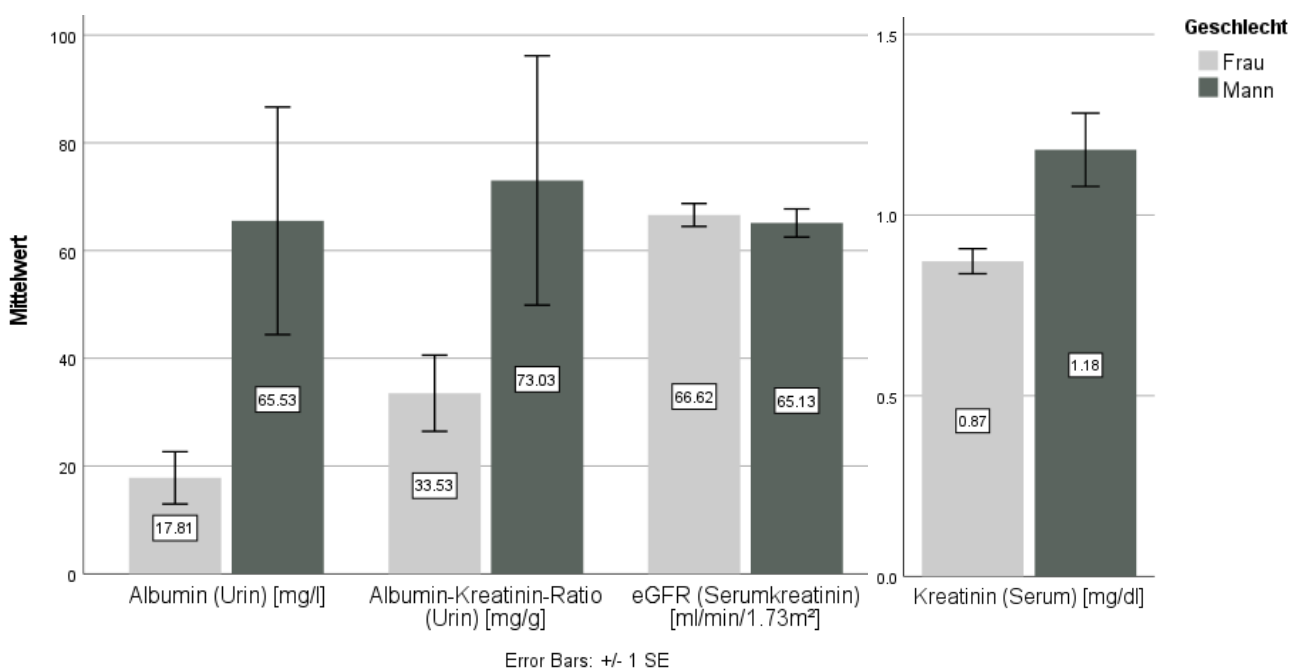


Abbildung 11: Geschlechtsabhängige Unterschiede der etablierten Nierenparameter
Es gibt Unterschiede in der Albuminkonzentration im Urin und der Albumin-Kreatinin-Ratio zwischen den Geschlechtern – hier haben die Männer höhere Werte als die Frauen, die Serumkreatininkonzentration ist bei den männlichen Probanden höher als bei den weiblichen Probandinnen, die berechnete eGFR beruht auf diesen Serumkreatinin-Werten, die Formel zur Berechnung ist jedoch geschlechtsspezifisch (s.o.) und es zeigen sich keine systematischen Abweichungen zwischen männlichen und weiblichen Teilnehmenden

Um den Volumenhaushalt des Körpers an die variable Flüssigkeitszufuhr anzupassen, kann die Urinkonzentration stark variieren. Um den Körper vor einer

Volumenüberladung zu schützen, kann durch stark verdünnten Urin maximal entwässert werden. In Durstsituationen wiederum kann ein stark konzentrierter Urin ausgeschieden werden, um dem Körper möglichst wenig Flüssigkeit zu entziehen und dennoch harnpflichtige Substanzen ausscheiden zu können (187, 188).

Die Kreatininkonzentration im Urin wird als Parameter zur Abschätzung der Urinkonzentration herangezogen, da Kreatinin mit gleichmäßiger Rate filtriert und sezerniert wird. Ein weiterer Konzentrationsparameter ist die Urin-Osmolarität, die die Anzahl der osmotisch wirksamen Teilchen im Urin anzeigt. Neben der Kreatininkonzentration im Urin ist auch die Urinosmolarität mit einem Mittelwert ($\pm$ Standardfehler des Mittelwerts) von 625,78 ($\pm$ 34,03) mosmol/l in der männlichen Studienpopulation im Vergleich zu 504,14 ($\pm$ 29,11) mosmol/l unter den weiblichen Probandinnen erhöht.

Obwohl innerhalb der Teilgruppen die Urinosmolarität eine große Varianz aufweist, zeigt sich deutlich, dass die männlichen Studienteilnehmer eine höhere Urinkonzentration aufweisen als die weiblichen Studienteilnehmerinnen. Die Unterschiede in der Konzentrierung des Harns in Abhängigkeit vom Geschlecht, die in unserer Studienpopulation nachweisbar sind, stehen im Einklang mit vielen weiteren wissenschaftlichen Arbeiten (189).

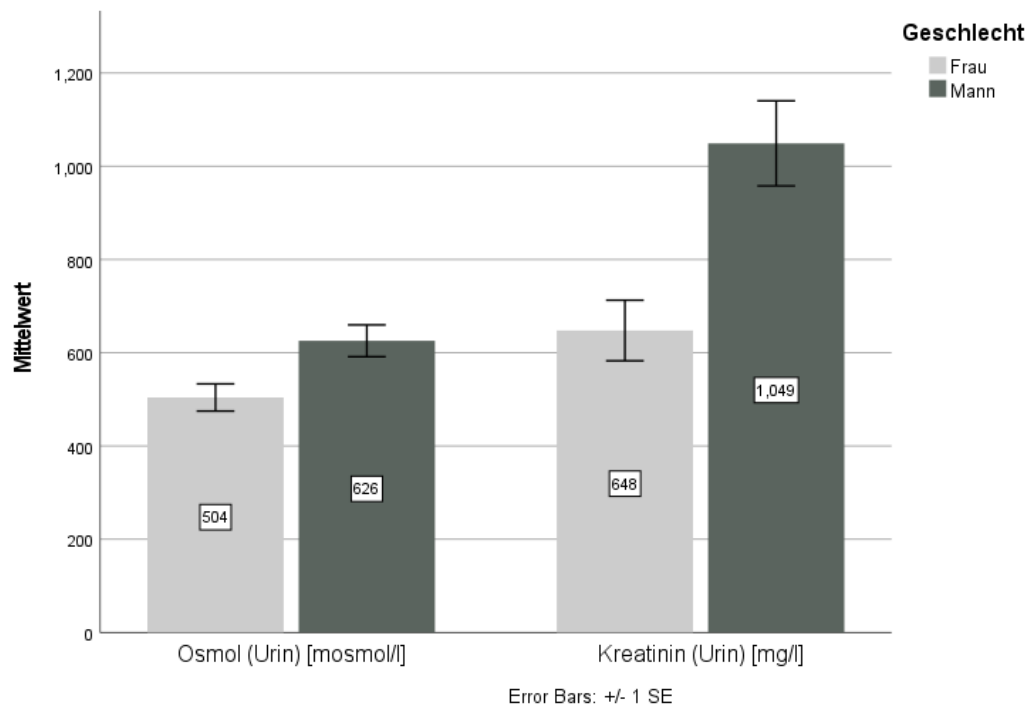


Abbildung 12: Geschlechtsabhängige Unterschiede in der Urinkonzentration
Der Urin der männlichen Probanden ist signifikant stärker konzentriert als der der weiblichen Probandinnen

4.3 Ergebnisse der Vesikelanalyse der AugUR-Studie

4.3.1 Vesikuläres Albumin und Podocalyxin

Die albuminhaltigen Vesikel sind von einer Plasmamembran umgeben, die den Podozyten entstammt. In der lysierten Exosomensuspension ist also auch das podozytäre Protein Podocalyxin nachweisbar (s.o.). Albumin und Podocalyxin werden, wie unter 3.2.5 beschrieben, relativ zu einem internen Proteinstandard quantifiziert.

Die ermittelten Werte variieren von 0,0 (keine Bande sichtbar) bis 10,62 für Albumin (Vesikel) und von 0,0 (keine Bande sichtbar) bis 48,99 für Podocalyxin (Vesikel).

	<i>Albumin (Vesikel)</i>	<i>Podocalyxin (Vesikel)</i>
Mittelwert	1,42	2,64
Median	0,76	0,14
Standardabweichung σ	1,92	7,80

Tabelle 14: Statistische Verteilung der vesikulären Biomarker Albumin (Vesikel) und Podocalyxin (Vesikel)

Es handelt sich hierbei um relative, nicht um absolute Zahlen. Der Abstand zum Nullpunkt ist nicht genau definiert. Eine Normalverteilung kann nicht angenommen werden. Statistische Berechnung von relativen Zahlen, die nicht normalverteilt sind, erfordern spezielle Methoden und Ansätze.

1. **Datenvisualisierung:** Visualisierung der Daten durch Histogramme, Q-Q-Blots oder Boxplots sind nützliche Werkzeuge bei explorativen statistischen Analysen, um zu überprüfen, ob Daten einer bestimmten Verteilung entsprechen und um Abweichungen von der Annahme aufzudecken. Ein Verständnis der Verteilungseigenschaften ist die Voraussetzung für die Auswahl einer geeigneten Analysemethode.
2. **Ausreißer-robuste Statistik:** Eine Methode, Schätzungen und Tests weniger anfällig gegenüber Verletzungen der Verteilungsannahme sowie Ausreißern zu machen sind das Rechnen mit Rangkorrelationskoeffizienten und Median.
3. **Nichtparametrische Test:** Nichtparametrische Tests beruhen nicht auf bestimmten Verteilungsannahmen und können deshalb auch bei nicht-normalverteilten Daten belastbare Ergebnisse liefern.
4. **Datentransformationen:** Transformationen wie Logarithmieren oder Anwendung von Exponentialfunktionen bieten die Möglichkeit, Daten an eine Normalverteilung anzupassen.

Es ist wichtig zu beachten, dass die Wahl der geeigneten Methode stark von der Art der Daten und den Zielen der Analyse abhängt. In einigen Fällen kann es erforderlich sein, die Daten zu transformieren, um sich der Normalverteilung anzunähern, während in anderen Fällen nichtparametrische oder robuste Methoden zur Analyse verwendet werden. Die geeignete Methode muss den spezifischen Anforderungen des Problems gerecht werden. Dieser Arbeit liegen nichtparametrische Methoden zugrunde, die Zusammenhänge zwischen Variablen beschreiben, ohne auf der Annahme linearer Beziehungen zu beruhen. Wichtige verwendete statistische Testverfahren sind:

1. **Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test:** Der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test wird verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen festzustellen. Er basiert auf Rangbildung der Werte und Summenvergleich beider Stichproben. Wenn der Test signifikant ist, wird die Nullhypothese abgelehnt und geschlossen, dass es signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gibt.
2. **Kruskal-Wallis-Test:** Auch beim Test nach Kruskal-Wallis werden Rangsummenvergleiche bemüht, allerdings um Unterschiede zwischen drei oder mehr Stichproben festzustellen.

3. Spearman-Korrelationskoeffizient: Der Spearman-Korrelationskoeffizient (ρ) bewertet die Stärke und Richtung des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen. Die Daten werden ebenfalls in Rangreihen umgedeutet und die Berechnung des Korrelationskoeffizienten basiert auf den Rangzahlen der Daten anstelle der eigentlichen Werte. Dieser Test eignet sich besonders, wenn die Beziehung zwischen den Variablen monoton, aber nicht notwendigerweise linear ist.
4. Kendall's Tau Korrelation: Der Kendall-Korrelationskoeffizient τ ist ein weiterer Rangkorrelationskoeffizient, der die Richtung und Stärke des Zusammenhangs zwischen Variablen bewertet. Er basiert auf den Paar-Rangzahlen und ist robust gegen Ausreißer und extreme Werte.

Beide Korrelationskoeffizienten geben Richtung und Stärke eines statistischen Zusammenhangs an. Sie können Werte zwischen -1 und +1 annehmen, wobei -1 einem perfekten negativen Zusammenhang entsprechen würde und +1 einem perfekten positiven Zusammenhang. Zur Beurteilung der Effektstärke kann man sich an der Einteilung nach Jacob Cohen (1988, 1992) orientieren.

- 0.10 – 0.30 entspricht einem schwachen Effekt
- 0.30 – 0.50 entspricht einem mittelstarken Effekt
- > 0.50 entspricht einem starken Effekt

(190, 191)

Allerdings wird diese Einteilung häufig kritisiert, da Effektstärken > 0,5 in der Realität in weniger als 3% der Fälle zu erwarten sind (Gignac und Szodorai 2016, S. 75).

James Hemphill hatte deswegen 2003 in einer Meta-Analyse neue Grenzwerte für die Beurteilung der Effektstärke vorgeschlagen:

- < 0.20 entspricht einem schwachen Effekt
- 0.20 – 0.30 entspricht einem mittelstarken Effekt
- > 0.30 entspricht einem starken Effekt

(192, 193)

4.3.2 Geschlechtsabhängige Unterschiede bei vesikulärem Albumin und Podocalyxin

4.3.2.1 Albumin

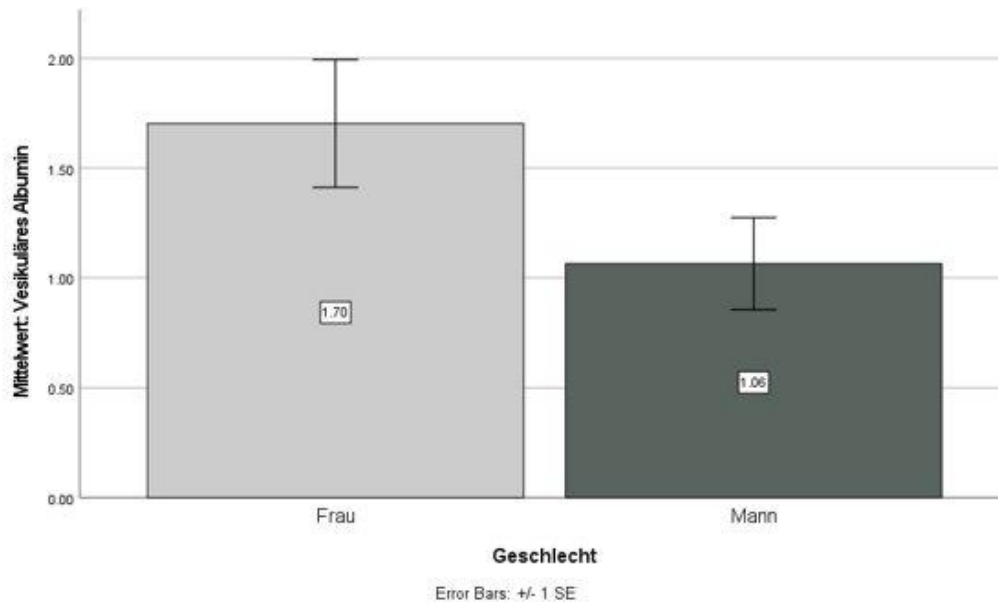


Abbildung 13: Balkendiagramm zur Ausscheidung von Albumin (Vesikel) nach dem Geschlecht. Frauen weisen einen höheren Mittelwert von 1,70 auf, während der Mittelwert bei Männern 1,06 beträgt, dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler.

Auch bei der Quantifizierung des vesikulären Albumins zeigen sich geschlechtsabhängige Unterschiede in der Verteilung. Unter den weiblichen Probandinnen liegt der Mittelwert für vesikuläres Albumin ($\pm$ Standardfehler des Mittelwerts) mit 1,70 ($\pm$ 0,29) signifikant höher als bei den männlichen Probanden mit 1,06 ($\pm$ 0,21) ($T = 1,687^*$, p (einseitig) = 0,039). Auch der Ausreißer-robuste Median ($\pm$ Standardabweichung) des vesikulären Albumins ist in der weiblichen Subkohorte mit 0,92 ($\pm$ 2,21) höher als in der männlichen Teilgruppe mit 0,74 ($\pm$ 1,41).

4.3.2.2 Podocalyxin

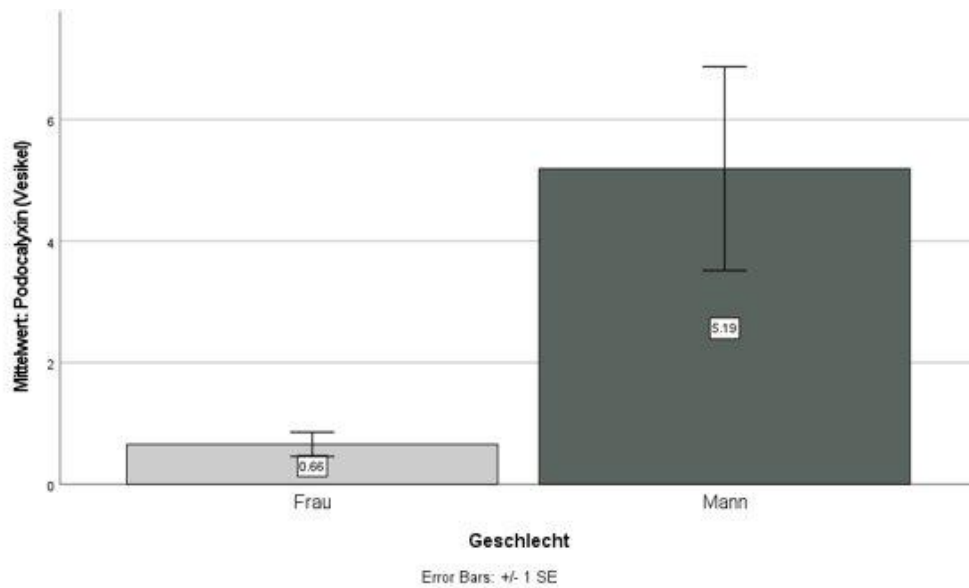


Abbildung 14: Balkendiagramm zur Ausscheidung von Podocalyxin (Vesikel) nach dem Geschlecht. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler.

Bei der Bestimmung des Podocalyxins ergibt sich ein entgegengesetzter Zusammenhang. Hier ist der Wert der männlichen Teilgruppe im Mittel höher als der der weiblichen (Mittelwert: $5,19 \pm 1,68$ verglichen mit $0,66 \pm 0,20$; Median: $0,77 \pm 11,24$ verglichen mit $0,04 \pm 1,52$) ($T = -3,040^{**}$, $p(\text{einseitig}) = 0,002$).

4.3.2.3 Normierung der Variablen

Die Urinkonzentration hat durch Verdünnungseffekte einen großen Einfluss auf die Konzentration der untersuchten Proteine im Urin. Mit der Urinkonzentration, gemessen als Kreatininkonzentration des Urins oder als Urinosmolarität, steigt auch die Konzentration von Albumin im Urin sowie Albumin und Podocalyxin in den Vesikeln – ohne, dass ein funktionelles Problem zugrunde liegen muss.

Analog zur Berechnung des ACR, werden deshalb auch die Parameter Podocalyxin (Vesikel) und Albumin (Vesikel) auf diese Konzentrationsparameter normalisiert, um Verdünnungseffekten zu begegnen.

Die beschriebenen geschlechtsabhängigen Zusammenhänge stellen sich als noch prominenter heraus, wenn man die normalisierten Werte vergleicht. Nach dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test haben Frauen (Median = 1,65) gegenüber Männern (Median = 0,75) signifikant höhere Werte für Albumin (Vesikel) / Kreatinin (Urin) im

Urin, $n = 103$, $z = -3,444$, $r = \frac{|z|}{\sqrt{n}} = 0,339^{**}$, $p < 0,001$.

Für Podocalyxin (Vesikel) / Kreatinin (Urin) verhält es sich umgekehrt: Hier haben die Männer (Median = 0,91) signifikant höhere Werte als Frauen (Median = 0,17), $n = 103$, $z = -3,803$, $r = \frac{|z|}{\sqrt{n}} = 0,375^{**}$, $p < 0,001$.

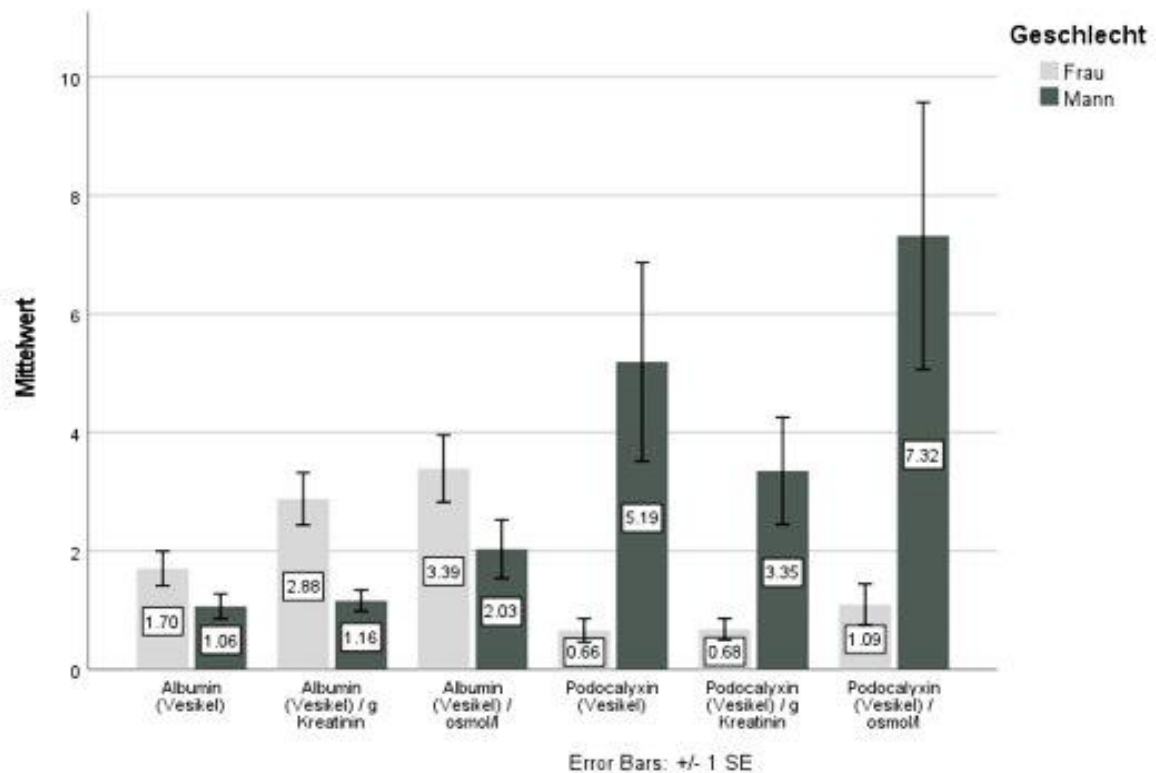


Abbildung 15: Balkendiagramm der Mittelwerte für die Albumin- und Podocalyxin-Konzentrationen in Vesikeln sowie deren Normalisierung nach Kreatinin- und Osmolalitätswerten, getrennt nach Geschlecht. Angezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern (Error Bars ± 1 SE).

4.3.3 Zusammenhang zwischen vesikulärem Albumin und Podocalyxin

Anhand des Spearman-Rangkorrelationskoeffizient ρ kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob zwei Variablen zusammenhängen und wie stark dieser Zusammenhang ist.

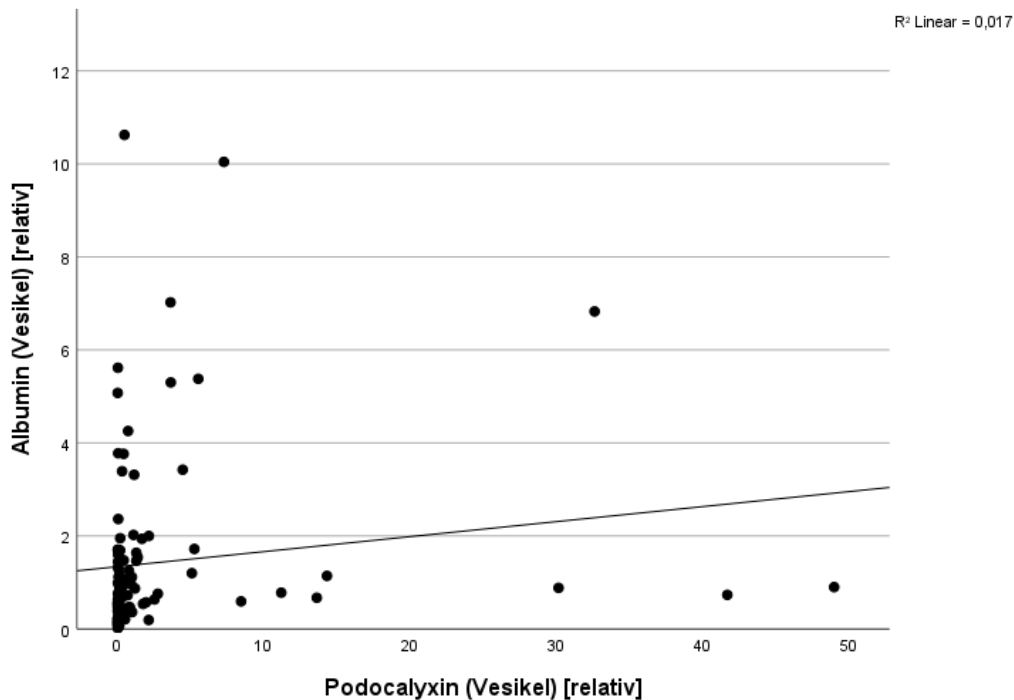


Abbildung 16: Streudiagramm zur Beziehung von Albumin (Vesikel) und Podocalyxin (Vesikel)
Die Regressionslinie weist eine leichte positive Steigung auf, der Zusammenhang ist jedoch schwach mit einem R^2 -Wert von 0,017

Im Fall der Korrelation von vesikulärem Albumin und Podocalyxin ergibt sich ein positiver Zusammenhang mit $p = 0,452^{**}$ ($p < 0,001$): Ist viel Albumin in einem Exosomenisolat enthalten, ist tendenziell auch viel Podocalyxin nachweisbar.

Allerdings haben auch weitere Variablen einen Einfluss. Wie durch die geschlechtsabhängigen Unterschiede zu vermuten war, wird der Zusammenhang eindeutiger, wenn man für das Geschlecht adjustiert. Unter den weiblichen Teilnehmerinnen ist $p = 0,476^{**}$ ($p < 0,001$) und unter den männlichen Teilnehmern ist $p = 0,572^{**}$ ($p < 0,001$).

4.3.4 Regressionsanalyse – Wie viel Prozent des gemessenen vesikulären Albumins lassen sich durch freies Albumin erklären?

Um die Beziehung der Variablen Albuminurie und Ausscheidung von vesikulärem Albumin zueinander abzuschätzen, wird ein Streudiagramm erstellt. Das Diagramm zeigt einen linearen Zusammenhang mit positiver Steigung. Mit verstärkter Albuminurie, steigt also auch die Menge an vesikulärem Albumin im Harn.

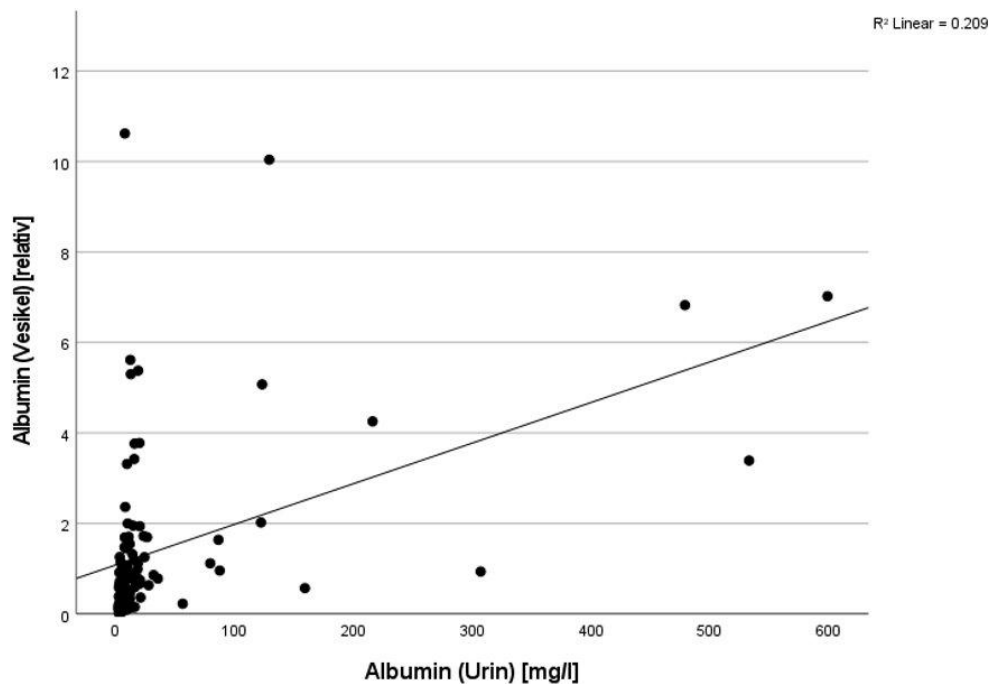


Abbildung 17: Streudiagramm zur Korrelation von Albumin im Urin (mg/l) mit vesikulärem Albumin
Der lineare Zusammenhang wird durch die ansteigende Regressionslinie dargestellt, der Zusammenhang ist positiv mit einem Determinationskoeffizient von $R^2 = 0,209$

Um den Einfluss einer Variable X auf eine Zielgröße Y genau zu berechnen, wird die lineare Regressionsanalyse angewendet. Um den Einfluss des im Vollurin vorkommenden Albumins – zur besseren Unterscheidung als freies Albumin bezeichnet – auf das gemessene vesikuläre Albumin zu erklären, wird das freie Albumin als unabhängige Variable, also als Einflussvariable X festgelegt, das vesikuläre Albumin ist somit die abhängige Variable, also die Zielvariable Y.

Es ergibt sich ein positiver Zusammenhang zwischen dem freien Albumin und dem vesikulären Albumin. ($\beta = 0,457^{**}$, $p < 0,001$. Der Determinationskoeffizient R^2 beträgt 0,209, korrigierter $R^2 = 0,201$, was darauf hinweist, dass 21% der Varianz des vesikulären Albumins durch freies Albumin erklärt wird.

4.3.5 Vesikuläres Albumin, Podocalyxin und Nierengesundheit

Um die Rolle der isolierten Exosomen im Verlauf der Nierenerkrankungen besser zu verstehen, wird die Menge an vesikulärem Albumin und Podocalyxin innerhalb von nierenkranken und nierengesunden Subgruppen der Kohorte untersucht. Die Gruppen werden anhand von klinisch etablierten Nierenmarkern und leitliniengerechten Cut-Off-Werten gebildet (70).

4.3.5.1 Albumin (Vesikel) und Albumin-Kreatinin-Ratio

Die Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR) ist der meistgenutzte Marker für die Evaluation einer Albuminurie. Die Zusammenhänge zwischen Albuminurie, Nierengesundheit und gesundheitlicher Prognose wurden oben ausführlich diskutiert.

Um zu überprüfen, wie vesikuläres Albumin und die ACR miteinander in Zusammenhang stehen, wurde wiederum der Rangkorrelationskoeffizient ρ nach Spearman herangezogen. Auch hier zeigt sich ein positiver Zusammenhang ($\rho = 0,280^{**}$, $p = 0,004$). Eine hohe Ausscheidung von vesikulärem Albumin ist also tendenziell mit einem hohen Wert für die ACR assoziiert. Dieser Zusammenhang zeigt sich nicht zwischen Podocalyxin (Vesikel) und ACR.

Um für die Konzentration des Urins und die daraus resultierenden Unterschiede zu adjustieren, wird Albumin (Vesikel) ebenfalls auf Kreatinin (Urin) normalisiert. Im Ergebnis zeigt sich ein noch höherer Korrelationskoeffizient bei verbessertem Signifikanzniveau ($\rho = 0,497^{**}$, $p < 0,001$). Dieser Zusammenhang zeigt sich ebenfalls nicht mit Podocalyxin (Vesikel) / Kreatinin.

Im Kruskal-Wallis-Test zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den nach KDIGO eingeteilten Stadien A1 und A2 ($z = -3,877$, $r = \frac{|z|}{\sqrt{n}} = 0,382^{**}$, $p < 0,001$), sowie A1 und A3 ($z = -2,419$, $r = \frac{|z|}{\sqrt{n}} = 0,238^{*}$, $p = 0,016$) der Albuminurie.

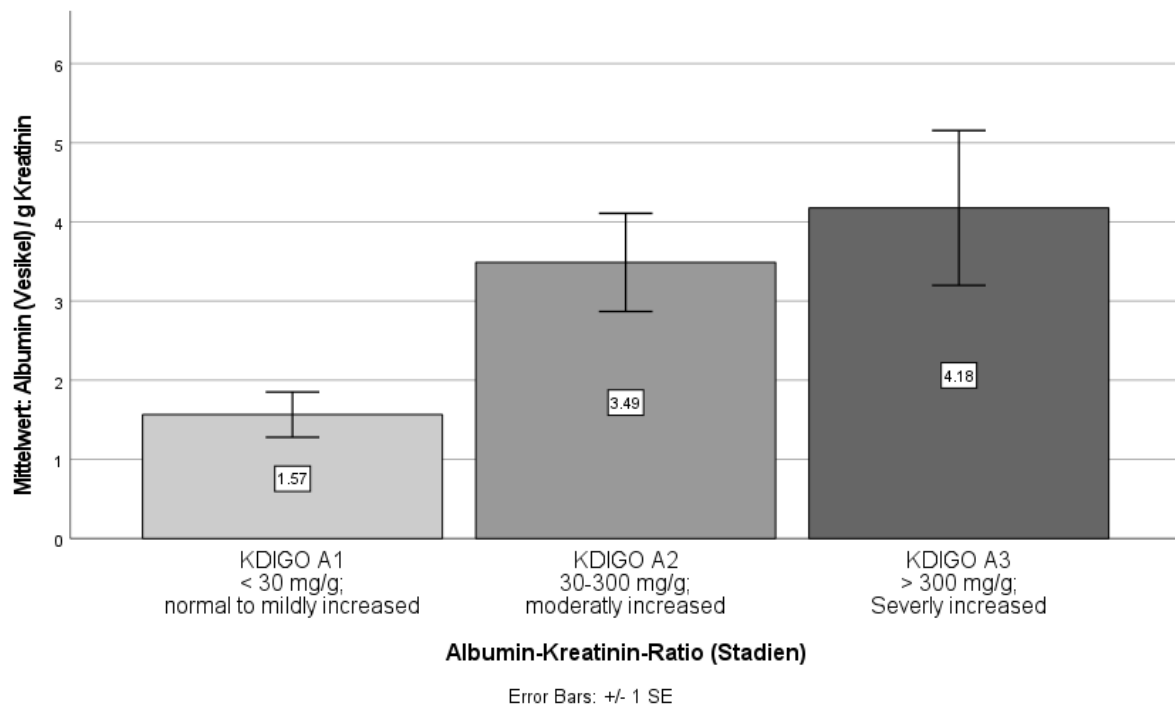


Abbildung 18: Balkendiagramm der Mittelwerte der Albuminmenge der Vesikel, normiert auf Kreatinin im Urin, verteilt über die KDIGO-Stadien

Vesikuläres Albumin steigt mit zunehmender Albuminurie an – von 1,57 (KDIGO A1) über 3,49 (KDIGO A2) bis 4,18 (KDIGO A3), Fehlerbalken zeigen ± 1 SE

4.3.5.2 Albumin-Kreatinin-Ratio und glomeruläre Filtrationsrate

Die Limitationen der eGFR wurden bereits oben im Text erörtert. Nichtsdestotrotz hat sie einen hohen Stellenwert in der klinischen Routinediagnostik und dient als wichtiger Parameter bei der Diagnostik von Nierenfunktionseinschränkungen und assoziierten Erkrankungen wie kardiovaskulären Risiken (151).

Es ist deshalb besonders erwähnenswert, dass in unserer Kohorte nach dem Spearman-Korrelationskoeffizient kein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden meist genutzten Nieren-Biomarkern ACR und eGFR besteht ($\rho = -0,081$, $p = 0,425$). Eine Adjustierung für das Geschlecht ändert dies nicht.

4.3.5.3 Vesikuläres Albumin, Podocalyxin und glomeruläre Filtrationsrate

Es zeigt sich gleichermaßen wohl eine Tendenz, aber kein nach Spearman signifikanter negativer Zusammenhang zwischen vesikulärem Albumin und der eGFR ($\rho = -0,100$, $p = 0,324$). Eine geschlechtsspezifische Berechnung ändert das ebenfalls nicht.

Für vesikuläres Podocalyxin zeigt sich ein anderes Bild: Bei einer geschlechtsspezifischen Untersuchung zeigt sich ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen den kontinuierlichen Parametern „vesikuläres Podocalyxin“ und „eGFR“ in der weiblichen Teilgruppe ($p = -0,278^*$, $p = 0,038$). Der Korrelationskoeffizient der männlichen Subgruppe wird mit $p = -0,074$ ($p = 0,635$) angegeben. Ebenfalls gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen vesikulärem Podocalyxin und den eGFR-Stadien nach KDIGO-Kriterien für die gesamte Kohorte: Je geringer die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate unter den Studienteilnehmerinnen und Teilnehmern – und damit je höher das eGFR-Stadium nach KDIGO – desto mehr vesikuläres Podocalyxin war im Urin nachweisbar ($p = 0,209$; $p = 0,037$).

4.3.5.4 Podocalyxin und Alter

Die eGFR sinkt mit steigendem Alter (194). Dieser Zusammenhang zeigt sich auch in der untersuchten Kohorte ($p = -0,322^{**}$, $p = 0,001$).

Altersgruppe	n	Mittelwert ($\pm$ Standardfehler des Mittelwerts)
70-74 Jahre	14	72,38 ($\pm$ 3,47) ml/min/1.73m ²
75-79 Jahre	42	68,35 ($\pm$ 2,66) ml/min/1.73m ²
80-85 Jahre	30	62,66 ($\pm$ 2,87) ml/min/1.73m ²
> 85 Jahre	14	59,45 ($\pm$ 4,41) ml/min/1.73m ²

Tabelle 15: eGFR und Alter

Ebenfalls zeigt sich ein Zusammenhang zwischen dem steigenden Alter und steigenden Werten für Podocalyxin in den Exosomenisolaten ($p = 0,231^*$, $p = 0,019$). Wiederum nimmt die Effektstärke durch Normalisierung auf Kreatinin zu ($p = 0,242^*$, $p = 0,014$).

Altersgruppe	n	Mittelwert ($\pm$ Standardfehler des Mittelwerts)
70-74 Jahre	14	0,64 ($\pm$ 0,55)
75-79 Jahre	42	2,12 ($\pm$ 0,80)
80-85 Jahre	30	1,86 ($\pm$ 1,26)
> 85 Jahre	14	2,26 ($\pm$ 0,43)

Tabelle 16: Podocalyxin / g Kreatinin und Alter

In der Altersgruppe 70-74 Jahre ist (nach Kruskal-Wallis) signifikant weniger Podocalyxin/Kreatinin in den Exosomenisolaten nachweisbar als in den Altersgruppen 75-79 Jahre ($z = -3,536^{**}$, $r = 0,354^{**}$, $p < 0,001$), 80- 85 Jahre ($z = -3,632^{**}$, $r = 0,363^{**}$, $p < 0,001$) und >85 Jahre ($z = -2,940^{**}$, $r = 0,294^{**}$, $p = 0,003$).

4.3.5.5 Vesikuläres Albumin und Bluthochdruck

Bluthochdruck ist der häufigste Risikofaktor für Nierenerkrankungen und die Prävalenz steigt mit dem Alter. Innerhalb der Kohorte geben 77 von 103 Personen an, mit Bluthochdruck diagnostiziert worden zu sein. Für beide Geschlechter ist die Prävalenz von Bluthochdruck gleichverteilt (χ^2 : $p = 0,347$).

Menschen, die unter Bluthochdruck leiden, haben höhere Werte für vesikuläres Albumin als Menschen, die nicht mit Bluthochdruck diagnostiziert worden sind. Dieser Zusammenhang erreicht allerdings im durchgeführten Mann-Whitney-U-Test kein Signifikanzniveau: $z = -1,474$, $r = 0,147$, $p = 0,140$ (für Albumin (Vesikel) / Kreatinin [g]).

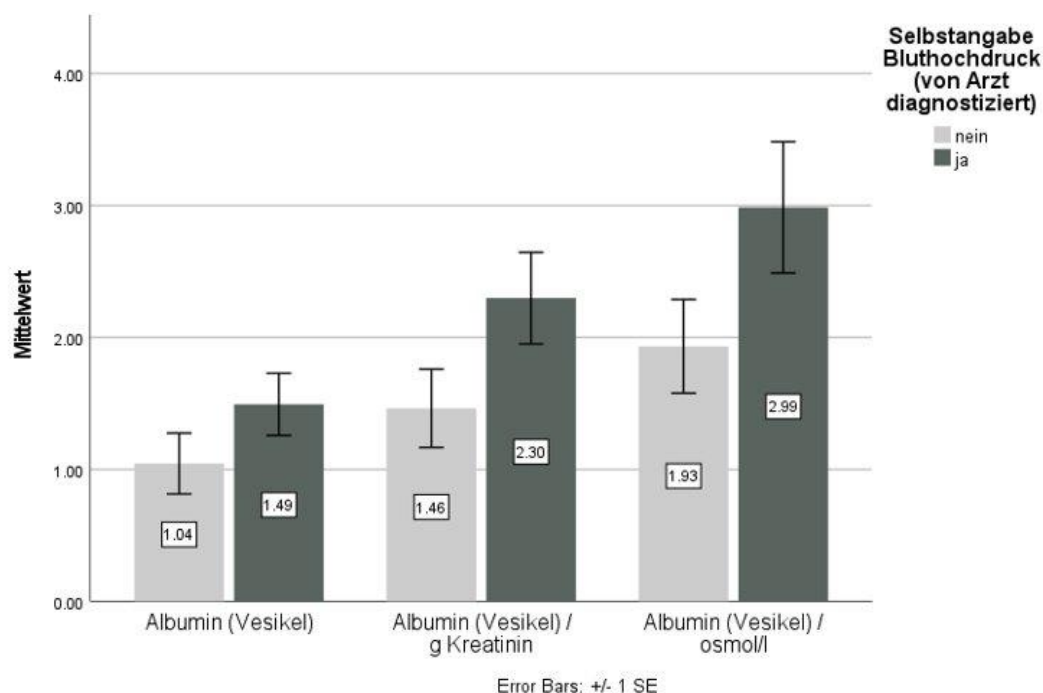


Abbildung 19: Balkendiagramm der vesikulären Albuminkonzentration in Abhängigkeit von Bluthochdruck. Personen mit Bluthochdruck zeigen höhere Werte für Albumin (Vesikel) (1,49 vs. 1,04), Albumin (Vesikel) / g Kreatinin (2,30 vs 1,46) und Albumin (Vesikel) / osmol/l (2,99 vs. 1,93) im Vergleich zu Personen ohne Bluthochdruck, Fehlerbalken zeigen ± 1 SE.

4.3.5.6 Vesikuläres Albumin und Chronische Nierenerkrankung (CKD)

Laut KDIGO spricht man von chronischer Nierenerkrankung (CKD) als eingeschränkter Nierenfunktion ab einer eGFR < 60 ml/min/1.73m² oder einer ACR > 30 mg/g. In unserer Kohorte fallen 47 Probandinnen und Probanden (51,5%) unter diese Definition, 53 Probandinnen und Probanden (45,6%) sind nicht betroffen. Für beide Geschlechter ist die Prävalenz der chronischen Nierenerkrankung gleichverteilt (Chi², p = 0,897).

Nierenkranke Menschen weisen mehr vesikuläres Albumin im Urin auf als nierengesunde Menschen (Mann-Whitney-U-Test: z = -3,077**, r = 0,308**, p = 0,002). Wiederum ist der Zusammenhang stärker und das Signifikanzniveau höher, wenn man die Urinkonzentration berücksichtigt (z = -3,305**, r = 0,331**, p < 0,001 für Albumin (Vesikel) / Kreatinin [g]).

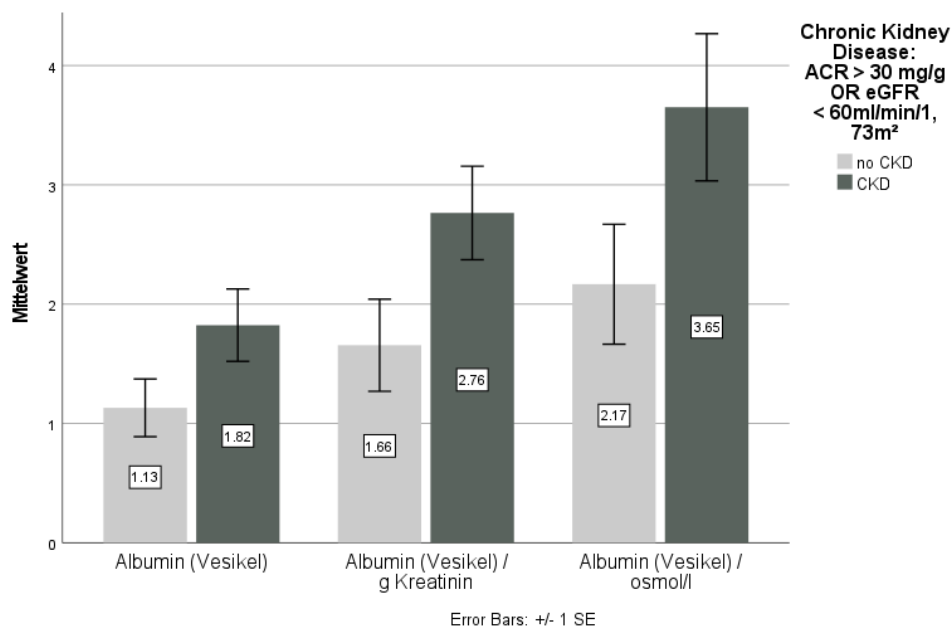


Abbildung 20: Balkendiagramm der vesikulären Albuminkonzentration bei Personen mit und ohne Chronic Kidney Disease (CKD)

Personen mit CKD zeigen signifikant höhere Werte für Albumin (Vesikel) (1,82 vs. 1,13), Albumin (Vesikel) / g Kreatinin (2,76 vs. 1,66) und Albumin (Vesikel) / osmol/l (3,65 vs. 2,17) im Vergleich zu Personen ohne CKD, Fehlerbalken repräsentieren ± 1 Standardfehler.

4.3.6 Vesikel und Entzündungsmarker

Bei C-reaktivem Protein (CRP) handelt es sich um ein in der Leber produziertes Akute-Phase-Protein, dessen Serumkonzentration einen klinisch erprobten Entzündungsmarker darstellt (195–197).

Es zeigt sich ein positiver Zusammenhang zwischen der Menge an vesikulärem Albumin im Urin und der Menge an CRP im Serum. Probandinnen und Probanden, deren Serum-CRP höher ist, scheiden auch mehr vesikuläres Albumin aus ($p = 0,295^{**}$, $p = 0,003$).

Dieser Zusammenhang zeigt sich gleichfalls mit der Menge an Podocalyxin im Exosomenisolat ($p = 0,222^*$, $p = 0,026$), nicht jedoch mit den herkömmlichen Nierenparametern wie dem freien Albumin im Urin ($p = 0,154$, $p = 0,125$), der Albumin-Kreatinin-Ratio ($p = -0,014$, $p = 0,889$) oder der eGFR ($p = -0,152$, $p = 0,130$). Ebenfalls bemerkenswert ist, dass die Normalisierung der Werte auf Kreatinin im Urin dem Zusammenhang in diesem Fall schwächt und nicht stärkt ($p = 0,148$, $p = 0,148$). Dies ist darauf zurückzuführen, dass auch die Urinkreatininkonzentration signifikant mit dem Serum-CRP zusammenhängt ($p = 0,234^*$, $p = 0,019$).

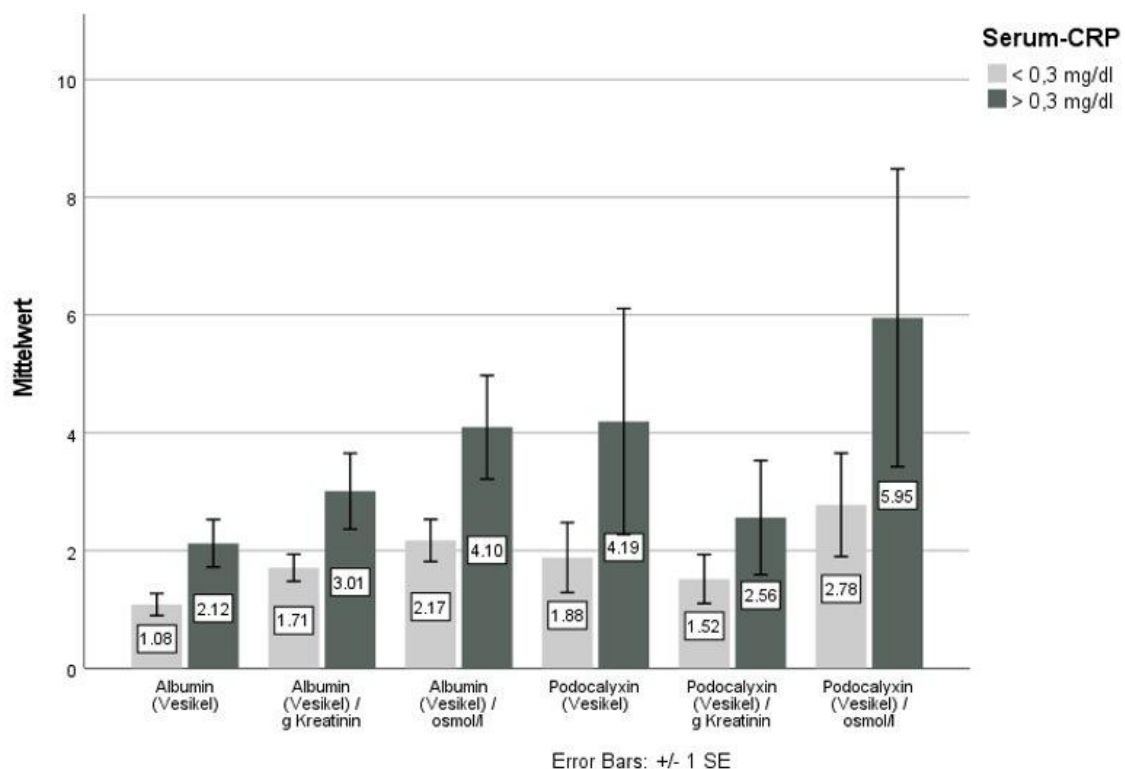


Abbildung 21: Balkendiagramm der Konzentrationen von Albumin und Podocalyxin in Vesikeln in Abhängigkeit von Serum-CRP-Werten (< 0,3 mg/dl vs. > 0,3 mg/dl)
 Albumin in Vesikeln ist bei Personen mit CRP-Werten über 0,3 mg/dl deutlich höher (2,12 vs. 1,08), auch die Albumin-Werte, die auf Kreatinin bezogen wurden, sind bei pathologischen CRP-Werten erhöht (3,01 vs. 1,71), ähnlich zeigt sich bei der Normalisierung auf Osmolalität ein höherer Mittelwert von Albumin bei CRP > 0,3 mg/dl (4,10 vs. 2,17) – für Podocalyxin zeigt sich ein ähnliches Muster: Die Konzentration in den Vesikeln ist bei CRP-Werten über 0,3 mg/dl deutlich erhöht (4,19 vs. 1,88). Auch bei der Normalisierung auf Kreatinin und Osmolalität sind die Werte höher bei pathologischen CRP-Werten (2,56 vs. 1,52 bzw. 5,95 vs. 2,78)
 Fehlerbalken stellen jeweils ± 1 Standardfehler dar

4.3.7 Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf die Vesikel:

Vesikuläres Albumin unter der Einnahme von RAAS-Inhibitoren

In unserer Kohorte haben 29 Probandinnen und Probanden eine ACR > 30 mg/g und gelten damit als proteinuretisch (16 Frauen und 13 Männer). Innerhalb dieser Gruppe nehmen 17 Probandinnen und Probanden RAAS-Inhibitoren ein, 12 Probandinnen und Probanden nehmen damit keine RAAS-Inhibitoren ein, obwohl sie eine ACR > 30mg/g haben. Die Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems bei der Entstehung der podozytären Exosomen wurde weiter oben erläutert. Im Einklang damit zeigen unsere Daten, dass die Einnahme von RAAS-Inhibitoren die Menge an vesikulärem Albumin im Urin (wiederum normiert auf die Urinkreatininkonzentration) senkt.

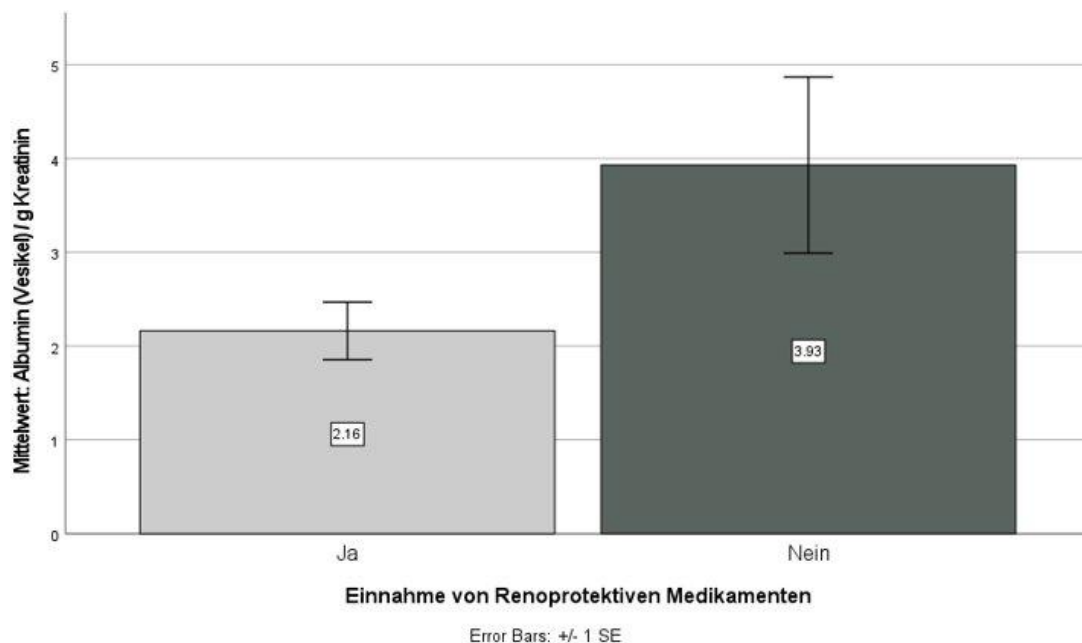


Abbildung 22: Balkendiagramm der Mittelwerte von Albumin (Vesikel) pro g Kreatinin in Abhängigkeit von der Einnahme renoprotektiver Medikamente
Patientinnen und Patienten, die renoprotektive Medikamente einnehmen weisen weniger vesikuläres Albumin pro g Kreatinin im Urin auf als Patientinnen und Patienten, die keine renoprotektiven Medikamente einnehmen („Nein“), Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler

Probandinnen und Probanden, die eine ACR > 30mg/g aufweisen und trotzdem keine RAAS-Inhibitoren einnehmen, weisen mehr vesikuläres Albumin im Harn (normiert auf die Urinkreatininkonzentration) auf als solche, die unter Albuminurie leiden und RAAS-Inhibitoren einnehmen (Mann-Whitney-U-Test: $z = -1,860^*$, $p = 0,033$). Diese transzytosehemmende Wirkung ist spezifisch nur bei der Einnahme von RAAS-Inhibitoren nachzuweisen, nicht etwa bei der Einnahme anderer

blutdrucksenkender Medikamente ($z = -1,097$, $p = 0,295$) oder Diuretika ($z = 0,783$, $p = 0,804$).

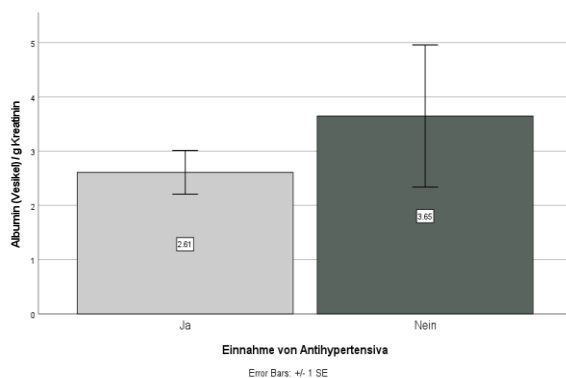


Abbildung 24: Einfluss der Antihypertensive-Einnahme auf die vesikuläre Albuminkonzentration
Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der Albuminkonzentration (Vesikel / g Kreatinin) in Abhängigkeit von der Einnahme von Antihypertensiva, Fehlerbalken repräsentieren ± 1 SE

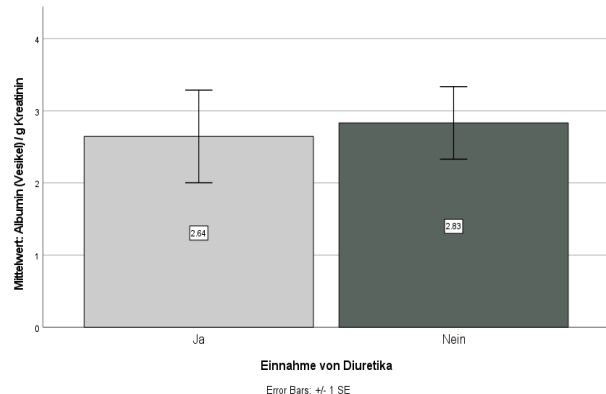


Abbildung 24: Einfluss der Diuretika-Einnahme auf die vesikuläre Albuminkonzentration
Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der Albuminkonzentration (Vesikel / g Kreatinin) in Abhängigkeit von der Einnahme von Diuretika, Fehlerbalken repräsentieren ± 1 SE

Wiederrum zeigt sich dieser Zusammenhang nur mit dem Albumin in der Vesikelfraktion und nicht mit dem Gesamteiweiß ($z = 0,888$, $p = 0,394$), dem freien Albumin im Urin ($z = 1,705$, $p = 0,088$) oder der Albumin-Kreatinin-Ratio ($z = 1,638$, $p = 0,107$).

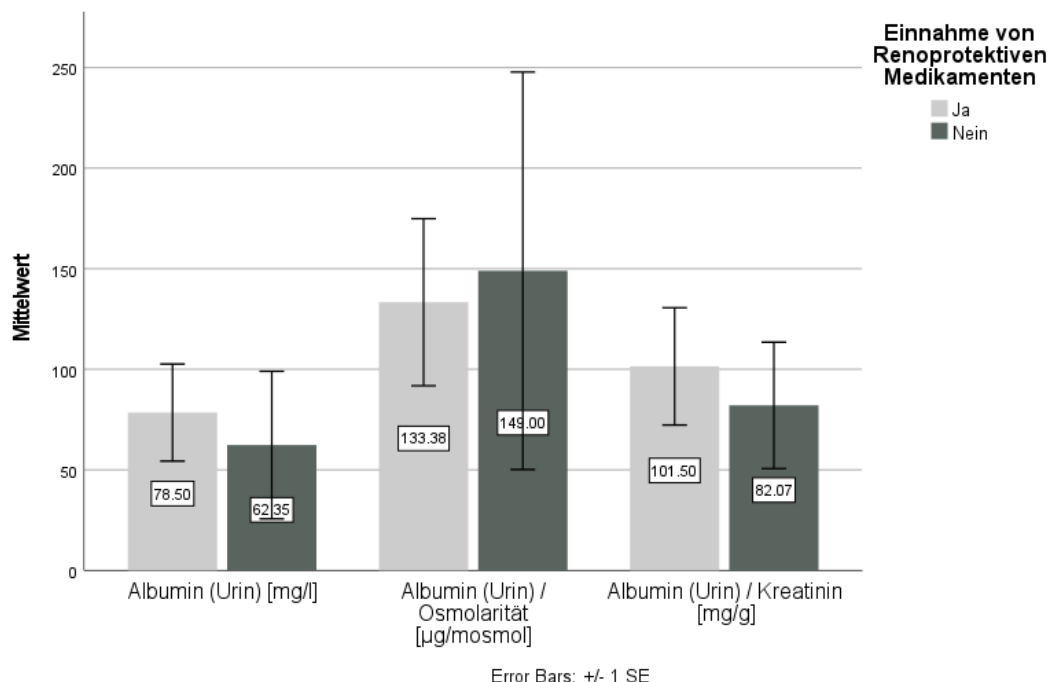


Abbildung 25: Einfluss renoprotektiver Medikamente auf die Albuminausscheidung
Das Balkendiagramm zeigt die mittleren Albuminwerte im Urin (mg/l), relativ zur Osmolarität (µg/mosmol) und relativ zu Kreatinin (mg/g), getrennt nach Einnahme (Ja/Nein) renoprotektiver Medikamente, Fehlerbalken repräsentieren ± 1 SE

5 Diskussion

Die chronische Nierenerkrankung (CKD) stellt weltweit eine bedeutende Herausforderung für die Gesundheitsversorgung dar. Obwohl Proteinurie und eGFR eine bedeutende Rolle in der Diagnostik und Behandlung der CKD spielen, weisen sie dennoch Einschränkungen auf, wenn es darum geht, Schäden frühzeitig zu erkennen. Diese Einschränkungen verringern die Möglichkeit, präventive Maßnahmen rechtzeitig einzuleiten und das Fortschreiten der Erkrankung effektiv zu verlangsamen.

Um der Forschungsfrage nach neuen Parametern zur Beurteilung der Nierenfunktion nachzugehen, wurden vesikuläres Albumin und Podocalyxin im Endharn als potenzielle neue Biomarker anhand der AugUR2-Kohorte untersucht.

Zentral für die Diskussion ist die Frage, ob die Erkenntnisse über albuminhaltige Vesikel aus Tierversuchen auf den Menschen übertragbar sind und ob diese Marker einen diagnostischen Mehrwert im Vergleich zur Bestimmung von freiem Albumin im Harn bieten.

Diskutiert wird die Beziehung zwischen den neu vorgeschlagenen Markern und etablierten Nierenparametern wie Albuminurie, der Albumin-Kreatinin-Ratio und der eGFR sowie dem Entzündungsparameter CRP.

Während der Analyse der Daten wurden unerwartet deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet, die in der ursprünglichen Forschungsfrage nicht antizipiert worden waren. Diese Unterschiede werfen neue Fragen über mögliche Rolle von Geschlecht bei der Diagnostik und Progression der CKD auf und unterstreichen die Notwendigkeit, vesikuläre Biomarker geschlechtsspezifisch zu bewerten.

Schließlich wird auch der Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf die vesikulären Marker beleuchtet.

5.1 Interpretation der Ergebnisse

5.1.1 Charakterisierung der AugUR2 Kohorte

Im Vorfeld der experimentellen Untersuchungen stand die Charakterisierung der Kohorte. Unter Berücksichtigung verschiedener demografischer und klinischer Merkmale wurde sichergestellt, dass die Stichprobe repräsentativ ist und keine signifikanten Verzerrungen aufweist. Die genaue Charakterisierung der Kohorte, einschließlich Alter, Geschlecht, Vorerkrankungen mit besonderem Fokus auf die Nierengesundheit, ermöglichte es, die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen auf eine breitere Population zu generalisieren und die Validität der Studienergebnisse zu stärken und sicherzustellen, dass die Forschungsergebnisse allgemein relevant und anwendbar für die Zielbevölkerung sind.

5.1.2 Nachweis der Exosomenmarker und Podozytenmarker in den Vesikelsuspensionen nicht aber im Vollurin

Der erste experimentelle Teil dieser Arbeit widmete sich der Charakterisierung der durch Ultrazentrifugation gewonnenen Vesikelsuspensionen.

Western Blotting ist eine weit verbreitete Methode zur Charakterisierung von Exosomen. Das grundlegende Prinzip des Western Blotting beruht auf der Affinitätsbindung zwischen einem Zielprotein (Antigen) und einem spezifischen Antikörper. In der Probenvorbereitung werden die Vesikel lysiert und die enthaltenen Proteine denaturiert und reduziert. Dies ermöglicht eine Charakterisierung sowohl der Oberflächenproteine der Vesikelmembran als auch der enthaltenen Cargo (198, 199).

Die abgebildeten Western Blots dienen dem Nachweis mehrerer Proteine, die spezifisch für Exosomen beziehungsweise Podozyten sind. Die meistverwendeten Exosomenmarker sind Alix, CD9, CD63 und Hsp70 (162, 198, 200, 201), die auch hier zur Charakterisierung der Vesikelisolate verwendet wurden. Damit ein Protein als Markerprotein verwendet werden kann muss es mehrere Bedingungen erfüllen. Zum einen sollte es in Exosomen verschiedenen Ursprungs nachweisbar sein (eine Übersicht der am häufigsten in Exosomen identifizierten Proteine bietet das Bioinformatics-Tool ExoCarta.org) und ihr Vorkommen sollte durch die Biogenese der Vesikel erklärbar sein (198).

Der Nachweis dieser Markerproteine gelang in den Exosomensuspensionen, nicht aber im korrespondierenden Vollurin, was die Isolation und Konzentrierung der im Urin enthaltenen Vesikel durch das verwendete Ultrazentrifugationsprotokoll widerspiegelt (siehe 3.2.2).

Auch der Nachweis von Podocalyxin gelang nur in den Exosomensuspensionen, nicht aber im korrespondierenden Vollurin. Der Nachweis des podozytären Membranproteins dient als Nachweis des Ursprungs der Vesikel aus den Podozyten (26, 202). Auch wenn sich hieraus nicht ableiten lässt, dass alle Exosomen aus den Podozyten stammen, kann man doch sicher sagen, dass die podozytären Vesikel erfolgreich isoliert wurden. Weiterhin legen Untersuchungen von Pisitkun, Knepper et al. nahe, dass die Mehrzahl der im Urin enthaltenen Exosomen aus den glomerulären Podozyten stammt (173, 203).

Es wurde durch den Einsatz von Western Blots nachgewiesen, dass sowohl Exosomen- als auch Podozytenmarker in den isolierten Vesikelsuspensionen vorhanden sind, im Vollurin jedoch nicht nachweisbar sind. Dies legt nahe, dass das Ultrazentrifugationsprotokoll eine Vesikelisolation und -konzentrierung aus dem Urin ermöglicht, während der Nachweis spezifischer Proteine wie Podocalyxin in den Exosomen auf ihren Ursprung aus den Podozyten hinweist.

5.1.3 Albuminurie und vesikuläres Albumin

Der Nachweis von Albumin (Cargo) wiederum ist in Vollurin wie auch Exosomensuspension nachweisbar. Das entspricht den Erwartungen, da es neben dem Transport des Albumins per Transzytose noch den parazellulären Weg über die glomeruläre Filtrationsbarriere gibt. Die verschiedenen Wege des Albumins in den Endharn wurden oben erläutert. Obwohl Albumin im Urin gesunder Probanden nur in Spuren vorhanden ist (siehe 1.3.1) ist ein Nachweis im Western Blot erwartbar, da es sich um eine sehr sensitive Methode handelt.

Das unter 4.3.4 dargelegte Streudiagramm und die Regressionsanalyse legen dar, dass es einen positiven Zusammenhang zwischen freiem und dem vesikulären Albumin gibt. Es ist daher von großer Wichtigkeit, zu bestimmen, inwiefern die Quantifizierung des vesikulär vorliegenden Albumins einen Mehrwert zur Bestimmung des frei vorliegenden Albumins darstellt. Damit das der Fall ist, darf die

Menge an vesikulärem Albumin nicht einen relativen Anteil des freien Albumins darstellen, damit die Bestimmung neue Erkenntnisse liefert.

Eine lineare Regressionsanalyse ist eine statistische Methode, die verwendet wird, um die Beziehung zwischen einer abhängigen (Ziel-)Variable und einer oder mehreren unabhängigen (erklärenden) Variablen zu analysieren und eine Vorhersage der abhängigen Variable basierend auf den Werten der unabhängigen Variable zu ermöglichen. In unserem Modell handelt es sich bei der abhängigen Variable um das gemessene vesikuläre Albumin, während das freie Albumin die unabhängige Variable ist. Die Stärke des Zusammenhangs wird über das Bestimmtheitsmaß R^2 ausgedrückt. Der R^2 -Wert sagt aus, wie viel Prozent der Varianz durch die Einflussvariable X erklärt werden können. Der errechnete R^2 -Wert von 0,209 besagt, dass 20,9% des vesikulären Albumins auf das freie Albumin zurückzuführen sind. Daraus ergibt sich, dass 79,1% der Varianz des vesikulären Albumins unabhängig von freiem Albumin sind und auf andere Einflussvariablen zurückzuführen.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen einen positiven Zusammenhang zwischen freiem und vesikulärem Albumin im Urin. Die Varianz des gemessenen vesikulären Albumins und die statistische Analyse lassen trotzdem auf große interindividuelle Unterschiede schließen. Es handelt sich bei dem neuen Wert also nicht einfach um einen festen Prozentsatz des freien Albumins, sondern um einen eigenständigen Parameter.

5.1.4 Vesikuläres Albumin und vesikuläres Podocalyxin

Angesichts der Tatsache, dass sowohl Albumin als auch Podocalyxin Bestandteile der Exosomen sind, war es zu erwarten, dass eine positive Korrelation zwischen den beiden Werten besteht, was in der statistischen Analyse bestätigt wurde. Dieser Zusammenhang wird als mittelstark nach Cohen (1988) oder als stark nach Hemphill (2003) eingestuft (191, 193). Trotz dieser Beziehung gibt es Probandinnen und Probanden, die niedrige Podocalyxin-Werte und hohe vesikuläre Albumin-Werte oder umgekehrt aufweisen. Zudem zeigen sich auffällige Geschlechtsunterschiede, die unter 5.1.7 ausführlich diskutiert werden. Insbesondere in der männlichen Subgruppe treten beträchtliche Schwankungen im Verhältnis von Albumin zu Podocalyxin auf.

Eine mögliche Erklärung für diese Varianz ist, dass neben den Albumin-enthaltenden Exosomen noch weitere podozytäre Vesikel mit anderem Inhalt im Endharn vorhanden sind. Auch Unterschiede bei der Zusammensetzung der Doppellipidschicht mit veränderlichem Anteil an Podocalyxin auf der Oberfläche der Vesikel können zu der beobachteten Varianz beitragen.

5.1.5 Vesikuläres Albumin, Podocalyxin und Nierengesundheit

Um die Eignung unserer neuen Vesikelparameter zur Bewertung der Nierenfunktion zu untersuchen, analysieren wir ihr Verhalten in verschiedenen Untergruppen von gesunden und nierenkranken Personen. Diese Untersuchung gestaltet sich herausfordernd, da unser neuer Marker mit den etablierten Markern verglichen wird, die jedoch aufgrund der zuvor beschriebenen Limitationen nicht optimal geeignet sind, um die tatsächliche Gesundheit der Nieren widerzuspiegeln (150, 204). Die Einschränkungen dieser etablierten Marker werden auch innerhalb dieser Kohorte deutlich sichtbar. Zum Beispiel zeigen die beiden am häufigsten verwendeten Nierenfunktionsparameter, ACR und eGFR, keine signifikante Korrelation nach Spearman. Dies unterstreicht die Herausforderungen und Defizite der herkömmlichen Marker in Bezug auf die umfassende Bewertung der Nierenfunktion.

5.1.5.1 Vesikuläres Albumin und Nierengesundheit

Unsere Untersuchungen haben weiter ergeben, dass zwischen vesikulärem Albumin und der eGFR keine signifikante Korrelation besteht. Es gibt mehrere plausible Erklärungen für dieses beobachtete Fehlen einer Assoziation: Eine Ursache könnte in der Fehlinterpretation der eGFR bei älteren Menschen liegen. Eine unzureichende Berücksichtigung des altersbedingten Muskelabbaus, der die Serumkreatininspiegel beeinflusst, kann dazu führen, dass die eGFR die Nierenfunktion bei älteren Probanden überschätzt. Auch Rhabdomyolyse oder Sarkopenie, die den Kreatininstoffwechsel beeinflussen, können zur Variation beitragen.

Zweitens sollte in Erwägung gezogen werden, dass die eGFR nur verzögert auf Veränderungen in der Nierenfiltrationsfunktion reagiert. Der "Kreatinin-blinde Bereich" ist zu groß, um subtile Veränderungen in der Nierenfunktion frühzeitig zu erfassen. In einigen Fällen könnte die Nierenfunktion deshalb erheblich

eingeschränkter sein, als es die eGFR nahelegt, und könnte so das beobachtete Fehlen einer Verbindung zwischen vesikulärem Albumin und eGFR erklären. Dies betont erneut die Notwendigkeit einer verbesserten Frühdiagnostik, um die Nierenfunktionsänderungen in einem früheren Stadium zu erfassen und rechtzeitige Interventionen zu ermöglichen (150, 205).

Hingegen gibt es einen statistisch signifikanten Zusammenhang von vesikulärem Albumin und der Albumin-Kreatinin-Ratio. Mit zunehmendem Stadium der ACR steigt auch die Menge an vesikulärem Albumin im Endharn. In der Gruppe mit milder Albuminurie (A1) fallen sowohl Mittelwert als auch Varianz deutlich geringer aus als in den Stadien der moderaten (A2), bzw. schweren Albuminurie (A3). Zwischen den Stadien A2 und A3 hingegen nimmt vor allem die Standardabweichung stark zu, der weitere Anstieg des vesikulären Albumins ist hingegen nicht statistisch signifikant. Das Stadium A3 nach KDIGO ist definiert als $ACR > 300 \text{ mg/g}$. Diese nach oben hin offene Definition ergibt eine kleine, heterogene Subgruppe innerhalb der Kohorte von 3 Männern mit geschätzten glomerulären Filtrationsraten, die Werte von 9,9 bis $71,6 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ umspannen.

Durch die oben beschriebene Genese der albuminhaltigen Vesikel kann folgende Erklärung für die große Varianz gefunden werden: Podozyten nehmen das im subpodozytären Raum anfallende Albumin endozytotisch auf. Sie können das aufgenommene Albumin sowohl durch Transzytose als Vesikel an den Harnraum abgeben, als auch durch lysosomale Degradierung abbauen. Die im Endharn vorhandene Menge an albuminhaltigen Vesikeln hängt also von dem Gleichgewicht zwischen diesen beiden Prozessen ab. Die Transzytose der Vesikel ist ein energieaufwendiger Prozess. Membranproteine gehen verloren und die ausgeschleusten Proteine sind für nicht wiederverwertbar (96, 202). Eine übermäßige Transzytose löst proinflammatorische und proapoptotische Signalkaskaden in den Podozyten aus, was zum Verlust der hochdifferenzierten Zellen führt. Dies hinterlässt freiliegende Bereiche auf der glomerulären Basalmembran. Die glomeruläre Filtrationsbarriere kann nicht aufrechterhalten werden, was zu einer renalen Albuminurie führt. Gleichzeitig nimmt die Anzahl der Podozyten ab, die für die Transzytose des Albumins verantwortlich sind. Im Falle einer fortgeschrittenen Kompromittierung der glomerulären Filtrationsbarriere ist es also denkbar, dass große Mengen an freiem Albumin und nur geringe Mengen an

vesikulärem Albumin im Endharn nachweisbar sind, was die Variabilität des Parameters erklären würde.

Die Diagnose der chronischen Nierenerkrankung (CKD) erfolgt anhand der Laborparameter eGFR und ACR, wobei fünf verschiedene Stadien nach KDIGO differenziert werden (siehe 1.4). In der Gruppe der nach KDIGO-Kriterien nierenkranken Probandinnen und Probanden finden sich signifikant höhere Werte von vesikulärem Albumin als in der nierengesunden Subgruppe. Da es keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen vesikulärem Albumin und eGFR gibt, beruht das auf dem Zusammenhang des vesikulären Albumins mit der ACR, die ein zentrales diagnostisches Kriterium für CKD nach der KDIGO-Definition darstellt und somit eine enge Beziehung zwischen den beiden Kategorien zu erwarten ist.

Zusammenfassend konnte keine Korrelation zwischen vesikulärem Albumin und eGFR festgestellt werden wohl aber zwischen vesikulärem Albumin und ACR. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die eGFR, insbesondere im höheren Lebensalter, Veränderungen der Nierenfunktion nur verzögert abbildet. Im Gegensatz dazu zeigt die statistisch signifikante Verbindung zwischen vesikulärem Albumin und der ACR an: Höhere Albuminurie-Stadien gingen mit einer Zunahme des vesikulären Albumins im Urin einher. Darüber hinaus wiesen Personen mit chronischer Nierenerkrankung gemäß KDIGO-Kriterien höhere Werte an vesikulärem Albumin auf als Gesunde, was die enge Beziehung zwischen vesikulärem Albumin und der ACR als diagnostischen Marker für Nierenerkrankungen unterstreicht.

5.1.5.2 Vesikuläres Podocalyxin und Nierengesundheit

Im Gegensatz zum vesikulären Albumin korreliert das vesikuläre Podocalyxin statistisch signifikant mit einer niedrigeren eGFR innerhalb der weiblichen Subgruppe unserer Kohorte, wie unter 4.3.5 angegeben. In der männlichen Kohorte gibt es hingegen keine statistisch signifikante Korrelation.

Die negative Verbindung zwischen dem Alter und der eGFR, kombiniert mit der Korrelation des vesikulären Podocalyxins mit zunehmendem Alter, legt nahe, dass das Altern die Nierenfunktion beeinflusst und dieser Marker das widerspiegeln könnte. Für ein besseres Verständnis über die Aussagekraft des vesikulären Podocalyxins müssen offene Fragen in weiteren Versuchen adressiert werden.

Im Gegensatz zum vesikulären Albumin zeigt das vesikuläre Podocalyxin keine Verbindung zur Albumin-Kreatinin-Ratio oder den CKD-Stadien nach KDIGO.

Zusammenfassend legen diese Unterschiede sowie die erhebliche Varianz zwischen den beiden Parametern nahe, dass beide Marker möglicherweise unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen abbilden und daher als separate, unabhängige Marker betrachtet werden sollten. Ihre potenziell komplementäre Rolle könnte zu einer umfassenderen Bewertung der Nierenfunktion beitragen. Um diese Hypothese weiter zu untermauern, sind jedoch zusätzliche Studien erforderlich. Insbesondere sind Untersuchungen zur genaueren Zusammensetzung der podozytären Vesikel erforderlich, sowie zum Zusammenhang mit der Zellintegrität der Podozyten – immer im Hinblick auf die geschlechtsspezifischen Unterschiede.

5.1.6 Vesikuläres Albumin und Podocalyxin im Zusammenhang mit systemischer Inflammation

Die Korrelation von C-reaktivem Protein mit den beiden neuen Markern, vesikuläres Albumin und vesikuläres Podocalyxin, weist auf den prognostischen Wert dieser Vesikel in Bezug auf die Pathogenese von CKD hin.

Die nachgewiesene Korrelation zwischen C-reaktiven Protein (CRP), einem etablierten Entzündungsmarker, und den beiden neu identifizierten Markern, vesikuläres Albumin und vesikuläres Podocalyxin, legt nahe, dass diese Vesikel einen bedeutenden prognostischen Wert für Entstehung und Fortschreiten chronischer Nierenerkrankungen haben. Ihre Verbindung zu CRP weist auch darauf hin, dass diese Vesikel aktiv in die mechanistischen und kausalen Prozesse der Krankheitsentstehung eingebunden sein könnten, insbesondere im Hinblick auf entzündungsgetriebene Prozesse, die für CKD charakteristisch sind.

Es wurde bereits unter 1.6 und 1.7 ausführlich auf die entzündliche Komponente bei Entwicklung und Fortschreiten der chronischen Nierenerkrankungen eingegangen. Vor diesem Hintergrund ist es nicht überraschend, dass hohe Serumspiegel von Entzündungsmarkern wie CRP mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf einhergehen, was sich in einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, kardiovaskuläre Sterblichkeit und Gesamtsterblichkeit manifestiert (206–208).

Allerdings geht die Rolle von CRP in diesem Zusammenhang über die eines Entzündungsmarkers hinaus, da es selbst einen Mediator der pathologischen Vorgänge darstellt. CRP bindet an Low-Density Lipoprotein (LDL), erleichtert dessen Ablagerung in der Arterienwand, aktiviert das Komplementsystem und ist damit ein Wegbereiter der beschleunigten Atherosklerose und des kardiovaskulären Risikoprofils bei Patientinnen und Patienten mit Niereninsuffizienz (207–212).

Da vesikuläres Albumin und Podocalyxin enger mit dem prognostisch und pathophysiologisch wichtigen Serum-CRP-Wert und den entzündlichen Prozessen in Verbindung stehen als herkömmliche Nierenmarker, kann ihre Bestimmung dazu beitragen, die Prognosefähigkeit im Krankheitsverlauf zu verbessern, und Entzündungen und deren Auswirkungen auf die Nierenfunktion früher zu erkennen, um so frühzeitige Interventionen zu ermöglichen, bevor schwerwiegendere Schäden auftreten. Auch eine gezielte Therapie der Inflammationskomponente der CKD ist vielversprechend (207–209, 211).

Die Tatsache, dass die Vesikel-Marker signifikant mit dem Serum-CRP korrelieren, während herkömmliche Nierenmarker dies nicht tun, legt nahe, dass sie zusätzliche Informationen über die Gesundheit der Probandinnen und Probanden bieten, sie könnten daher auch ein geeigneter Marker zur Therapiekontrolle werden.

5.1.7 Geschlechtsabhängige Unterschiede

5.1.7.1 Etablierte Nierenwerte

Alle in unserer Studie bestimmten Nierenparameter mit Ausnahme der eGFR weisen signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern auf.

Merkmal	Frauen (n=58)	Männer (n=45)
Serum-Kreatinin [mg/dl] (MW $\pm$ σ)	0,87 $\pm$ 0,26	1,18 $\pm$ 0,67
eGFR [CKD-EPI; ml/min/1,73m ²] (MW $\pm$ σ)	66,62 $\pm$ 15,87	65,13 $\pm$ 17,34
Albumin Urin (mg/l) (MW $\pm$ σ)	17,81 $\pm$ 4,70	65,53 $\pm$ 20,69
Albumin-Kreatinin-Ratio [mg/g] (MW $\pm$ σ)	32,80 $\pm$ 52,16	71,78 $\pm$ 151,91
Prävalenz CKD ^a (%)	26 (44,8%)	21 (46,7%)

Tabelle 17: Übersicht der in unserer Kohorte beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede bei den herkömmlichen Nierenparametern

Die Studienlage zu geschlechtsspezifischen Unterschieden bei Diagnostik und Verlauf von Nierenerkrankungen ist schwierig. Dem Thema ist erst in den letzten Jahren vermehrte Aufmerksamkeit zuteilgeworden. Einige der Ergebnisse aus Tierversuchen lassen sich nicht auf den Menschen übertragen. Zudem ist die Auswertung der vorhandenen Studien erschwert durch uneinheitliche Verwendung von Laborparametern und Cut-Off-Werten, sowie eine sehr heterogene Selektion von Probandinnen und Probanden in Hinblick auf Alter, Vorerkrankungen und Ätiologie der CKD. Oft wird bei der Analyse nicht auf sozioökonomische Faktoren oder Ernährung eingegangen, die weitere Confounder darstellen können. Zudem sind die publizierten Ergebnisse nicht selten widersprüchlich (213–215).

Die Serumkreatininkonzentration ist unter den männlichen Studienteilnehmern ungleich höher als unter den weiblichen Teilnehmerinnen (1,18 mg/dl vgl. mit 0,87 mg/dl). Kreatinin ist ein Abbauprodukt des Energiestoffwechsels der Muskulatur und als solches nicht nur abhängig von der renalen Kreatinin-Clearance, sondern ebenfalls von der Muskelmasse. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede des Serumkreatininspiegels sind wahrscheinlich auf die unterschiedliche Muskelmasse zurückzuführen (205, 216).

Auch die Urinkreatininkonzentration ist in der männlichen Subpopulation unserer Studienkohorte höher. Diese Beobachtung deckt sich mit zahlreichen anderen Publikationen (189, 217). Die Bestimmung der Urinkreatininkonzentration dient der Beurteilung der Nierenfunktion und der Überprüfung der Urinkonzentration. Die Urinkreatininkonzentration liegt gemeinsam mit der Serumkreatininkonzentration der Berechnung der eGFR zugrunde und als Konzentrationsmaß des Urins dient sie als Normierungsvariable der Bestimmung der Proteinurie als Albumin-Kreatinin-Ratio (siehe 1.4). Die Urinkreatininkonzentration ist abhängig von der Nierenfunktion und der Serumkreatininkonzentration. Unterschiede in der Urinkreatininkonzentration zwischen Männern und Frauen sind daher ebenfalls durch Unterschiede in der Muskelmasse begründbar.

Allerdings zeigt auch die Urinosmolarität – als weiteres Konzentrationsmaß des Urins – signifikante Unterschiede zwischen Männern und Frauen. Während in der männlichen Teilgruppe die durchschnittliche Osmolalität bei 626 mosmol/l liegt, ist sie in der weiblichen Subgruppe mit 504 mosmol/l deutlich niedriger. Diese

Unterschiede in der Harnkonzentration finden sich sowohl in Richtung als auch Ausprägung in den Ergebnissen vorangegangener Studien wieder (189, 218). Da es sich bei unseren Proben um On-Spot-Urin und nicht um Sammelurin handelt, kann keine Aussage über das Urinvolumen getroffen werden, laut Perinpan et al. besteht diese Korrelation auch dann weiter, wenn man für das Urinvolumen adjustiert. Männer scheiden also im Tagesverlauf mehr osmotisch wirksame Teilchen aus als Frauen. Dies scheint sich auch in der Genese von Nierensteinen widerzuspiegeln und in Kombination mit Unterschieden in den Ernährungsgewohnheiten zu den höheren Fallzahlen männlicher Nierensteinbildner beizutragen. Als wahrscheinlichste Erklärung für diese Differenzen gelten unterschiedliche Vasopressin-Sensitivität und Durstgefühl zwischen Frauen und Männern. Auch der direkte Einfluss von Sexualhormonen auf die Konzentrationsfähigkeit der Nieren wird diskutiert. Dagegen sprechen allerdings Untersuchungen der Urinosmolalität bei Kindern, die gezeigt haben, dass die Urinosmolarität der Mädchen bereits im Kindesalter signifikant unter der gleichaltriger Jungen liegt (218, 219).

Klinisch relevant für die Diagnostik und Verlaufskontrolle von Nierenerkrankungen sind die Bestimmung von Albumin im Urin (UAE – urinary albumin excretion) und Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR). In der AugUR-Kohorte, die dieser Arbeit zugrunde liegt, ist die UAE und die ACR in der männlichen Studienpopulation höher als unter den weiblichen Studienteilnehmerinnen. Zudem ist sie größeren Schwankungen unterworfen. Die Beobachtung, dass Männer mehr Albumin mit dem Urin ausscheiden als Frauen, ist allgemein anerkannt und vielfach bestätigt. Das bezieht sich sowohl auf Microalbuminurie als auch auf Makroalbuminurie (213, 220–222). Es sei jedoch auch erwähnt, dass mindestens eine Studie einen entgegengesetzten Zusammenhang publizierte – demnach würden Frauen mehr Albumin im Urin ausscheiden als Männer. Allerdings kam die Arbeitsgruppe um Jones et al. mithilfe einer alleinigen Bestimmung der ACR zu diesem Ergebnis. Dieser Ansatz steht in der Kritik, da Kreatinin, wie oben erklärt, ein geschlechtsspezifischer Parameter ist (221, 223).

In unserer Kohorte zeigen sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der errechneten glomerulären Filtrationsrate. Der Berechnung der eGFR bei Erwachsenen liegt meist die CKD-EPI-Formel (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) oder die MDRD-Formel (Modification of Diet in Renal

Disease) zugrunde. Beide Formeln werden an das Geschlecht angeglichen, um trotz unterschiedlicher Serum- und Urinkreatininkonzentrationen zwischen Männern und Frauen vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Auch Dorothea Nitsch et al. fanden 2013 in einer großen Metanalyse aus gepoolten Ergebnissen von über zwei Millionen Patientinnen und Patienten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der eGFR zwischen Männern und Frauen (217). Zu dem gleichen Ergebnis gelangten auch Ana Ricardo et al. (224) anhand der CKD-Patientinnen und Patienten der CRIC-Kohorte (Chronic Renal Insufficiency Cohort), sowie weitere Arbeitsgruppen (225). Andere Untersuchungen wie die von Muiesan et al. durchgeführte I-DEMAND Studie aus Italien ergaben eine höhere glomeruläre Filtrationsrate für Männer als für Frauen (213).

26 Frauen (44,8% der Frauen) und 21 Männer (46,7% der Männer) in unserer Kohorte fallen unter die Diagnosekriterien der CKD. Statistisch ergibt sich somit zwar kein signifikanter Unterschied, aber ein Trend, dass Frauen eine höhere CKD-Inzidenz haben, den auch andere Arbeitsgruppen beschrieben haben (151, 214, 226–233).

Die Gründe für die Unterschiede in der Nierenfunktion zwischen den Geschlechtern sind nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene Erklärungen sind denkbar: Unterschiede in der Größe der Nieren, in der Anzahl der Nephrone oder dem Aufbau der Glomeruli und damit einhergehende unterschiedliche Filtrationsraten und hämodynamische Druckverhältnisse im systemischen Kreislauf oder den Nierengefäßen werden diskutiert. Auch Unterschiede in der Verteilung von systemischen Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Salz-Sensitivität und Lifestylefaktoren wie Rauchen und Therapieadhärenz scheinen plausibel. Nicht zuletzt scheint es viele direkte Effekte der Sexualhormone auf die Nierenfunktion zu geben. Auf diese Erklärungsmodelle und die daraus abzuleitenden Implikationen wird im Folgenden näher eingegangen:

Unterschiede in Aufbau oder Anzahl der Glomeruli und der renalen Hämodynamik wurden im Tierversuch erforscht mit dem Ergebnis, dass bei vielen Kleintieren Männchen meist größere Nieren haben als Weibchen. Dieser Zusammenhang bleibt auch dann signifikant, wenn man für das Körpergewicht adjustiert und er wird wahrscheinlich durch Androgeneinfluss moderiert (234). Der Versuch, diese

Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen verliefen jedoch erfolglos.

Größenunterschiede der Nieren werden durch Adjustierung auf die Körperoberfläche vollständig aufgehoben. Gleiches gilt für die Größe der einzelnen Glomeruli. Der initial beobachtete Größenunterschied korreliert einzig mit der Körperoberfläche, nicht aber unabhängig davon mit dem Geschlecht. In Metaanalysen zeigt sich außerdem, dass die Anzahl der Glomeruli sich nicht signifikant zwischen Männern und Frauen unterscheidet (230, 235, 236).

Systemische Risikofaktoren für CKD sind nicht gleichmäßig zwischen Männern und Frauen verteilt: Diabetes mellitus, insbesondere Typ-2, stellt eine bedeutende Ursache für Nierenerkrankungen im Allgemeinen und Albuminurie im Speziellen dar. In unserer Studienkohorte gaben 13,8% der Frauen und 20,0% der Männer an, unter Diabetes mellitus zu leiden. Obwohl im Mittel keine Unterschiede im HbA1c nachweisbar sind, fallen mehr Männer (11,1%) als Frauen (5,2%) unter die Diabeteskriterien des HbA1c. Obwohl Frauen statistisch gesehen eher übergewichtig sind als Männer, sind sie trotzdem seltener von Diabetes Mellitus betroffen (237). Dies dürfte auf Unterschiede in der Fettverteilung und Stoffwechselaktivität der Adipozyten zurückzuführen sein, da Fettgewebe bei Frauen vorteilhaft subkutan verteilt ist, metabolisch aktiver und insulinsensitiver ist als bei Männern. Dieser Effekt wird durch Geschlechtshormone wie Östrogen moderiert und nimmt dementsprechend nach Eintritt in die Postmenopause ab (232, 238).

Hypertonie ist sowohl ein Risikofaktor als auch Folgeerscheinung der CKD. In der von uns untersuchten Kohorte ist die Prävalenz von Bluthochdruck bei Frauen jedoch weiterhin geringer als bei den Männern: Obwohl wir keine Unterschiede im Mittelwert des systolischen Blutdrucks finden, fallen mehr Männer unter die Diagnosekriterien einer Hypertonie als Frauen. Vor Eintritt in die Menopause haben Frauen häufig niedrigere Blutdruckwerte als gleichaltrige Männern (239–242). Postmenopausal kehrt dieser Trend sich um. Nach den Untersuchungen, die Dariush Mozaffarian im Report der American Heart Association (AHA) 2015 zusammenstellte, neigen in der Altersgruppe über 65 Jahren Frauen dann tendenziell zu einem höheren Blutdruck (239–241).

Außerdem beeinflussen Sexualhormone die Nierenfunktion direkt, wobei ihre Wirkung auf den Verlauf von chronischen Nierenerkrankungen schwer vorhersehbar

ist und vermutlich von der jeweiligen Ursache der CKD abhängt. Häufig wird eine schützende Wirkung von Östrogen und eine nachteilige Wirkung von Testosteron beschrieben. Diese Effekte lassen sich auf die hormonelle Regulation des Renin-Angiotensin-Systems, anti-fibrotische Effekte des Östrogens und indirekte Vasodilatation durch Induktion der Stickstoffmonoxid-Synthetase zurückführen (241).

Östrogen schwächt die hypertensiven Effekte des RAAS ab, indem die Expression und Transkription der ACE gehemmt und so die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II reduziert wird. Ebenso wird die Expression der AT₂-Rezeptoren herauf- und die der AT₁-Rezeptoren herabreguliert und so die hypertensive Wirkung reduziert (241–243). Auch die Promotorregion des Renin-Gens ist östrogenempfindlich. Der Effekt des Östrogens auf das Estrogen-Response-Element des Renin-Gens wird jedoch von verschiedenen Arbeitsgruppen widersprüchlich bewertet und ist wahrscheinlich dosisabhängig: Während in Studien von Frauen, die postmenopausal niedrigdosierte Hormonersatztherapie erhalten, niedrigere Plasmareninspiegel nachweisbar waren als in der Vergleichsgruppe, waren in Studien mit prämenopausalen Frauen, die höherdosierte orale Kontrazeptiva einnehmen, kompensatorisch erhöhte Plasmareninspiegel nachweisbar. In physiologischen Konzentrationen bewirkt Östrogen durch die reduzierten Spiegel und die abgeschwächte Wirkung von Angiotensin II, welches der vorrangige Effektor des RAAS ist, eine Reduktion des Drucks in den abführenden Arteriolen und der glomeruläre Filtrationsdruck sinkt (244). Über die Veränderungen der renalen Hämodynamik hinaus, steigert das RAAS auch die Permeabilität der glomerulären Kapillaren und damit den Filtrationskoeffizienten für Albumin, wie Georg Eisenbach bereits 1975 zeigen konnte und was seither in vielen Studien bestätigt wurde (138, 161, 222, 245–247). So trägt Östrogen dazu bei, dass Frauen geringere UAE aufweisen als Männer.

Ein weiterer Mechanismus, über den Östrogen renoprotektiv wirken kann ist die Induktion der Stickstoffmonoxid-Synthetase (NOS) in den Endothelzellen der Glomerulusgefäßschlingen. Durch die lokal-chemische Vasodilatation sinkt ebenfalls der Gefäßwiderstand der efferenten Arteriolen und damit der glomeruläre Filtrationsdruck (248, 249). Diese Beobachtung aus dem Tierversuch wurde auch im Menschen wiedergefunden: Sofia Ahmed et al. konnten zeigen, dass die Endothelzellen der Glomerulusgefäßschlingen von Männern mit steigendem Alter

stärker auf das generierte NO angewiesen sind, als es bei gleichaltrigen Frauen der Fall ist. Daraus schlossen sie, dass die NOS einen wichtigen Baustein in der Erklärung der schlechteren Prognose von CKD bei Männern darstellt (225).

Ein weiterer, nicht zu unterschätzender Faktor ist der Beitrag des RAAS zu lokaler Inflammationsreaktion und fibrotischen Umbauprozessen in der Niere, vermittelt durch TGF- β . Die hormonelle Regulation des RAAS kann also auf mehreren Wegen zu den beobachteten Unterschieden beitragen (244, 247, 250).

In Anbetracht dieser Informationen ergeben sich einige zentrale Fragestellungen, die im Folgenden näher betrachtet werden sollten. Warum sind Frauen häufiger von chronischer Nierenerkrankung (CKD) betroffen? Weshalb verläuft CKD bei Frauen langsamer als bei Männern? Welche Auswirkungen hat die Menopause auf die Nierengesundheit? Und warum spiegeln sich die in der Literatur beschriebenen postmenopausalen Veränderungen der kardiovaskulären und renalen Risikofaktoren nicht in unserer Kohorte wider?

Warum sind Frauen häufiger von CKD betroffen?

In Anbetracht der vorteilhaften Verteilung von Risikofaktoren und der renoprotektiven Wirkung von Östrogen ist es nicht leicht zu verstehen, warum Frauen häufiger von CKD betroffen sind als Männer. Oftmals werden der altersabhängige Rückgang der GFR in Kombination mit dem durchschnittlich höheren Lebensalter von Frauen als Erklärung benannt. Auch eine fehlerhafte Berechnung der eGFR durch die verwendeten Formeln, die v.a. an männlichen Probanden validiert wurden können zu den überproportionalen CKD-Statistiken beitragen (228). Eine Sekundäranalyse der Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis-Studienkohorte (MESA) aus dem Jahr 2016 untersuchte die glomeruläre Filtrationsrate (mGFR, gemessen durch die Plasma-Clearance von Iohexol) bei 294 zufällig ausgewählten, ethnisch diversen und ansonsten gesunden Erwachsenen (48% Frauen). In Übereinstimmung mit früheren Studien wurde beobachtet, dass Frauen eine niedrigere mGFR als Männer hatten (mittlerer Unterschied 21,39 ml/min). Dieser Unterschied war jedoch nach einer Korrektur für die Körperoberfläche deutlich geringer (mittlerer Unterschied nach Korrektur 9,34 ml/min) (251). Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte außerdem die gemessene GFR (mGFR) auf Basis der Iohexol-Clearance mit der geschätzten GFR

(eGFR) auf Basis verschiedener Formeln und kamen zu der Erkenntnis, dass die eGFR bei Frauen die mGFR häufiger unterschätzte, als das bei Männern der Fall war. Diese Verzerrung trägt dazu bei, dass die tatsächliche Nierenfunktion von Frauen systematisch unterschätzt werden könnte. Das kann zu den hohen CKD-Prävalenzen unter Frauen beitragen (252). Einige Forscherinnen und Forscher fordern deshalb geschlechtsspezifische Cut-Off-Werte für die CKD-Diagnostik bei Frauen (253, 254).

Wieso verläuft CKD bei Frauen langsamer als bei Männern?

Forscherinnen und Forscher, die sich mit Unterschieden der Progression von Nierenerkrankungen zwischen den Geschlechtern beschäftigen, kommen zu teils widersprüchlichen Ergebnissen. Im Einklang mit der Theorie, dass die Nierenfunktion bei alternden Frauen systematisch unterschätzt wird, stehen Publikationen, die beschreiben, dass die meisten Nierenerkrankungen in Frauen langsamer heranschreiten als in männlichen Vergleichsgruppen, wie beispielsweise eine große Analyse von Silbiger und Neugarten (229–231) oder die Arbeiten von Ricardo et al. (224) auf die weiter oben bereits eingegangen wurde, sowie viele andere. Aber Jafar et al. kommen zu einem anderen Ergebnis: Anhand einer Kohorte aus 11 gepoolten Randomized Controlled Trials (RCT) zur renoprotektiven Wirkung von ACE-Inhibitoren untersuchten sie das Progressionsrisiko zwischen Männern und Frauen mit nicht-diabetischer Niereninsuffizienz. Nach Adjustierungen für andere assoziierte Risikofaktoren und Therapieansprechen kommen sie – im Unterschied zu vorangegangenen Untersuchungen – zu dem Ergebnis, dass Frauen keine langsamere Progression ihrer Nierenerkrankungen haben als Männer (255). Nitsch et al. schlossen sich einige Jahre später der Risikobewertung von Jafar et al. an: „[...] there was no evidence of a sex difference in associations of estimated glomerular filtration rate and urinary albumin excretion rate with end-stage renal disease risk.“ (217)

Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind auf verschiedene analysebedingte Ursachen zurückzuführen: Die Kohorten der zugrundeliegenden Studien sind nicht uniform, sondern unterscheiden sich in Ätiologie der CKD, in Alter und hormonellem Status der Teilnehmenden. Auch die zur Progressionsrisiko-Analyse hinzugezogenen

statistischen Methoden und gewählten Endpunkte unterscheiden sich. Zu den physiologischen Unterschieden in der Niere kommen soziologische Aspekte hinzu: Männer nehmen mehr Nierenersatztherapieverfahren in Anspruch als Frauen. Nach der NHANES-Studie sind mehr Männer als Frauen Dialysepatienten und sechzig Prozent der Menschen auf Organspende-Wartelisten sind männlich. Das spiegelt neben der höheren Anzahl von Männern mit ESRD auch wider, dass Frauen sich trotz schlechter Nierenfunktion häufiger für konservative Therapieoptionen entscheiden, weniger ärztliche und soziale Anbindung erfahren. So ist die eGFR bei der ein Nierenersatzverfahren initiiert wird, bei Frauen im Durchschnitt niedriger als bei Männern. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass Frauen aufgrund der langsameren Progredienz häufig versterben, bevor sie dialysepflichtig werden (228). Trotz wachsender Erkenntnis und verbesserter Studienlage konnte also noch kein abschließender Konsens zur Auswirkung des Geschlechtes auf die Progression von Nierenerkrankungen gefunden werden. Zur Risikobeurteilung kommt erschwerend hinzu, dass der Hormonstatus von Frauen im Laufe ihres Lebens drastischen Schwankungen und Veränderungen unterworfen ist und damit auch die renoprotektiven Eigenschaften, die dem Östrogen zugerechnet werden.

Was ist der Einfluss der Menopause auf die Nierengesundheit?

Die Menopause wird als Zeitraum von 12 Monaten nach der letzten Menstruation definiert und markiert drastische hormonelle Veränderungen: Der Östrogenspiegel ab, was mit Zunahme des Körperfettanteils, Dyslipidämien und gestörten Blutzuckerprofilen einhergeht. Es kommt zu einer Umverteilung des Fettgewebes von subkutan zu viszeral. Veränderte Adipokin-Sekretion begünstigt chronische Entzündungsreaktionen. Die physiologische Endothelfunktion wird beeinträchtigt und das vaskuläre Altern beschleunigt. Der Östrogenmangel nach der Menopause führt zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems, zur Hochregulation des potenten Vasokonstriktors Endothelin und zur Beeinträchtigung der durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelten Vasodilatation und reduzierter Elastizität der Arterien, sodass Frauen in postmenopausal häufiger von Hypertonie betroffen sind als gleichaltrige Männer. Menopause per se stellt einen Risikofaktor für kardiovaskuläre sowie zerebrovaskuläre Ereignisse und andere Krankheiten dar (256–259). Darunter auch

chronische Nierenerkrankungen: Yu et al. haben 2009 untersucht, wie sich Inzidenz und Risikofaktoren von CKD im Laufe eines Lebens verändern. Besonderer Fokus lag hierbei auf Unterschieden zwischen Männern und Frauen im Alterungsverlauf. Vor dem 50. Lebensjahr waren für beide Geschlechter niedrige CKD-Inzidenzraten zu verzeichnen. Ab dem 50. Lebensjahr imponierte ein steiler Anstieg der CKD-Prävalenz beider Geschlechter, wobei die Inzidenzraten bei Frauen mit steigendem Lebensalter deutlich steiler anstieg als die korrespondierende Kurve der männlichen Vergleichsgruppe. Mit steigendem Alter war ebenfalls ein Anstieg in der Prävalenz des metabolischen Syndroms – einem Risikofaktor für die Entstehung der CKD – zu verzeichnen, der ebenfalls beide Geschlechter betraf. Während dieser Anstieg in der männlichen Population konstant verlief, zeigte sich in der weiblichen Kohorte wiederum ein Knick um das 40. Lebensjahr, mit einem steileren Anstieg der Kurve nach dem Erreichen der Menopause. Eine Regressionsanalyse der Risikofaktoren zeigte, dass in der weiblichen Kohorte das metabolische Syndrom erst postmenopausal ein signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung ist – anders verhält es sich in der männlichen Vergleichsgruppe, in der MS besonders vor dem 60. Lebensjahr einen signifikanten Risikofaktor darstellt. Besonders in androgen-dominierten Lebensabschnitten kommen die negativen Folgen des metabolischen Syndroms, sowie die Teilaspekte des Syndromkomplexes für die Nierenfunktion zum Tragen. Diese Ergebnisse sind in weiten Teilen deckungsgleich mit Studien von weiteren Arbeitsgruppen, die die Ergebnisse ebenfalls dem vorteilhaften Einfluss der Östrogene und potenziell nachteiligem Testosteroneinfluss zuschreiben (229, 260–262). Es eröffnen sich auch mögliche therapeutische Anwendungen. So könnte der Einsatz von Hormonersatztherapie mit Östrogen-Präparaten das Risikoprofil und den CKD-Verlauf postmenopausaler Frauen verbessern (248, 249, 263, 264).

Unsere Ergebnisse über die geschlechtsabhängigen Unterschiede von Nierengesundheit, Übergewicht, Diabetesprävalenz und systemischem Blutdruck decken sich in weiten Teilen mit publizierten Daten aus großen Studien (224, 248, 259, 265–268). Allerdings zeigen sich in unserer Kohorte auffällige Abweichungen in Bezug auf den Blutdruck: Wir konnten keine signifikanten Unterschiede im systolischen oder diastolischen Blutdruck zwischen Frauen und Männern feststellen (130 mmHg vs. 132 mmHg systolisch und 76 mmHg vs. 73 mmHg diastolisch). Der in

anderen Studien beschriebene Prävalenzanstieg mit Umkehr der Geschlechterverhältnisse findet in unserer Kohorte keine Entsprechung (241). Stattdessen erfüllen mehr Männer als Frauen die Hypertonie-Kriterien.

In unserer Studienpopulation, deren Durchschnittsalter bei 79,3 Jahren liegt und bei der alle Teilnehmenden mindestens 70 Jahre alt sind, ist kaum von einem relevanten Anteil prämenopausaler Frauen auszugehen (258). Zudem hat keine der Frauen angegeben, Hormonpräparate einzunehmen. Die in anderen Studien beschriebene postmenopausale Umkehr der Prävalenzen von Hypertonie, Adipositas und Diabetes Mellitus lässt sich in unserer Kohorte nicht bestätigen. Stattdessen weisen Frauen auch postmenopausal ein ähnliches oder sogar besseres Risikoprofil im Vergleich zu gleichaltrigen Männern auf.

Methodische Unterschiede könnten eine Rolle bei dieser Abweichung zu anderen Publikationen spielen: Die eingeschlossene Kohorte besteht ausschließlich aus Menschen in sehr hohem Lebensalter, wodurch eine mögliche Verzerrung hin zu einem besonders resilienten Subkollektiv vorliegen könnte. Frauen, die ein hohes Alter erreichen, könnten genetische oder umweltbedingte Schutzfaktoren aufweisen, die ihre kardiovaskuläre und renale Gesundheit positiv beeinflusst haben. Darüber hinaus könnten langfristige Anpassungen an den Östrogenentzug der Menopause zur Stabilisierung des Risikoprofils beigetragen haben.

Unsere Kohorte ist durch Alter und Herkunft aus einem konservativ geprägten Umfeld entnommen, in dem Geschlechterrollen stärker etabliert sind und gesundheitsförderliches Verhalten das Risikoprofil über den Einfluss der Sexualhormone hinaus prägen könnte. Verhaltensunterschiede in Stressbewältigung, Ernährung, Bewegung, Rauchanamnese oder der Nutzung von Präventions- und Therapieangeboten könnten in unserer Kohorte anders ausgeprägt sein als in der Durchschnittsbevölkerung, was insgesamt zu einem gesundheitlichen Vorteil beitragen könnte (228, 239, 269).

Insbesondere scheinen Frauen in unserer Kohorte von den günstigeren Bedingungen der Prämenopause langfristig zu profitieren. So könnte die Phase niedrigerer Blutdruckwerte prämenopausal eine protektive Wirkung auf die Filtrationsbarriere im Glomerulus und die Resorptionskapazität des proximalen Tubulus haben. Dies könnte den langsameren Verlauf des vaskulären Alterns

erklären. Meyer et al. argumentieren außerdem, dass der Eintritt in die Menopause selbst als Folge prämenopausal vorhandener vaskulärer Risikofaktoren betrachtet werden könnte. Dyslipidämie, Adipositas, Bluthochdruck, Rauchen und chronische Nierenerkrankungen tragen zur Mangel durchblutung der Ovarien und damit zu einem vorzeitigen Eintritt in die Menopause bei, was durch den Östrogenentzug das vaskuläre Altern wiederum beschleunigt. Tatsächlich stellen viele chronische Erkrankungen ein Risiko für eine verfrühte Menopause dar, sodass Ursache und Folge häufig schwer zu unterscheiden sind (270).

Ein möglicher Publikationsbias in früheren Studien könnte ebenfalls eine Rolle spielen. Negative Effekte der Menopause auf die Gesundheit könnten überbetont worden sein, während positive oder neutrale Effekte möglicherweise weniger beachtet wurden.

Abschließend lässt sich sagen, dass die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Häufigkeit und Progression chronischer Nierenerkrankungen (CKD) sowie die Auswirkungen der Menopause auf die Nierengesundheit ein komplexes und noch nicht vollständig geklärtes Forschungsfeld darstellen. Es wurde festgestellt, dass Frauen trotz der als schützend geltenden Wirkung von Östrogen und der vorteilhaften Verteilung von Risikofaktoren häufiger von CKD betroffen sind als Männer. Ein entscheidender Faktor könnte das durchschnittlich höhere Alter von Frauen sowie die fehlerhafte Berechnung der geschätzten GFR (eGFR) bei Frauen sein, da die Berechnungsformeln häufig an männlichen Probanden validiert wurden. Dies könnte zu einer systematischen Unterschätzung der tatsächlichen Nierenfunktion bei Frauen führen, was die hohe Prävalenz von CKD unter Frauen mit beeinflusst.

Die Frage, ob CKD bei Frauen langsamer verläuft als bei Männern, wird in der Literatur uneinheitlich beantwortet. Einerseits zeigen einige Studien, dass CKD in Frauen aufgrund der vorteilhaften Wirkung von Östrogen langsamer progredient ist, während andere Untersuchungen keinen signifikanten Unterschied feststellen konnten. Diese Diskrepanz lässt sich durch unterschiedliche Kohortencharakteristika, Risikofaktoren und Analysemethoden erklären. Zudem spielen soziologische Faktoren wie die Entscheidung für konservative Behandlungsmöglichkeiten und der

Zugang zu Nierenersatztherapien eine Rolle bei der unterschiedlichen Progression der Erkrankung zwischen den Geschlechtern.

Die Menopause stellt einen entscheidenden Wendepunkt im Leben von Frauen dar, da der Rückgang des Östrogenspiegels eine Reihe von gesundheitlichen Veränderungen nach sich zieht. Diese beinhalten eine verstärkte Prävalenz von Bluthochdruck und metabolischen Störungen, die das Risiko für CKD erhöhen können. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass die Menopause nicht zwangsläufig eine negative Auswirkung auf die Nierengesundheit haben muss. In der vorliegenden Kohorte zeigte sich, dass Frauen, auch postmenopausal, ein ähnliches oder sogar besseres Risikoprofil im Vergleich zu gleichaltrigen Männern aufwiesen. Dies könnte durch langfristige Anpassungen an den Östrogenentzug und durch gesundheitsförderndes Verhalten im Alter erklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Mechanismen hinter den geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Nierengesundheit und den Auswirkungen der Menopause auf das Risiko für CKD noch nicht abschließend verstanden sind. Zukünftige Studien sollten sich verstärkt mit den Mediatoren dieser Unterschiede befassen, um ein klareres Bild der biologischen, sozialen und hormonellen Faktoren zu erhalten, die das Risiko für chronische Nierenerkrankungen bei Frauen beeinflussen.

5.1.7.2 Vesikuläres Albumin und Podocalyxin

Neben den eben diskutierten Differenzen bei den etablierten Nierenfunktionsparametern, unterliegen auch die neuen Marker vesikuläres Albumin und Podocalyxin drastischen geschlechtsspezifischen Unterschieden. In unseren Untersuchungen weisen Frauen signifikant mehr vesikuläres Albumin im Endharn auf als Männer. Dieses Ergebnis steht in deutlichem Kontrast zu dem etablierten und auch in unserer eigenen Kohorte bestätigten Befund, dass Männer mehr freies Albumin im Urin haben als Frauen. Das Geschlechterverhältnis beim Podocalyxingehalt der Vesikel verhält sich dazu entgegengesetzt und ist bei Männern signifikant größer als bei Frauen.

Die Tatsache, dass vesikuläres Albumin und Podocalyxin einen ähnlichen Ursprung haben und positiv miteinander korrelieren und dennoch starke

geschlechtsspezifische Unterschiede aufweisen, ist ein interessantes und komplexes Ergebnis. Mögliche Ursachen sind wiederum vielseitig und es gibt Überschneidungen zu den Erklärungsmodellen der eben diskutierten geschlechtsspezifischen Unterschiede bei den etablierten Nierenparametern. Sexualhormone, strukturelle oder genetische Faktoren könnten eine Rolle spielen, ebenso wie der Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.

Hormonelle Erklärungsansätze

In einigen Geweben wurde ein Einfluss von Östrogen auf die Bildung von exosomalen Vesikeln beschrieben. Am besten erforscht ist das Phänomen in Bezug auf die Vesikelbildung von Brustkrebszellen zur Tumorigenese (271–273). Auch in anderen Geweben konnte ein modellierender Einfluss von Östrogen auf die Formation der Exosomen festgestellt werden (274) und in der Niere beschreiben einige Arbeitsgruppen einen steigernden Einfluss von Östrogen und Östradiol auf die Formation von Lysosomen, zytoplasmatischen Einstülpungen und Vesikulationen in den Tubuluszellen (275–277). Der Einfluss der Geschlechtshormone auf die Bildung podozytärer Vesikel ist unseres Wissens nach noch nicht untersucht worden, kann aber möglicherweise zur Erklärung der geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Zusammensetzung der Vesikelfraktion zwischen Männern und Frauen beitragen, denn es ist gesichert, dass Podozyten Rezeptoren für Testosteron und Östrogen haben (278). Das legt nahe, dass diese Hormone direkte Auswirkungen auf die Podozytenfunktion haben (243, 250, 278). Es ist daher plausibel, dass die unterschiedlichen Konzentrationen von Albumin und Podocalyxin der Vesikelfraktion zwischen den Geschlechtern zumindest teilweise auf den Einfluss der Sexualhormone auf die Podozyten zurückzuführen sind.

Es ist schwierig, den Einfluss der Sexualhormone auf die Vesikelformation in den Podozyten anhand unserer Kohorte nachzuvollziehen, da es sich – wie bereits oben erläutert – um eine postmenopausale Kohorte handelt. Obgleich der Östrogenspiegel prämenopausaler Frauen um ein Vielfaches höher ist als bei gleichaltrigen Männern, verhält es sich postmenopausal umgekehrt. Durch die Östrogenbildung in Fettgewebe und Leber haben Männer im Alter einen höheren Östrogenplasmaspiegel als postmenopausale Frauen (279, 280). Trotzdem könnte

die langjährige Östrogenexposition einen Einfluss auf die Nierengesundheit und die Funktion von Podozyten und Tubuluszellen in der Postmenopause haben. Die antioxidative Wirkung und das vorteilhafte Risikoprofil könnten zu einer besseren endothelialen Integrität und stärkerem Schutz der glomerulären Filtrationsbarriere geführt haben. Damit könnte es sich bei dem in der weiblichen Kohorte vermehrt anfallenden vesikulären Albumin um einen Kompensationsmechanismus handeln: Frauen haben weniger freies Albumin, aber kompensatorisch gesteigerte Vesikelproduktion. Das deutet auf eine intakte glomeruläre Filtrationsbarriere und anhaltende Reinigungsfunktion der Podozyten bei struktureller und funktioneller Integrität hin, verglichen mit der männlichen Kohorte, die sich mit hohem freiem Albumin und niedrigerem vesikulärem Albumin präsentieren.

Die höheren Spiegel an freiem Albumin und vesikulärem Podocalyxin unter den männlichen Studienteilnehmern könnten Ausdruck der kumulativen Schäden sein. Podocalyxin ist ein Oberflächenglykoprotein und spielt eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung des komplexen Zytoskeletts (siehe 1.5.3) und der Struktur der Filtrationsschlitze. Der höhere Podocalyxinanteil der Vesikel in der männlichen Kohorte könnte auf einem verstärkten Podozyten-Turnover bzw. „podocyte shedding“ hinweisen. Apoptosekörperchen sind größer und dichter als Exosomen. Größere apoptotische Körperchen können durch den ersten Reinigungsschritt der differenziellen Zentrifugation aus der Urinprobe entfernt werden. Allerdings kann es Überschneidungen im Größenbereich von kleineren apoptotischen Körpern und größeren Vesikeln geben, sodass apoptotische Körperchen bei der Ultrazentrifugation ebenfalls im Exosomenpellet sedimentieren. Es könnte sich bei den isolierten Vesikeln nicht ausschließlich um Transport-Vesikel für Albumin handeln, sondern auch um apoptotische Körperchen – als Ausdruck des Untergangs von Podozyten.

Podozyten exprimieren nicht nur Rezeptoren für Östrogen, sondern auch für Testosteron und mehrere Arbeitsgruppen berichten über einen proapoptotischen Effekt von Testosteron auf die Podozyten. Andersherum wird von anti-apoptotischen und renoprotektiven Effekten von Östrogen, Östradiol und dem selektiven Östrogen-Rezeptor-Agonisten Tamoxifen berichtet (243, 250, 281). Obgleich auch die Sexualhormonproduktion von Männern im Rahmen der Adrenopause im Alter abnimmt, bleibt der Testosteronspiegel höher als bei gleichaltrigen Frauen, sodass

das Zusammenwirken von Langzeitschäden und direkter pro-apoptotischer Testosteron-Wirkung die beobachteten Unterschiede erklären könnte. Allerdings gibt es auch widersprüchliche Forschungsergebnisse zur Testosteronwirkung auf den Verlauf von Nierenerkrankungen (282, 283), sodass weitere mechanistische Untersuchungen vonnöten sein werden, um die komplexen Zusammenhänge und teils gewebespezifischen Wirkungen umfassend zu verstehen.

Genetische Einflüsse

Geschlechtsspezifische Unterschiede in Anatomie und Physiologie der Nieren haben in den letzten Jahren wieder vermehrt Aufmerksamkeit erhalten. Denn auch wenn es an augenscheinlichen anatomischen Unterschieden mangelt (siehe oben) und deswegen der genetische Einfluss häufig als weniger wichtig als der non-genetisch vermittelte Einfluss der Sexualhormone angesehen wird (272, 274), zeigen Genanalysen, dass viele Transporter entlang der Nierentubuli geschlechtsabhängig unterschiedlich exprimiert werden (237, 242). Auch konnten die Gene, die für den AT2-Rezeptor und ACE2 kodieren dem X-Chromosom zugeordnet werden, was eine mögliche genetische Grundlage für Geschlechtsunterschiede bietet (215, 244). Si et al. haben Unterschiede in der Genexpression zwischen männlichen Probanden und weiblichen Probandinnen untersucht, sowohl bei gesunden Nierenspenderrinnen und -spendern als auch bei nierenkranken Personen. Auch wenn das nicht der Fokus ihrer Studie war, zeigen ihre Ergebnisse, dass neben vielen inflammatorisch-regulativen Genen auch Pathways der Vesikelbildung geschlechtsabhängig exprimiert werden – sowohl in Gesundheit als auch in Krankheit (215). Auch eine epigenetische Prägung z.B. durch die langjährige Hormonexposition könnte ein Bindeglied zwischen hormonellen und genetischen Ursachen sein und so zu den beobachteten Unterschieden beitragen.

Einfluss des RAAS, geschlechtsspezifische Wirkung von Angiotensin II

Auch das RAAS, das eine so wichtige Rolle in der Regulation der Nierenfunktion im Allgemeinen und der Albuminurie im Speziellen spielt, könnte geschlechtsspezifische Auswirkungen auf die Vesikelbildung in den Podozyten vermitteln. Denn neben dem

oben ausführlich dargestellten Einfluss von Angiotensin II (ANG II) auf die Filtration von freiem Albumin konnten Schießl et al. auch nachweisen, dass ANG II die Produktion der albuminhaltigen Vesikel in den Podozyten steigert (63, 94, 161). Durch die vermehrte Filtration von Albumin durch das Endothel und die glomeruläre Basalmembran fällt vermehrt Albumin im subpodozytären Raum an. Entsprechend der „Reinigungsfunktion“ der Podozyten nehmen diese das anfallende Protein endozytotisch auf und geben es als Vesikel in den Harnraum ab.

Ein Erklärungsansatz für das vermehrte Vorkommen von albuminhaltigen Vesikeln im Urin der weiblichen Studienteilnehmerinnen wäre daher ein verstärkter Einfluss von ANG II durch den postmenopausalen Wegfall der hemmenden Östrogenwirkung auf das RAAS. Diese Theorie wird durch Studien gestützt, die zeigen, dass Plasma-Angiotensinogenspiegel von postmenopausalen Frauen gleichhoch oder höher sind als bei gleichaltrigen Männern. Es scheint nur marginale Unterschiede zwischen den Plasmakonzentrationen von Aldosteron oder der Plasmaaktivität der ACE zu geben (284, 285). Auch eine geschlechtsspezifische Wirkung der Effektorhormone des RAAS auf die Glomeruli – selbst bei ähnlichen Plasmaspiegeln – könnte eine Rolle spielen (284). So sind die Effekte der RAAS-Inhibitoren auf die glomeruläre Filtration von Albumin nicht identisch zwischen den Geschlechtern. Die geschlechtsspezifische Regulation des RAAS könnte also zu den beobachteten Unterschieden in der Vesikelfraktion zwischen Männern und Frauen beitragen. Darüber hinaus könnte der Einfluss von Medikamenten, insbesondere ACE-Hemmern, relevant sein: Es könnte Unterschiede in der Vorordnungshäufigkeit oder Wirkung der verordneten ACE-Hemmer zwischen Männern und Frauen geben.

Kurz gesagt haben wir in unseren Untersuchungen starke geschlechtsspezifische Unterschiede bei beiden neuen Nierenmarkern festgestellt: Frauen haben mehr vesikuläres Albumin im Urin, während Männer höhere Podocalyxin-Werte in der Vesikelfraktion aufweisen. Diese Differenzen könnten auf hormonelle, genetisch-strukturelle oder RAAS-bedingte Einflüsse zurückzuführen sein. Auch ein Zusammenwirken dieser Mechanismen kann die Funktion der Podozyten beeinflussen und somit die Zusammensetzung der Vesikelfraktion zwischen den Geschlechtern variieren lassen. Die Wichtung der einzelnen Erklärungsansätze bedarf weiterer Studien, um zu einem abschließenden Ergebnis zu kommen. Es bleibt festzuhalten, dass zusätzliche Forschung und mechanistische Untersuchungen

erforderlich sind, um die komplexen Zusammenhänge zwischen Hormonen, Genen und Nierenfunktion im Hinblick auf das Geschlecht vollständig zu verstehen und weiter zur Entwicklung präziserer Diagnostik beizutragen. Diese geschlechtsspezifischen Muster sind jedoch nicht isoliert zu betrachten: Wie die nachfolgende Diskussion zeigt, interagieren sie mit Alterungsprozessen, systemischer Inflammation und pharmakologischen Interventionen – Faktoren, die die klinische Relevanz der Biomarker mitbestimmen.

5.2 Implikationen: Vesikuläre Biomarker als Indikatoren für Nierenfunktion, Alterungsprozesse und therapeutische Interventionen

Die prominenten Unterschiede zwischen vesikulärem Albumin und Podocalyxin im Hinblick auf geschlechts- und altersspezifische Muster sowie systemischer Inflammation und Medikation sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst. Diese unterschiedlichen Zusammenhänge legen nahe, dass es sich bei vesikulärem Albumin und Podocalyxin um zwei separate Parameter mit unterschiedlicher Aussagekraft handelt: Diese Differenzierung bietet eine plausible Erklärung für die inkonsistenten Korrelationen beider Marker mit klassischen renalen Parametern (z. B. eGFR, ACR) und legt nahe, dass sie jeweils unterschiedliche renale Pathomechanismen abbilden. Während vesikuläres Albumin sensitiv auf systemische und glomeruläre endotheliale Prozesse und RAAS-vermittelte Effekte reagiert, reflektiert vesikuläres Podocalyxin vor allem alters- und geschlechtsabhängige Veränderungen der Podozytenintegrität.

Podocalyxin (Vesikel) und eGFR	Je mehr vesikuläres Podocalyxin nachgewiesen wurde, desto geringer ist die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate nach KDIGO-Stadium
Podocalyxin (Vesikel) und Alter	Für die Altersgruppe 70-74 Jahre ist signifikant weniger Podocalyxin / Kreatinin in den Exosomenisolaten nachweisbar als in den älteren Altersgruppen
Albumin (Vesikel) und CKD	Nierenkranke Menschen weisen mehr vesikuläres Albumin im Urin auf als nierengesunde Menschen
Albumin (Vesikel) und RAAS-Inhibitoren	Probandinnen und Probanden, die eine ACR > 30mg/g aufweisen und trotzdem keine RAAS-Inhibitoren

	einnehmen, weisen mehr vesikuläres Albumin im Harn auf als solche, die unter Albuminurie leiden und RAAS-Inhibitoren einnehmen
Albumin (Vesikel), Podocalyxin (Vesikel) und Plasma-CRP	Probandinnen und Probanden, deren Serum-CRP höher ist, scheiden auch mehr vesikuläres Albumin und Podocalyxin im Exosomenisolat aus

Tabelle 18: Übersicht der wichtigsten Korrelationen der neuen vesikulären Biomarker

5.2.1 Zusammenhang zwischen eGFR, Alter und vesikulärem Podocalyxin

Es ist etabliert, dass die eGFR im Alter abnimmt – typischerweise um ca. 1 ml/min pro Jahr. Unsere Daten bestätigen diesen Befund: In unserer Kohorte zeigt sich ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen Alter und eGFR. So sinkt beispielsweise der Mittelwert der eGFR von 72,38 ml/min/1,73 m² in der Altersgruppe 70–74 Jahre auf 59,45 ml/min/1,73 m² in der Gruppe > 85 Jahre (siehe Tabelle 4). Die Daten aus unserer Kohorte reihen sich damit nahtlos in die Erkenntnisse bereits publizierter Studien ein (146, 194, 286, 287).

Parallel fand sich bei unserem neuen Biomarker, dem vesikulären Podocalyxin, ein signifikanter negativer Zusammenhang mit der eGFR – insbesondere in der weiblichen Untergruppe. Obwohl Frauen insgesamt geringere Podocalyxin-Werte im Urin aufweisen als Männer, zeigt sich hier ein signifikanter negativer Zusammenhang. Dies zeigt, dass bei Frauen ein Rückgang der Nierenfunktion mit einem Anstieg des vesikulären Albumins assoziiert ist – ein Befund, der in der männlichen Kohorte, die im Mittel deutlich höhere Werte für vesikuläres Podocalyxin zeigten, nicht statistisch signifikant repliziert werden konnte. Die statistische Power zur Detektion dieses Zusammenhangs konnte durch die Stratifizierung der eGFR nach den KDIGO-Kategorien verbessert werden. Die Gruppierung der eGFR in fünf Stadien reduziert die Datenstreuung und mindert den Einfluss von Ausreißern, die bei einer kontinuierlichen Analyse stärker ins Gewicht fallen. Beide Berechnungen bestätigen konsistent, dass höhere Podocalyxin-Werte mit einem Funktionsverlust der Niere – im Sinne einer Abnahme der eGFR – assoziiert sind.

Zudem korreliert das vesikuläre Podocalyxin auch positiv mit steigendem Alter. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass mit zunehmendem Alter nicht nur die glomeruläre Filtrationsrate abnimmt, sondern auch podozytäre Schäden zunehmen – was sich in einer verstärkten Freisetzung von Podocalyxin in Vesikeln widerspiegelt.

Die Verteilung der Podocalyxin-Werte über die Altersgruppen steigt hierbei – anders als die Abnahme der eGFR – nicht linear an, sondern ist besonders hoch in den Altersgruppen > 80 und > 85, was eher an einen exponentiellen Anstieg denken lässt und die kumulative Belastung und subklinische Schäden sowie die herabgesetzte Regenerationskapazität im Laufe des Alterungsprozesses widerspiegeln könnte.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass das nachgewiesene Podocalyxin möglicherweise nicht ausschließlich aus aktiv freigesetzten Exosomen stammt (s. 5.1.7). Es ist denkbar, dass auch apoptotische Körperchen zur gemessenen Podocalyxin-Ausscheidung beitragen. Sollte dies der Fall sein, könnte ein erhöhter Wert nicht nur auf gesteigerte Exozytose-Aktivität, sondern auch auf verstärkten Zelltod der Podozyten hinweisen – ein Prozess, der mit fortschreitender Nierenfunktionsstörung und Alterung zunehmen kann.

Zusammengefasst zeichnen unsere Ergebnisse das Gesamtbild eines neuartigen Nierenfunktionsmarkers: Das vesikuläre Podocalyxin korreliert negativ mit der eGFR und positiv mit dem Alter – und zeigt damit einen diagnostischen Mehrwert gegenüber etablierten Parametern wie der ACR, die unserer Kohorte keine entsprechende Korrelation aufweisen. Mit steigendem Alter kommt es zu einer fortschreitenden Abnahme der Nierenfunktion und einer Akkumulation von podozytären Schäden. Diese Schäden können sich sowohl in einer verstärkten exozytotischen Aktivität als auch in der Bildung apoptotischer Körperchen manifestieren, was im Anstieg des gemessenen Podocalyxin resultiert. Vesikuläres Podocalyxin könnte ein sensitiverer Marker als die Albumin-Kreatinin-Ratio für frühe Veränderungen oder Schädigungen der Podozyten sein, die bereits mit einem Funktionsverlust einhergehen, bevor die Resorptionskapazität des proximalen Tubulus überschritten wird und es zu einer pathologischen Albuminurie kommt. Es wäre auch denkbar, dass die ACR primär die glomeruläre Permeabilität widerspiegelt, während vesikuläres Podocalyxin spezifisch zelluläre Prozesse (z. B. Podozytenstress, direkte Zellschädigung und apoptotische Vorgänge, s. o.) anzeigt, die mit einer verminderten Filtrationsleistung assoziiert sind. Besonders in der weiblichen Kohorte, in der der negative Zusammenhang zwischen Podocalyxin und eGFR signifikant ist, erscheint dieser Marker als potenziell prädiktiv für einen eGFR-Decline. Künftige Studien sollten daher weiter untersuchen, zu welchem Anteil das gemessene Podocalyxin Exosomen oder Apoptosekörperchen entstammt und ob es

konstanten Mehrwert in der frühzeitigen Diagnostik und Verlaufskontrolle chronischer Nierenerkrankungen bieten kann.

5.2.2 Nierenerkrankung und vesikuläres Albumin

Ein zentrales Anliegen unserer Untersuchung war es, den klinischen Wert unseres neu identifizierten Markers zu belegen, insbesondere im Vergleich zu etablierten Krankheitsparametern. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Patienten mit Nierenerkrankungen signifikant höhere Werte an vesikulärem Albumin im Urin aufweisen als Patienten ohne Nierenerkrankungen. Dieser Unterschied wird nach Normalisierung auf Kreatinin sogar noch verstärkt, was die Robustheit des Markers gegenüber Schwankungen in der Urinkonzentration unterstreicht. Im Vergleich zum etablierten Parameter, der Albumin-Kreatinin-Ratio, könnte vesikuläres Albumin einen sensitiveren Hinweis auf frühe glomeruläre Schädigungen liefern, da es nicht den Resorptionsmechanismen des proximalen Tubulus unterworfen ist, sondern nach aktuellem Wissensstand direkt und unverändert im Endharn nachzuweisen ist, während die ACR häufig erst in fortgeschrittenen Stadien der Nierenerkrankung über den Schwellenwert ansteigt. Diese enge Korrelation mit bekannten Parametern der Nierenfunktionsdiagnostik weist auf eine hohe klinische Relevanz und das Potenzial für Früherkennung und Therapiemonitoring mittels unseres Markers hin. Zukünftige Studien sind notwendig, um zu prüfen, ob die Integration von vesikulärem Albumin in diagnostische Algorithmen zu einer verbesserten Versorgung von Patientinnen und Patienten im Sinne einer früheren therapeutischen Intervention zum Erhalt der physiologischen Nierenfunktion beitragen kann.

5.2.3 Systemische Inflammation und vesikuläre Biomarker

Unsere Analysen zeigen einen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen der systemischen Inflammation, gemessen am Serum-CRP, und den beiden neuen Biomarkern: Vesikuläres Albumin und ebenso vesikuläres Podocalyxin korrelieren mit dem Serum-CRP. Im Gegensatz dazu zeigen etablierte Nierenfunktionsparameter wie eGFR und ACR keine derartige Korrelation mit systemischer Inflammation. Diese Befunde legen nahe, dass die neuen Marker einen in der Pathophysiologie verankerten Link zwischen systemischer Entzündung und

Nierenschädigung darstellen und präzisere diagnostische Einblicke in die Pathophysiologie von Nierenerkrankungen ermöglichen.

Die Tatsache, dass diese Zusammenhänge ausschließlich mit den vesikulären Markern und nicht mit eGFR oder ACR nachweisbar sind, hebt die eigenständige Aussagekraft der vesikulären Marker hervor. Während eGFR und ACR oftmals Fröhschäden nicht adäquat darstellt, scheinen vesikuläre Marker – als eine Art "Liquid Biopsy" – unmittelbare Hinweise auf die zugrunde liegende inflammatorische Aktivität und den damit verbundenen zellulären Stress zu geben. Es ist denkbar, dass inflammatorische Prozesse etwa durch proinflammatorische Zytokine zu endothelialen Schäden führen und über Cross-Talk-Mechanismen zwischen Endothel und Podozyten die Freisetzung von Vesikeln triggern. Alternativ könnte eine verstärkte Transzytoseaktivität zu erhöhtem podozytären Stress und folglich zu einer verstärkten Freisetzung von vesikulärem Albumin und Podocalyxin führen.

Insgesamt deuten diese Befunde darauf hin, dass systemische Inflammation einen direkten Einfluss auf die Bildung und Freisetzung von Vesikeln im Glomerulus hat. Damit liefern die vesikulären Biomarker nicht nur eine statistische Korrelation, sondern sie spiegeln zentrale pathophysiologische Prozesse wider, die in der Diagnostik von Nierenerkrankungen den klassischen Parametern überlegen sein könnten, indem sie frühzeitig endothelialen und podozytären Stress sowie systemische Inflammation aufzeigen, bevor diese durch Veränderungen der eGFR oder ACR sichtbar werden.

5.2.4 Pharmakologische Modulation der Vesikelproduktion durch RAAS-Inhibitoren

Es wurde bereits die zentrale Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System bei der Entstehung von chronischer Nierenerkrankung und Albuminurie beleuchtet. Die Relevanz schlägt sich auch in den Therapieleitlinien wider, die RAAS-Inhibitoren wie Angiotensin-Rezeptor-Blocker (ARB) und ACE-Hemmer (ACE-I) unabhängig vom Blutdruck empfehlen, denn RAAS-Inhibitoren wirken sich auch bei normotonen Patientinnen und Patienten vorteilig auf Albuminurie und Nierenfunktion aus (288). In unserer Kohorte haben 29 Probandinnen und Probanden eine ACR > 30 mg/g und gelten damit als proteinuretisch (16 Frauen und 13 Männer). Innerhalb dieser Gruppe nehmen 17 Probandinnen und Probanden RAAS-Inhibitoren ein, 12 Probandinnen

und Probanden nehmen damit entgegen der Leitlinien-Empfehlung keine RAAS-Inhibitoren ein. Die Menge an vesikulärem Albumin ist in dieser Subgruppe unter RAAS-I-Therapie signifikant geringer als in der Vergleichsgruppe ohne ARB oder ACE-I im Therapieregime.

Diese Beobachtung passt nahtlos zu den Ergebnissen von Schießl et al. (2016), die zeigten, dass die Vesikelproduktion in den Podozyten angiotensinabhängig gesteigert wird. Demnach könnte der Einsatz von RAAS-Inhibitoren die ANGII-vermittelte Vesikelbildung hemmen und so zu einer Reduktion des vesikulären Albumins im Urin führen. Unsere Ergebnisse unterstreichen zum einen die Bedeutung des RAAS für die Pathophysiologie der Albuminurie, ebenso aber auch die biologische Relevanz des neuen Markers: Denn dieser Effekt wurde spezifisch mit RAAS-Inhibitoren nachgewiesen – andere blutdrucksenkende Medikamente oder Diuretika beeinflussten die Ausscheidung von vesikulärem Albumin nicht in vergleichbarer Weise.

Auch zeigt der Einfluss der RAAS-Inhibitoren auf die nicht-vesikuläre UAE bzw. ACR ein entgegengesetztes Bild: Innerhalb der Gruppe, die RAAS-Inhibitoren einnehmen, ist die Menge an freiem Albumin bzw. ACR größer als in der Vergleichsgruppe ohne Therapie mit RAAS-Inhibitoren, auch wenn diese Unterschiede nicht statistisch signifikant sind.

Um diese Diskrepanz zu verstehen, muss man sich die unterschiedlichen Ursachen und Dynamik von Albuminurie und albuminhaltigen Vesikeln vor Augen führen. Während freies Albumin einen progredienten Marker für eine zunehmende Verschlechterung der glomerulären Filtrationsfunktion sowie der tubulären Resorptionskapazität darstellt, handelt es sich bei albuminhaltigen Vesikeln im Harn um einen energetisch aufwendigen und sättigbaren Prozess, der eine erhaltene Differenzierung und Grundfunktion der Podozyten voraussetzt. Was auf den ersten Blick widersprüchlich wirkt, kann deshalb aus einer klinischen Perspektive erklärt werden. Durch die Vorauswahl der Probandinnen und Probanden mit $ACR > 30$ mg/g, ergibt sich eine heterogene Kohorte, innerhalb derer einige Probandinnen und Probanden bereits länger auffällig geworden sind mit pathologischen Werten für ACR oder Albuminurie. Probandinnen und Probanden mit schlechterer Nierenfunktion, im

Sinne einer großen Proteinurie, werden also eher einer Therapie mit RAAS-Inhibitoren zu geführt werden.

Der Zusammenhang zwischen vesikulärem Albumin und RAAS-Inhibitoren zeigt, dass der Marker biologisch und klinisch relevant ist. Es stärkt seine prädiktive Validität und untermauert seine potenzielle Bedeutung in der medizinischen Praxis und Forschung. Wenn sich der neue Marker auch in weiteren Studien als reaktionsfähig auf RAAS-Inhibitoren erweist, könnte der Marker in der Klinik verwendet werden, um den Einfluss von RAAS-Inhibitoren auf die Patienten zu überwachen und den Therapieerfolg zu beurteilen.

5.3 Fazit, Limitationen und offene Fragen

Die vorliegende Arbeit identifiziert vesikuläres Albumin und Podocalyxin als vielversprechende Biomarker zur differenzierten Beurteilung glomerulärer Schädigungen. Beide Marker zeigen komplementäre Aussagekraft:

Vesikuläres Albumin korreliert signifikant mit der Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR) und dem Entzündungsmarker CRP, nicht jedoch mit der eGFR. Es reagiert sensitiv auf RAAS-Inhibitoren, was auf den direkten Einfluss des Renin-Angiotensin-Systems auf die podozytäre Transzytose wieder aufgreift.

Vesikuläres Podocalyxin reflektiert altersabhängige Podozytenschädigungen und korreliert bei Frauen signifikant mit einer reduzierten eGFR. Es zeigt zudem einen starken Anstieg ab dem 75. Lebensjahr, was auf kumulative Schäden oder einen „kritischen Schwellenwert“ im renalen Alterungsprozess hindeutet.

Geschlechtsspezifische Unterschiede prägen beide Marker: Frauen weisen mehr vesikuläres Albumin auf, Männer höhere Podocalyxin-Werte. Diese Differenzen könnten auf hormonelle (z. B. Östrogen/Testosteron), genetische, sozial-behaviorale oder RAAS-vermittelte Mechanismen zurückgehen.

Die Ergebnisse unterstreichen, dass vesikuläre Biomarker frühe pathophysiologische Prozesse (Podozytenstress, Inflammation) erfassen, die von klassischen Parametern wie eGFR oder ACR nicht abgebildet werden.

5.3.1 Limitationen und Stärken der Arbeit

Eine wichtige Limitation der Studie ist, dass momentan nur die Baseline-Proben zur Auswertung vorliegen, sodass noch keine Angaben zum prädiktiven Wert der neuen Marker auf die langfristige Nierengesundheit gemacht werden können.

Das Querschnittsdesign der Studie erlaubt keine kausalen Schlüsse zur Dynamik der Biomarker im Krankheitsverlauf und die fehlende mechanistische Validierung lässt Fragen offen.

Eine weitere Limitation unserer Studie ist der Dauer des Ultrazentrifugationsprotokolls zur Isolation der Vesikel, das zwar den Goldstandard darstellt (183, 198), aber mit erheblichem Personal- und Zeitaufwand einhergeht. Allerdings kommen vermehrt schnelle Isolationskits auf den Markt die wohlmöglich eine gute Ernte der Vesikel in Zukunft auch bei kürzerer Protokolldauer ermöglichen.

Die Stärken liegen vor allem in der Originalität der Biomarker und der wissenschaftlichen Relevanz der Fragestellung. Sie integriert neue Erkenntnisse zu Albuminurie und Podozytenfunktion in etablierte Modelle der Proteinurie, mit dem Ziel, verbesserte diagnostische Methoden in der Versorgung von Patientinnen und Patienten zu implementieren. Besonders hervorzuheben ist, dass in dieser Arbeit Ergebnisse zu albuminhaltigen Vesikeln, die bisher vor allem in Tierversuchen beschrieben wurden, erfolgreich auf den Menschen übertragen wurden.

Die Arbeit liefert umfassende Korrelationsanalysen und Regressionsmodelle, um Zusammenhänge zwischen vesikulären Biomarkern, Nierenfunktion und Entzündungsparametern zu untersuchen. Die durchgeführten geschlechts- und altersstratifizierten Analysen heben die Bedeutung demografischer Faktoren in der Analyse von Nierengesundheit weiter hervor.

Weitere Stärken der vorliegenden Arbeit sind Umfang und Repräsentativität der AugUR2-Kohorte: Die breit angelegte, gut dokumentierte Stichprobe bietet eine robuste Datenbasis. Das bevölkerungsbasierte Design gewährleistet, dass die Ergebnisse auf die gleichaltrige Allgemeinbevölkerung übertragbar sind, was die klinische Relevanz der Ergebnisse erhöht.

5.3.2 Zukünftige Forschungsfragen

Bevor eine Implementation der neuen Marker in die Patientenversorgung beginnen kann, müssen einige weitere Fragen adressiert werden.

Zunächst wären Studien zu nennen, die mechanistisch den Einfluss des Geschlechts und des Hormonstatus auf die Bildung der podozytären Vesikel untersuchen. Die Modulatoren der geschlechtsspezifischen Unterschiede müssen identifiziert werden. Auch, um zu evaluieren, ob geschlechtsspezifische Cut-Off-Werte zur Risikobewertung notwendig sind.

Eine weitere zukünftige Forschungsfrage liegt in der Differenzierung zwischen Exosomen und Apoptosekörperchen als mögliche Quellen von Podocalyxin im Urin, um die diagnostische Aussagekraft vesikulärer Marker präziser einordnen zu können.

Langzeitstudien werden notwendig sein, um Konzentration und Zusammensetzung der podozytären Vesikel im Krankheitsverlauf zu untersuchen und den prädiktiven Wert der Biomarker zu bestätigen.

Um die Marker in Zukunft auch zur Therapieplanung und -kontrolle sinnvoll einsetzen zu können, werden weitere interventionelle Studien zur Prüfung der Auswirkung anti-inflammatorischer und renoprotektiver Medikamente auf die Reduktion der vesikulären Marker notwendig sein.

Kurz gesagt zeigt die Analyse der Ergebnisse, dass vesikuläres Albumin und Podocalyxin als innovative Biomarker wichtige Einblicke in glomeruläre Schädigungsprozesse und geschlechtsspezifische Unterschiede bieten. Dadurch könnten sie die bestehende Diagnostik sinnvoll ergänzen. Ihr pathophysiologisch begründeter Ursprung, die Übertragbarkeit tierexperimenteller Erkenntnisse auf den Menschen und die robuste Datenbasis der AugUR2-Kohorte stellen zentrale Stärken dar. Die Hauptlimitationen liegen in der Querschnittsnatur der Studie, die keine Aussage über den prädiktiven Wert der Vesikel zulässt und der aufwändigen Methodik. Weitere mechanistische und longitudinale Studien sowie die Entwicklung praktikablerer Verfahren werden erforderlich sein, bevor eine Translation in die klinische Diagnostik erfolgen kann.

6 Zusammenfassung

Chronische Nierenerkrankungen stellen eine zunehmende Belastung für das Gesundheitssystem dar. Durch den demografischen Wandel sind auch in den kommenden Jahren weiter steigende Prävalenzen zu erwarten. Die in der Einleitung dargestellten pathophysiologischen Mechanismen chronischer Nierenerkrankungen unterstreichen die zentrale Rolle der Podozyten bei der Entwicklung und Progression von Proteinurie und Niereninsuffizienz. Bisherige diagnostische Ansätze wie die Bestimmung der eGFR oder der Albumin-Kreatinin-Ratio werden erst in späten Krankheitsstadien auffällig und bieten keine ausreichende Möglichkeit für Frühinterventionen. So wird deutlich, dass ein ungedeckter Bedarf an diagnostischen Möglichkeiten besteht, die subklinische Veränderungen erfassen, um eine rechtzeitige Behandlung ermöglichen können. Die vorliegende Arbeit bietet einen ersten Ausblick auf den Einsatz von vesikulären Markern, um dieser Aufgabe zu begegnen.

In Vesikeln verpacktes Albumin und das in der Zellmembran der Podozyten enthaltene Podocalyxin sind vor dem Abbau durch Proteasen, der Resorption durch die proximalen Tubuluszellen und anderen Einflüssen entlang der ableitenden Harnwege geschützt und treten daher wahrscheinlich unverändert im Endharn auf. Darin sehen wir ihr vielversprechendes Potenzial. Die Bestimmung dieser vesikulären Proteine überträgt Erkenntnisse aus der physiologischen Grundlagenforschung in die klinisch-nephrologische Diagnostik und adressiert Probleme von epidemiologischer Tragweite, denn die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass vesikuläres Albumin und Podocalyxin komplementäre Informationen über pathophysiologische Prozesse der Nieren liefern könnten: Vesikuläres Albumin korreliert mit der ACR sowie dem Entzündungsmarker CRP, was als Indikator gestörter endothelialer Integrität aufgefasst werden kann. Die Korrelation der neuen exosomalen Marker mit dem Serum-CRP legt nahe, dass vesikuläres Albumin und Podocalyxin stärker mit Entzündungsprozessen assoziiert sind als herkömmliche Nierenmarker. Ein signifikanter Anstieg von Podocalyxin im Alter und der Zusammenhang mit einer Abnahme der eGFR deuten zusätzlich auf kumulative Schädigungen der GFB hin, die mit dem renalen Alterungsprozess assoziiert sein könnten. Ein unerwartetes und komplexes Ergebnis der Studie bestand darin, dass vesikuläres Albumin und Podocalyxin trotz ihres gemeinsamen Ursprungs und der

positiven Korrelation miteinander, deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede aufweisen. Der Zusammenhang der Albumin-Vesikel mit dem RAAS-System und dessen bekannten Auswirkungen auf die Nierenfunktion zeigt einmal mehr, dass der Marker nicht nur statistisch korreliert, sondern unterstreicht die biologische Relevanz der neuen Marker im Hinblick auf die Pathophysiologie von chronischen Nierenerkrankungen.

Diese erste Übertragung von Erkenntnissen aus dem Tierversuch auf den Menschen stützt die Möglichkeit vesikulärer Biomarker als Ergänzung zu klassischen Parametern. Bei erfolgreicher Umsetzung könnten sekundärpräventive Maßnahmen früher eingeleitet werden, was langfristig nicht nur die Lebensqualität der Patientinnen und Patienten verbessert, sondern auch die Belastung für das Gesundheitssystem reduziert. Darüber hinaus könnten diese Marker zur Therapieüberwachung dienen, indem sie die Wirkung von Medikamenten wie RAAS-Inhibitoren messbar machen.

Dennoch sind einige Limitationen zu beachten. Die Querschnittsstruktur der Studie erlaubt keine Aussagen zur Dynamik der Marker im Krankheitsverlauf oder über ihren prädiktiven Wert. Ebenso bedarf es mechanistischer Studien, um die genaue Herkunft und Zusammensetzung der Vesikel zu klären, insbesondere die Differenzierung zwischen Exosomen und Apoptosekörperchen als Quellen der Biomarker. Geschlechtsspezifische Untersuchungen müssen durchgeführt werden, um die Physiologie der Unterschiede zu verstehen und wichtige Implikationen für die klinische Nutzung nicht zu übersehen.

Zusammenfassend stellt diese Arbeit einen ersten, vielversprechenden Schritt auf dem Weg zur Nutzung von Vesikeln als „Liquid Biopsies“ dar, um den Bedarf an Früherkennung und differenzierter Beurteilung von Nierenschädigungen zu adressieren. Die Ergebnisse zu den potenziellen Biomarkern leisten einen Beitrag zur Entschlüsselung geschlechts- und altersspezifischer Pathomechanismen der CKD und legen den Grundstein für eine zukünftige klinische Implementierung dieser Marker, mit dem Ziel, die Versorgung von Patientinnen und Patienten mit CKD nachhaltig zu verbessern und die Progression der Erkrankung frühzeitig zu verhindern.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Transmissionselektronenmikroskopie der drei Schichten der Glomerulären Filtrationsbarriere (Pavenstädt et al. 2003, S. 265)	11
Abbildung 2: Identifikation und Charakterisierung von Podocalyxin (Transmissionselektronenmikroskopie der präparierten Glykokalyx (Kerjaschki et al. 1984, S. 1595))	13
Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Schlitzdiaphragmen (Benzing und Salant 2021, S. 1439)	14
Abbildung 4: Absorption des mit Iod-125 markierten Albumins in den Zellen des Proximalen Tubulus (Maunsbach 1966, S. 215)	19
Abbildung 5: Proteinquantifizierung mit Image Lab anhand eines Beispiel-Western Blots	
Zunächst werden die Banden der einzelnen Spuren ausgewählt und ihr Volumen bestimmt. Der Hintergrundwert wird abgezogen. Dann wird anhand der Albuminstandardreihe die Qualität des Western Blots kontrolliert. Es werden nur solche Western Blot in die Analyse miteinbezogen, auf denen alle 4 Referenzbanden klar erkennbar sind und die aufgetragene Proteinmenge der Verdünnungsreihe mit der densitometrischen Messung übereinstimmt. Die Bande in Spur 1 dient als Referenzmessung. Ihre Intensität wird gleich 1.00 gesetzt und die Intensitäten der restlichen Banden berechnen sich relativ zu ihr. Liegen die errechneten Werte außerhalb des linearen Bereichs der Eichkurve (in diesem Beispiel: Exosomenisolat 6) werden die Proben verdünnt und erneut geblottet.	56
Abbildung 6: Nachweis der Exosomenmarker im Western Blot	
Abgebildet sind die Banden für die Exosomenmarker Alix (Anti-Alix antibody [3A9] (ab117600)), CD9 (Anti-CD9 antibody [ERP2949] (ab92726)), CD63 (Anti-CD63 antibody (ab1180307)) und Hsp70 (Anti-Heatshock-Protein-70 antibody [2F7] (ABR Affinity Bioreagents)), der Nachweis spezifischer Banden für Exosomen-Markerproteine gelang nur in den Exosomensuspensionen, in den Spuren des korrespondierenden Vollurins sind keine Banden sichtbar	57
Abbildung 7: Nachweis der Podozytenmarker im Western Blot	
Abgebildet sind die spezifischen Banden für die Podozyten-Markerproteine Synaptopodin, Nephrin, Podocalyxin und Podocin	58

Abbildung 8: Nachweis von Albumin im Western Blot	
Abgebildet sind die Banden für Albumin. Sowohl in den Exosomensuspensionen als auch im korrespondierenden Vollurin zeigen sich spezifische Banden	58
Abbildung 9: Histogramm der Altersverteilung der AugUR2-Kohorte	59
Abbildung 10: Geschlechtsabhängige Unterschiede der etablierten Nierenparameter	
Es gibt Unterschiede in der Albuminkonzentration im Urin und der Albumin-Kreatinin-Ratio zwischen den Geschlechtern – hier haben die Männer höhere Werte als die Frauen. Die Serumkreatininkonzentration ist bei den männlichen Probanden höher als bei den weiblichen Probandinnen, die berechnete eGFR beruht auf diesen Serumkreatinin-Werten, die Formel zur Berechnung ist jedoch geschlechtsspezifisch (s.o.) und es zeigen sich keine systematischen Abweichungen zwischen männlichen und weiblichen Teilnehmenden	63
Abbildung 11: Geschlechtsabhängige Unterschiede in der Urinkonzentration	
Der Urin der männlichen Probanden ist signifikant stärker konzentriert als der der weiblichen Probandinnen	65
Abbildung 12: Balkendiagramm zur Ausscheidung von Albumin (Vesikel) nach dem Geschlecht	68
Abbildung 13: Balkendiagramm zur Ausscheidung von Podocalyxin (Vesikel) nach dem Geschlecht	
Angezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (Error Bars ± 1 SE)	69
Abbildung 14: Balkendiagramm der Mittelwerte für die Albumin- und Podocalyxin-Konzentrationen in Vesikeln sowie deren Normalisierung nach Kreatinin- und Osmolalitätswerten, getrennt nach Geschlecht	
Angezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern (Error Bars ± 1 SE)	70
Abbildung 15: Streudiagramm zur Korrelation von Albumin im Urin (mg/l) mit vesikulärem Albumin (relativ)	
Der lineare Zusammenhang wird durch die Regressionslinie dargestellt (R^2 Linear = 0,209)	72
Abbildung 16: Balkendiagramm der Mittelwerte der Albumin-Kreatinin-Ratio (g Kreatinin) in den KDIGO-Stadien	
Vesikuläres Albumin steigt mit zunehmender Albuminurie von 1,57 (KDIGO A1) über 3,49 (KDIGO A2) bis 4,18 (KDIGO A3) an, Fehlerbalken zeigen ± 1 SE	74
Abbildung 17: Balkendiagramm der vesikulären Albuminkonzentration in Abhängigkeit von Bluthochdruck (Selbstangabe)	

Personen mit Bluthochdruck zeigen höhere Werte für Albumin (Vesikel) (1,49 vs. 1,04), Albumin (Vesikel) / g Kreatinin (2,30 vs 1,46) und Albumin (Vesikel) / osmol/l (2,99 vs. 1,93) im Vergleich zu Personen ohne Bluthochdruck, Fehlerbalken zeigen ± 1 SE 76

Abbildung 18: Balkendiagramm der vesikulären Albuminkonzentration bei Personen mit und ohne Chronic Kidney Disease (CKD)

Personen mit CKD zeigen signifikant höhere Werte für Albumin (Vesikel) (1,82 vs. 1,13), Albumin (Vesikel) / g Kreatinin (2,76 vs. 1,66) und Albumin (Vesikel) / osmol/l (3,65 vs. 2,17) im Vergleich zu Personen ohne CKD, Fehlerbalken repräsentieren ± 1 SE 77

Abbildung 19: Balkendiagramm der Konzentrationen von Albumin und Podocalyxin in Vesikeln in Abhängigkeit von Serum-CRP-Werten (< 0,3 mg/dl vs. > 0,3 mg/dl)

Albumin in Vesikeln ist bei Personen mit CRP-Werten über 0,3 mg/dl deutlich höher (2,12 vs. 1,08), auch die Albumin-Werte, die auf Kreatinin bezogen wurden, sind bei pathologischen CRP-Werten erhöht (3,01 vs. 1,71), ähnlich zeigt sich bei der Normalisierung auf Osmolalität ein höherer Mittelwert von Albumin bei CRP > 0,3 mg/dl (4,10 vs. 2,17), für Podocalyxin zeigt sich ein ähnliches Muster – die Konzentration in den Vesikeln ist bei CRP-Werten über 0,3 mg/dl deutlich erhöht (4,19 vs. 1,88), auch nach Normalisierung auf Kreatinin und Osmolalität sind die Werte höher bei pathologischen CRP-Werten (2,56 vs. 1,52 bzw. 5,95 vs. 2,78), Fehlerbalken stellen jeweils ± 1 Standardfehler dar 78

Abbildung 20: Balkendiagramm der Mittelwerte von Albumin (Vesikel) pro g Kreatinin, gruppiert nach Patientinnen und Patienten, die renoprotektive Medikamente einnehmen („Ja“), und Patientinnen und Patienten, die keine renoprotektiven Medikamente einnehmen („Nein“), Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SE) 79

Abbildung 22: Einfluss der Antihypertensive-Einnahme auf die vesikuläre Albuminkonzentration

Balkendiagramm des Mittelwerts der Albuminkonzentration (Vesikel / g Kreatinin) in Abhängigkeit von der Einnahme von Antihypertensiva, Fehlerbalken repräsentieren ± 1 SE 80

Abbildung 22: Einfluss der Diuretika-Einnahme auf die vesikuläre Albuminkonzentration. Das Balkendiagramm zeigt die mittlere Albuminkonzentration

(Vesikel / g Kreatinin) in Abhängigkeit von der Einnahme von Diuretika. Fehlerbalken repräsentieren ± 1 SE 80

Abbildung 23: Einfluss renoprotektiver Medikamente auf die Albuminausscheidung
Das Balkendiagramm zeigt die mittleren Albuminwerte im Urin (mg/l), relativ zur Osmolarität ($\mu\text{g}/\text{mosmol}$) und relativ zu Kreatinin (mg/g), getrennt nach Einnahme (Ja/Nein) renoprotektiver Medikamente, Fehlerbalken repräsentieren ± 1 SE 80

7.1 Tabellen

Tabelle 1: Stadieneinteilung der Albuminurie anhand der Albumin-Kreatinin-Ratio 21

Tabelle 2: Übersicht über die Reagenzien, die in der Erstellung dieser Arbeit verwendet wurden 46

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten primären und sekundären Antikörper 47

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Geräte 49

Tabelle 5: Übersicht über die verwendete Software 49

Tabelle 6: Übersicht über verwendetes Verbrauchsmaterial 50

Tabelle 7: Zusammenfassung des Zentrifugationsprotokolls zur Vesikelisolation aus dem Urin 52

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Albumin-Verdünnungen im Western Blot 53

Tabelle 9: Protokoll der verwendeten Stromstärken und -spannungen für die Gelelektrophorese 54

Tabelle 10: Protokoll der verwendeten Stromstärke und -spannung für den Western Blot 54

Tabelle 11: Übersicht über die Verteilung von Risikofaktoren und Vorerkrankungen innerhalb der Kohorte

MW = Mittelwert, σ = Standardabweichung ^a Einer der 5 Probanden erfüllt mit einem HbA1c-Anteil von $> 6,5\%$ die diagnostischen Kriterien eines Diabetes mellitus, ohne dies bei seinen Vorerkrankungen genannt zu haben (s. 4.2.4) 60

Tabelle 12: Übersicht über Parameter der Nierengesundheit innerhalb der Kohorte
^a Daten beruhen auf den Selbstangaben der Probandinnen und Probanden 60

Tabelle 13: Übersicht über Parameter der Nierengesundheit innerhalb der Kohorte
MW = Mittelwert, σ = Standardabweichung ^a Definition CKD nach KDIGO: ACR > 30 mg/g oder eGFR < 60 ml/min/1.73m² 62

Tabelle 14: Statistische Verteilung der vesikulären Biomarker Albumin (Vesikel) und Podocalyxin (Vesikel)	65
Tabelle 15: eGFR und Alter	75
Tabelle 16: Podocalyxin / g Kreatinin und Alter	75
Tabelle 17: Übersicht der in unserer Kohorte beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede bei den herkömmlichen Nierenparametern	89
Tabelle 18: Übersicht der wichtigsten Korrelationen der neuen vesikulären Biomarker	107

7.2 Abbildungen

7.3 Formeln

Formel 1: Berechnung des glomerulären Siebkoeffizienten, der als Maß für die Albuminfiltration über die Glomeruläre Filtrationsbarriere dient	17
Formel 2: Berechnung der eGFR nach der CKD-EPI-Formel von 2017	61

8 Abkürzungsverzeichnis

ACE <i>Siehe</i> Angiotensin Converting Enzyme	GTP <i>Siehe</i> Guanosin triphosphat
ACE-I <i>Siehe</i> ACE-Hemmer	HSA <i>Siehe</i> Humanes Serum Albumin
ACR <i>Siehe</i> Albumin-Kreatinin-Ratio	HUPEC <i>Siehe</i> Human Urine Derived Podocyte-Like Epithelial Cells
ADH <i>Siehe</i> Antidiuretisches Hormon	IgG <i>Siehe</i> Immunglobulin G, <i>Siehe</i> Immunglobulin G
AGE <i>Siehe</i> Advanced Glycation End Product	IL <i>Siehe</i> Interleukin
AMPK <i>Adenosinmonophosphat-Kinase, Siehe</i> Adenosinmonophosphat-aktivierte Kinase	KDIGO <i>Siehe</i> Kidney Disease - Improving Global Outcome
ANG II <i>Siehe</i> Angiotensin II	LDL <i>Siehe</i> Low-Density Lipoprotein
ARB <i>Siehe</i> Angiotensin-Rezeptor-Blocker	MAP-K <i>Mitogenaktivierte Proteinkinase</i>
AT1 <i>Angiotensin 1</i>	MCP-1 <i>Siehe</i> Chemoattractant Protein-1
AT2 <i>Angiotensin 2</i>	MDRD <i>Siehe</i> Modification of Diet in Renal Disease
ATP <i>Adenosintriphosphat</i>	mTOR <i>Siehe</i> - mammalian target of rapamycin
AugUR <i>Siehe</i> Altersbezogene Untersuchungen zur Gesundheit der Universität Regensburg	NEMO <i>Siehe</i> NFκB essential modulator
BMI <i>Siehe</i> Body Mass Index	NFκB <i>Siehe</i> Nuclear Factor Kappa B
CCL <i>Siehe</i> CC-Chemokine Ligand	NO <i>Siehe</i> Stickstoffmonoxid
CKD <i>Chronic Kidney Disease</i>	NOS <i>Siehe</i> Stickstoffmonoxid-Synthetase
CKD-EPI <i>Siehe</i> Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration	NYHA <i>Siehe</i> New York Heart Association
CME <i>Siehe</i> Clathrin-Mediated Endocytosis	PGHS-2 <i>Siehe</i> Prostaglandinsynthase-2
COX-2 <i>Siehe</i> Cyclooxygenase-2	PTC <i>Siehe</i> Proximal Tubular Cells
CRP <i>Siehe</i> C-reaktives Protein	RAAS <i>Siehe</i> Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
CVD <i>Siehe</i> Cardio Vascular Disease	RANTES <i>Regulated And Normal T-cell Expressed and Secreted CCL-5</i>
CXCL 1 <i>Siehe</i> Chemokin-CXC-Ligand 1	RCT <i>Siehe</i> Randomized Controlled Trial
DNA <i>Siehe</i> Desoxyribonukleinsäure	ROS <i>Siehe</i> Reaktive Sauerstoff Spezies
eGFR <i>Siehe</i> geschätzte glomeruläre Filtrationsrate	SAPK <i>Stressaktivierte Proteinkinase</i>
ERK <i>Siehe</i> Extracellular Signal Kinases	SDS <i>Siehe</i> Natrium-Dodecyl-Sulfat
ESRD <i>Siehe</i> End-Stage Renal Disease	TGF-β <i>Siehe</i> Transforming Growth Factor β
ET-1 <i>Siehe</i> Endothelin-1	TNF-α <i>Siehe</i> Tumor-Nekrose-Faktor-α
FPE <i>Siehe</i> Foot Process Effacement	UAE <i>Siehe</i> Urinary Albumin Excretion
GBM <i>Siehe</i> Glomeruläre Basalmembran	UV <i>Siehe</i> Ultra-Violett
GFB <i>Siehe</i> Glomeruläre Filtrationsbarriere	VEGF <i>Siehe</i> Vascular Endothelial Growth Factor
GRP <i>Siehe</i> Glucose Regulated Protein	ZO-1 <i>Siehe</i> Zonula-Occludens-1
GSC _a <i>Siehe</i> Glomerulärer Albumin-Siebkoefizient	

9 Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 4., vollständig überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012.
2. Wallace MA. Anatomy and Physiology of the Kidney. AORN Journal 1998; 68:799–820. doi: 10.1016/s0001-2092(06)62377-6.
3. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, Hrsg. Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie : mit Online-Repetitorium. Sonderausgabe der 31. Auflage. Berlin: Springer; 2017. Verfügbar unter: <http://www.springer.com/>.
4. Acharya V, Olivero J. The Kidney as an Endocrine Organ. Methodist Debakey Cardiovasc J 2018; 14(4):305–7. doi: 10.14797/mdcj-14-4-305.
5. Nyengaard JR, Bendtsen TF. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. Anat Rec 1992; 232(2):194–201. doi: 10.1002/ar.1092320205.
6. Aumüller G, Wurzing LJ. Anatomie: 208 Tabellen. 2. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2010. (Duale Reihe). Verfügbar unter: <http://ebooks.thieme.de/9783131360427>.
7. Patel S, Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. Biomed Pharmacother 2017; 94:317–25. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.091.
8. Gavras H, Oliver JA, Cannon PJ. Interrelations of renin, angiotensin II, and sodium in hypertension and renal failure. Annu Rev Med 1976; 27:485–521. doi: 10.1146/annurev.me.27.020176.002413.
9. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION : I. THE PRODUCTION OF PERSISTENT ELEVATION OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE BY MEANS OF RENAL ISCHEMIA. J Exp Med 1934; 59(3):347–79. doi: 10.1084/jem.59.3.347.
10. Oparil S, Haber E. The renin-angiotensin system (first of two parts). N Engl J Med 1974; 291(8):389–401. doi: 10.1056/NEJM197408222910805.

11. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotso M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol* 2014; 4(3):1201–28. doi: 10.1002/cphy.c130040.
12. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 2007; 13(8 Suppl B):9–20. doi: 10.18553/jmcp.2007.13.s8-b.9.
13. Bonjour JP, Malvin RL. Stimulation of ADH release by the renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 1970; 218(6):1555–9. doi: 10.1152/ajplegacy.1970.218.6.1555.
14. CARPENTER CC, DAVIS JO, AYERS CR. Relation of renin, angiotensin II, and experimental renal hypertension to aldosterone secretion. *J Clin Invest* 1961; 40(11):2026–42. doi: 10.1172/JCI104429.
15. Brown JM. Adverse Effects of Aldosterone: Beyond Blood Pressure. *J Am Heart Assoc* 2024; 13(7):e030142. doi: 10.1161/JAHA.123.030142.
16. Dobrinskikh E, Okamura K, Kopp JB, Doctor RB, Blaine J. Human podocytes perform polarized, caveolae-dependent albumin endocytosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 306(9):F941-51. doi: 10.1152/ajprenal.00532.2013.
17. Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 2008; 88(2):451–87. doi: 10.1152/physrev.00055.2006.
18. Ichimura K, Sakai T. Evolutionary morphology of podocytes and primary urine-producing apparatus. *Anat Sci Int* 2017; 92(2):161–72. doi: 10.1007/s12565-015-0317-7.
19. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83(1):253–307. doi: 10.1152/physrev.00020.2002.
20. FARQUHAR MG, WISSIG SL, PALADE GE. Glomerular permeability. I. Ferritin transfer across the normal glomerular capillary wall. *J Exp Med* 1961; 113:47–66. doi: 10.1084/jem.113.1.47.
21. Miner JH. The glomerular basement membrane. *Experimental cell research* 2012; 318(9):973–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22410250/>.

22. Abrahamson DR. Origin of the glomerular basement membrane visualized after in vivo labeling of laminin in newborn rat kidneys. *J Cell Biol* 1985; 100(6):1988–2000. doi: 10.1083/jcb.100.6.1988.
23. Suh JH, Miner JH. The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. *Nat Rev Nephrol* 2013; 9(8):470–7. doi: 10.1038/nrneph.2013.109.
24. Smithies O. Why the kidney glomerulus does not clog: a gel permeation/diffusion hypothesis of renal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(7):4108–13. doi: 10.1073/pnas.0730776100.
25. Lennon R, Byron A, Humphries JD, Randles MJ, Carisey A, Murphy S et al. Global analysis reveals the complexity of the human glomerular extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25(5):939–51. doi: 10.1681/ASN.2013030233.
26. Kerjaschki D, Sharkey DJ, FARQUHAR MG. Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 1984; 98(4):1591–6. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6371025/>.
27. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N et al. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J. Clin. Invest.* 2003; 111(5):707–16. doi: 10.1172/JCI200317423.
28. Kuppe C, Rohlf W, Grepl M, Schulte K, Veron D, Elger M et al. Inverse correlation between vascular endothelial growth factor back-filtration and capillary filtration pressures. *Nephrol Dial Transplant* 2018; 33(9):1514–25. doi: 10.1093/ndt/gfy057.
29. Welsh GI, Saleem MA. The podocyte cytoskeleton--key to a functioning glomerulus in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2011; 8(1):14–21. doi: 10.1038/nrneph.2011.151.
30. Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(11):2440–5.
31. Abbate M, Zoja C, Corna D, Capitanio M, Bertani T, Remuzzi G. In progressive nephropathies, overload of tubular cells with filtered proteins translates glomerular permeability dysfunction into cellular signals of interstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(7):1213–24.

32. Rice WL, van Hoek AN, Păunescu TG, Huynh C, Goetze B, Singh B et al. High resolution helium ion scanning microscopy of the rat kidney. *PLoS One* 2013; 8(3):e57051. doi: 10.1371/journal.pone.0057051.
33. Kurihara H, Anderson JM, FARQUHAR MG. Diversity among tight junctions in rat kidney: glomerular slit diaphragms and endothelial junctions express only one isoform of the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(15):7075–9. doi: 10.1073/pnas.89.15.7075.
34. Martin CE, Jones N. Nephrin Signaling in the Podocyte: An Updated View of Signal Regulation at the Slit Diaphragm and Beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9:302. doi: 10.3389/fendo.2018.00302.
35. Huber TB, Benzing T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14(3):211–6. doi: 10.1097/01.mnh.0000165885.85803.a8.
36. Alport AC. HEREDITARY FAMILIAL CONGENITAL HAEMORRHAGIC NEPHRITIS. *Br Med J* 1927; 1(3454):504–6. doi: 10.1136/bmj.1.3454.504.
37. D'Amico G, Bazzi C. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney Int* 2003; 63(3):809–25. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00840.x.
38. Benzing T, Salant D. Insights into Glomerular Filtration and Albuminuria. *N Engl J Med* 2021; 384(15):1437–46. doi: 10.1056/NEJMr1808786.
39. Comper WD, Glasgow EF. Charge selectivity in kidney ultrafiltration. *Kidney Int* 1995; 47(5):1242–51. doi: 10.1038/ki.1995.178.
40. Carson JM, Okamura K, Wakashin H, McFann K, Dobrinskikh E, Kopp JB et al. Podocytes degrade endocytosed albumin primarily in lysosomes. *PLoS One* 2014; 9(6):e99771. doi: 10.1371/journal.pone.0099771.
41. Ryan GB, Karnovsky MJ. Distribution of endogenous albumin in the rat glomerulus: role of hemodynamic factors in glomerular barrier function. *Kidney Int* 1976; 9(1):36–45. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/940256/>.
42. Schell C, Huber TB. The Evolving Complexity of the Podocyte Cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(11):3166–74. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28864466/>.

43. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1(4):575–82. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80057-x.
44. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature genetics* 2000; 24(4):349–54. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10742096>.
45. Naylor RW, Morais MRPT, Lennon R. Complexities of the glomerular basement membrane. *Nat Rev Nephrol* 2021; 17(2):112–27. doi: 10.1038/s41581-020-0329-y.
46. PIERSON M, CORDIER J, HERVOUET F, RAUBER G. UNE CURIEUSE ASSOCIATION MALFORMATIVE CONG'ENITALE ET FAMILIALE ATTEIGNANT L'OEIL ET LE REIN. *J Genet Hum* 1963; 12:184–213.
47. Rabelink TJ, Zeeuw D de. The glycocalyx--linking albuminuria with renal and cardiovascular disease. *Nat Rev Nephrol* 2015; 11(11):667–76. doi: 10.1038/nrneph.2015.162.
48. Jeansson M, Haraldsson B. Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290(1):F111–6. doi: 10.1152/ajprenal.00173.2005.
49. Jourde-Chiche N, Fakhouri F, Dou L, Bellien J, Burtsey S, Frimat M et al. Endothelium structure and function in kidney health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2019; 15(2):87–108. doi: 10.1038/s41581-018-0098-z.
50. Birn H, Christensen EI. Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int* 2006; 69(3):440–9. doi: 10.1038/sj.ki.5000141.
51. Gekle M. Renal Proximal Tubular Albumin Reabsorption: Daily Prevention of Albuminuria. *News Physiol Sci* 1998; 13:5–11. doi: 10.1152/physiologyonline.1998.13.1.5.
52. Nicholson JP, Wolmarans MR, Park GR. The role of albumin in critical illness. *Br J Anaesth* 2000; 85(4):599–610. doi: 10.1093/bja/85.4.599.

53. Tojo A, Kinugasa S. Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. *Int J Nephrol* 2012; 2012:481520. doi: 10.1155/2012/481520.
54. Purtell JN, Pesce AJ, Clyne DH, Miller WC, Pollak VE. Isoelectric point of albumin: effect on renal handling of albumin. *Kidney Int* 1979; 16(3):366–76. doi: 10.1038/ki.1979.139.
55. Stolte H, Schurek HJ, Alt JM. Glomerular albumin filtration: a comparison of micropuncture studies in the isolated perfused rat kidney with in vivo experimental conditions. *Kidney Int* 1979; 16(3):377–84. doi: 10.1038/ki.1979.140.
56. Remuzzi A, Sangalli F, Fassi A, Remuzzi G. Albumin concentration in the Bowman's capsule: multiphoton microscopy vs micropuncture technique. *Kidney Int* 2007; 72(11):1410-1; author reply 1411. doi: 10.1038/sj.ki.5002501.
57. Oken DE, Flamenbaum W. Micropuncture studies of proximal tubule albumin concentrations in normal and nephrotic rats. *J Clin Invest* 1971; 50(7):1498–505. doi: 10.1172/JCI106635.
58. [Der Titel "Tojo, Endou 1992 – Intrarenal handling of proteins" kann nicht dargestellt werden. Die Vorlage "Literaturverzeichnis - Zeitschriftenaufsatz - Feld "Online-Adresse" ist leer" beinhaltet nur Felder, welche bei diesem Titel leer sind.]
59. Sörensson J, Ohlson M, Haraldsson B. A quantitative analysis of the glomerular charge barrier in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(4):F646-56. doi: 10.1152/ajprenal.2001.280.4.F646.
60. Ohlson M, Sörensson J, Haraldsson B. Glomerular size and charge selectivity in the rat as revealed by FITC-ficoll and albumin. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279(1):F84-91. doi: 10.1152/ajprenal.2000.279.1.F84.
61. Tencer J, Frick IM, Oquist BW, Alm P, Rippe B. Size-selectivity of the glomerular barrier to high molecular weight proteins: upper size limitations of shunt pathways. *Kidney Int* 1998; 53(3):709–15. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9507218/>.
62. Russo LM, Sandoval RM, McKee M, Osicka TM, Collins AB, Brown D et al. The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states. *Kidney Int* 2007; 71(6):504–13. doi: 10.1038/sj.ki.5002041.

63. Schießl IM, Castrop H. Angiotensin II AT2 receptor activation attenuates AT1 receptor-induced increases in the glomerular filtration of albumin: a multiphoton microscopy study. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 305(8):F1189-200. doi: 10.1152/ajprenal.00377.2013.
64. Castrop H, Schießl IM. Novel routes of albumin passage across the glomerular filtration barrier. *Acta Physiol (Oxf)* 2017; 219(3):544–53. doi: 10.1111/apha.12760.
65. Salmon AHJ, Ferguson JK, Burford JL, Gevorgyan H, Nakano D, Harper SJ et al. Loss of the endothelial glycocalyx links albuminuria and vascular dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23(8):1339–50. doi: 10.1681/ASN.2012010017.
66. Peti-Peterdi J. Independent two-photon measurements of albumin GSC give low values. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296(6):F1255-7. doi: 10.1152/ajprenal.00144.2009.
67. Tanner GA. Glomerular sieving coefficient of serum albumin in the rat: a two-photon microscopy study. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296(6):F1258-65. doi: 10.1152/ajprenal.90638.2008.
68. Meyer A von, Pick K-H, Hallbach J. Nachevaluierung des Referenzbereiches für Albumin im Serum/Plasma mit Farbstoffbindungsmethoden (Bromkresolgrün und Bromkresolpurpur) / Update of reference values for albumin in serum/plasma with bromcresol green or bromcresol purple methods. *LaboratoriumsMedizin* 2010; 34(3):155–7. doi: 10.1515/jlm.2010.030.
69. International Society of Nephrology. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease: Kidney Disease - Improving Global Outcome. Official Journal of the International Society of Nephrology 2013; 2013(volume 3, issue 1):1–163 [Stand: 22.11.2020]. Verfügbar unter: <http://www.kidney-international.org>.
70. Deutsche Gesellschaft für Nephrologie, Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. Interdisziplinäre S2k-Leitlinie Rationelle Labordiagnostik zur Abklärung Akuter Nierenschädigungen und Progredienter Nierenerkrankungen.

71. Cui S, Verroust PJ, Moestrup SK, Christensen EI. Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *Am J Physiol* 1996; 271(4 Pt 2):F900-7. doi: 10.1152/ajprenal.1996.271.4.F900.
72. Maack T, Johnson V, Kau ST, Figueiredo J, Sigulem D. Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins: a review. *Kidney Int* 1979; 16(3):251–70. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/393891/>.
73. Lazzara MJ, Deen WM. Model of albumin reabsorption in the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292(1):F430-9. doi: 10.1152/ajprenal.00010.2006.
74. Tojo A, Endou H. Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. *Am J Physiol Renal Physiol* 1992; 263(4 Pt 2):F600-6.
75. Maunsbach AB. Absorption of I125-labeled homologous albumin by rat kidney proximal tubule cells. *Journal of Ultrastructure Research* 1966; 15(3-4):197–241. Verfügbar unter: 10.1016/S0022-5320(66)80108-9.
76. Maunsbach AB. Albumin absorption by renal proximal tubule cells. *Nature* 1966; 212(5061):546–7. doi: 10.1038/212546a0.
77. Christensen EI, Gliemann J, Moestrup SK. Renal tubule gp330 is a calcium binding receptor for endocytic uptake of protein. *J Histochem Cytochem* 1992; 40(10):1481–90. doi: 10.1177/40.10.1382088.
78. Birn H, Fyfe JC, Jacobsen C, Mounier F, Verroust PJ, Orskov H et al. Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption. *J Clin Invest* 2000; 105(10):1353–61. doi: 10.1172/JCI8862.
79. Christensen EI, Verroust PJ. Megalin and cubilin, role in proximal tubule function and during development. *Pediatr Nephrol* 2002; 17(12):993–9. doi: 10.1007/s00467-002-0956-5.
80. Odera K, Goto S, Takahashi R. Age-related change of endocytic receptors megalin and cubilin in the kidney in rats. *Biogerontology* 2007; 8(5):505–15. doi: 10.1007/s10522-007-9093-7.
81. GRASBECK R, GORDIN R, KANTERO I, KUHLLBACK B. Selective vitamin B12 malabsorption and proteinuria in young people. A syndrome. *Acta Med Scand* 1960; 167:289–96. doi: 10.1111/j.0954-6820.1960.tb03549.x.

82. IMERSLUND O, BJORNSTAD P. FAMILIAL VITAMIN B12 MALABSORPTION. *Acta Haematol* 1963; 30:1–7. doi: 10.1159/000208104.
83. Gräsbeck R. Imerslund-Gräsbeck syndrome (selective vitamin B(12) malabsorption with proteinuria). *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1(1):17. doi: 10.1186/1750-1172-1-17.
84. Norden AG, Lapsley M, Lee PJ, Pusey CD, Scheinman SJ, Tam FW et al. Glomerular protein sieving and implications for renal failure in Fanconi syndrome. *Kidney Int* 2001; 60(5):1885–92. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.00016.x.
85. Girndt M. Diagnostik und Therapie der chronischen Nierenerkrankung. *Internist (Berl)* 2017; 58(3):243–56. doi: 10.1007/s00108-017-0195-2.
86. Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(11):2974–84 [Stand: 30.06.2020].
Verfügbar unter:
<https://jasn.asnjournals.org/content/jnephrol/17/11/2974.full.pdf?with-ds=yes>.
87. Weber FP, Hutchison R, Macleod JJ. A Case of Multiple Myeloma (Myelomatosis) with Bence-Jones Proteid in the Urine (Myelopathic Albumosuria of Bradshaw, Kahler's Disease), and a Summary of Published Cases of Bence-Jones Albumosuria: With a Report on the Chemical Pathology. *Med Chir Trans* 1903; (86):395–470.
88. Regeniter A, Freidank H, Dickenmann M, Boesken WH, Siede WH. Evaluation of proteinuria and GFR to diagnose and classify kidney disease: systematic review and proof of concept. *Eur J Intern Med* 2009; 20(6):556–61. doi: 10.1016/j.ejim.2009.03.006.
89. Thomas MC. Pathogenesis and progression of proteinuria. *Contrib Nephrol* 2011; 170:48–56. doi: 10.1159/000324943.
90. Karnovsky MJ, Ainsworth SK. The structural basis of glomerular filtration. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1972; 2:35–60.
91. Akilesh S, Huber TB, Wu H, Wang G, Hartleben B, Kopp JB et al. Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(3):967–72. doi: 10.1073/pnas.0711515105.

92. Neal CR. Podocytes ... What's Under Yours? (Podocytes and Foot Processes and How They Change in Nephropathy). *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015; 6:9. doi: 10.3389/fendo.2015.00009.
93. Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 1998; 54(3):687–97. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00044.x.
94. Schießl IM, Hammer A, Kattler V, Gess B, Theilig F, Witzgall R et al. Intravital Imaging Reveals Angiotensin II-Induced Transcytosis of Albumin by Podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27(3):731–44. doi: 10.1681/ASN.2014111125.
95. Okamura K, Dummer P, Kopp J, Qiu L, Levi M, Faubel S et al. Endocytosis of albumin by podocytes elicits an inflammatory response and induces apoptotic cell death. *PLoS One* 2013; 8(1):e54817 [Stand: 30.06.2020]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3557279/pdf/pone.0054817.pdf>.
96. Inoue K, Ishibe S. Podocyte endocytosis in the regulation of the glomerular filtration barrier. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015; 309(5):F398-405. doi: 10.1152/ajprenal.00136.2015.
97. Kuo TT, Baker K, Yoshida M, Qiao S-W, Aveson VG, Lencer WI et al. Neonatal Fc receptor: from immunity to therapeutics. *J Clin Immunol* 2010; 30(6):777–89. doi: 10.1007/s10875-010-9468-4.
98. He W, Ladinsky MS, Huey-Tubman KE, Jensen GJ, McIntosh JR, Björkman PJ. FcRn-mediated antibody transport across epithelial cells revealed by electron tomography. *Nature* 2008; 455(7212):542–6. doi: 10.1038/nature07255.
99. Lai KN, Leung JCK, Chan LYY, Guo H, Tang SCW. Interaction between proximal tubular epithelial cells and infiltrating monocytes/T cells in the proteinuric state. *Kidney Int* 2007; 71(6):526–38. doi: 10.1038/sj.ki.5002091.
100. Tharaux P-L, Huber TB. How many ways can a podocyte die? *Semin Nephrol* 2012; 32(4):394–404. doi: 10.1016/j.semnephrol.2012.06.011.
101. Dai H, Liu Q, Liu B. Research Progress on Mechanism of Podocyte Depletion in Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res* 2017; 2017:2615286. doi: 10.1155/2017/2615286.

102. Agrawal S, Guess AJ, Chanley MA, Smoyer WE. Albumin-induced podocyte injury and protection are associated with regulation of COX-2. *Kidney Int* 2014;1150–60. doi: 10.1038/ki.2014.196.
103. Morigi M, Buelli S, Angioletti S, Zanchi C, Longaretti L, Zoja C et al. In Response to Protein Load Podocytes Reorganize Cytoskeleton and Modulate Endothelin-1 Gene. *Am J Pathol* 2005; 166(5):1309–20. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62350-4.
104. Brähler S, Ising C, Hagmann H, Rasmus M, Hoehne M, Kurschat C et al. Intrinsic proinflammatory signaling in podocytes contributes to podocyte damage and prolonged proteinuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 303(10):F1473-85. doi: 10.1152/ajprenal.00031.2012.
105. Brinkkoetter PT, Ising C, Benzing T. The role of the podocyte in albumin filtration. *Nat Rev Nephrol* 2013; 9(6):328–36. doi: 10.1038/nrneph.2013.78.
106. Poligone B, Baldwin AS. Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: roles of different prostaglandins. *J Biol Chem* 2001; 276(42):38658–64. doi: 10.1074/jbc.M106599200.
107. Ying Q, Wu G. Molecular mechanisms involved in podocyte EMT and concomitant diabetic kidney diseases: an update. *Ren Fail* 2017; 39(1):474–83. doi: 10.1080/0886022X.2017.1313164.
108. Ma K, Yang L, Shen R, Kong B, Chen W, Liang J et al. Th17 cells regulate the production of CXCL1 in breast cancer. *International Immunopharmacology* 2018; 56:320–9. doi: 10.1016/j.intimp.2018.01.026.
109. Assady S, Wanner N, Skorecki KL, Huber TB. New Insights into Podocyte Biology in Glomerular Health and Disease. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(6):1707–15. doi: 10.1681/ASN.2017010027.
110. Garg P. A Review of Podocyte Biology. *Am J Nephrol* 2018; 47 Suppl 1:3–13. doi: 10.1159/000481633.
111. Assady S, Benzing T, Kretzler M, Skorecki KL. Glomerular podocytes in kidney health and disease. *The Lancet* 2019; 393(10174):856–8. doi: 10.1016/S0140-6736(18)33000-9.

112. Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol* 2006; 8(5):485–91. doi: 10.1038/ncb1400.
113. Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 2007; 17(9):428–37. doi: 10.1016/j.tcb.2007.06.006.
114. Jim B, Ghanta M, Qipo A, Fan Y, Chuang PY, Cohen HW et al. Dysregulated nephrin in diabetic nephropathy of type 2 diabetes: a cross sectional study. *PLoS One* 2012; 7(5):e36041. doi: 10.1371/journal.pone.0036041.
115. Simons M, Huber TB. It's not all about nephrin. *Kidney Int* 2008; 73(6):671–3. doi: 10.1038/sj.ki.5002798.
116. Huber TB, Kottgen M, Schilling B, Walz G, Benzing T. Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem* 2001; 276(45):41543–6. doi: 10.1074/jbc.C100452200.
117. Huber TB, Schermer B, Benzing T. Podocin organizes ion channel-lipid supercomplexes: implications for mechanosensation at the slit diaphragm. *Nephron Exp Nephrol* 2007; 106(2):e27–31. doi: 10.1159/000101789.
118. Yin L, Yu L, He JC, Chen A. Controversies in Podocyte Loss: Death or Detachment? *Front Cell Dev Biol* 2021; 9:771931. doi: 10.3389/fcell.2021.771931.
119. Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley KV. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 304(4):F333–47. doi: 10.1152/ajprenal.00478.2012.
120. George B, Verma R, Soofi AA, Garg P, Zhang J, Park T-J et al. Crk1/2-dependent signaling is necessary for podocyte foot process spreading in mouse models of glomerular disease. *J Clin Invest* 2012; 122(2):674–92. doi: 10.1172/JCI60070.
121. Gusev E, Solomatina L, Zhuravleva Y, Sarapultsev A. The Pathogenesis of End-Stage Renal Disease from the Standpoint of the Theory of General

- Pathological Processes of Inflammation. *Int J Mol Sci* 2021; 22(21). doi: 10.3390/ijms222111453.
122. Lasagni L, Lazzeri E, Shankland SJ, Anders H-J, Romagnani P. Podocyte mitosis - a catastrophe. *Curr Mol Med* 2013; 13(1):13–23. doi: 10.2174/1566524011307010013.
123. Kriz W, Lemley KV. A Potential Role for Mechanical Forces in the Detachment of Podocytes and the Progression of CKD. *JASN* 2015; 26(2):258–69. doi: 10.1681/ASN.2014030278.
124. He F, Chen S, Wang H, Shao N, Tian X, Jiang H et al. Regulation of CD2-associated protein influences podocyte endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis induced by albumin overload. *Gene* 2011; 484(1-2):18–25. doi: 10.1016/j.gene.2011.05.025.
125. Nagata M. Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int* 2016; 89(6):1221–30. doi: 10.1016/j.kint.2016.01.012.
126. Zoja C, Donadelli R, Colleoni S, Figliuzzi M, Bonazzola S, Morigi M et al. Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kappa B activation. *Kidney Int* 1998; 53(6):1608–15. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00905.x.
127. Tang S, Leung JCK, Tsang AWL, Lan HY, Chan TM, Lai KN. Transferrin up-regulates chemokine synthesis by human proximal tubular epithelial cells: implication on mechanism of tubuloglomerular communication in glomerulopathic proteinuria. *Kidney Int* 2002; 61(5):1655–65. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00301.x.
128. Gansevoort RT, Navis GJ, Wapstra FH, Jong PE de, Zeeuw D de. Proteinuria and progression of renal disease: therapeutic implications. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997; 6(2):133–40. doi: 10.1097/00041552-199703000-00005.
129. Iseki K, Ikemiya Y, Iseki C, Takishita S. Proteinuria and the risk of developing end-stage renal disease. *Kidney Int* 2003; 63(4):1468–74. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00868.x.

130. Stevens PE, Levin A. Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease: Synopsis of the Kidney Disease: Improving Global Outcomes 2012 Clinical Practice Guideline. *annals of internal medicine* 04.06.2013:825–31.
131. Murton M, Goff-Leggett D, Bobrowska A, Garcia Sanchez JJ, James G, Wittbrodt E et al. Burden of Chronic Kidney Disease by KDIGO Categories of Glomerular Filtration Rate and Albuminuria: A Systematic Review. *Adv Ther* 2021; 38(1):180–200. doi: 10.1007/s12325-020-01568-8.
132. Coresh J, Heerspink HJL, Sang Y, Matsushita K, Arnlov J, Astor BC et al. Change in albuminuria and subsequent risk of end-stage kidney disease: an individual participant-level consortium meta-analysis of observational studies. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2019; 7(2):115–27. doi: 10.1016/S2213-8587(18)30313-9.
133. Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, Astor BC, Matsushita K, Gansevoort RT, van der Velde M, Woodward M et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with mortality and end-stage renal disease. A collaborative meta-analysis of kidney disease population cohorts. *Kidney Int* 2011; 79(12):1331–40. doi: 10.1038/ki.2010.550.
134. Lancet T. The global issue of kidney disease.
135. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int* 2003; 63(1):225–32. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00712.x.
136. Jong PE de, van der Velde M, Gansevoort RT, Zoccali C. Screening for chronic kidney disease: where does Europe go? *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2008; 3(2):616–23. doi: 10.2215/CJN.04381007.
137. Bright R. Cases and observations illustrative of renal disease accompanied with the secretion of albuminous urine from Guy's Hospital Reports, No. II. Vol. I; 1836.
138. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJL, Mann JF et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology,

- mechanisms, and prevention. *The Lancet* 2013; 382(9889):339–52. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60595-4.
139. Ellis H. Richard Bright (1789-1858): pioneer of nephrology. *Br J Hosp Med (Lond)* 2008; 69(12):705. doi: 10.12968/hmed.2008.69.12.705.
 140. Shuvy M, Zwas DR, Lotan C, Keren A, Gotsman I. Albuminuria: Associated With Heart Failure Severity and Impaired Clinical Outcomes. *Can J Cardiol* 2020; 36(4):527–34. doi: 10.1016/j.cjca.2019.09.001.
 141. Ibsen H, Olsen MH, Wachtell K, Borch-Johnsen K, Lindholm LH, Mogensen CE et al. Reduction in albuminuria translates to reduction in cardiovascular events in hypertensive patients: losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study. *Hypertension* 2005; 45(2):198–202. doi: 10.1161/01.HYP.0000154082.72286.2a.
 142. Zeeuw D de, Remuzzi G, Parving H-H, Keane WF, Zhang Z, Shahinfar S et al. Albuminuria, a therapeutic target for cardiovascular protection in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Circulation* 2004; 110(8):921–7. doi: 10.1161/01.CIR.0000139860.33974.28.
 143. Chang TI, Li S, Chen S-C, Peralta CA, Shlipak MG, Fried LF et al. Risk factors for ESRD in individuals with preserved estimated GFR with and without albuminuria: results from the Kidney Early Evaluation Program (KEEP). *Am J Kidney Dis* 2013; 61(4 Suppl 2):S4-11. doi: 10.1053/j.ajkd.2012.12.016.
 144. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *The Lancet* 2012; 379(9811):165–80. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60178-5.
 145. Barzilay JI, Fitzpatrick AL, Luchsinger J, Yasar S, Bernick C, Jenny NS et al. Albuminuria and Dementia in the Elderly: A Community Study. *Am J Kidney Dis* 2008; 52(2):216–26. doi: 10.1053/j.ajkd.2007.12.044.
 146. Barnett AH. Preventing renal complications in diabetic patients: the Diabetics Exposed to Telmisartan And enalapril (DETAIL) study. *Acta Diabetol* 2005; 42 Suppl 1:S42-9 [Stand: 30.06.2020]. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00592-005-0180-4.pdf>.
 147. Herzog CA, Asinger RW, Berger AK, Charytan DM, Díez J, Hart RG et al. Cardiovascular disease in chronic kidney disease. A clinical update from Kidney

- Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2011; 80(6):572–86. doi: 10.1038/ki.2011.223.
148. Baek SD, Baek CH, Kim JS, Kim SM, Kim JH, Kim SB. Does stage III chronic kidney disease always progress to end-stage renal disease? A ten-year follow-up study. *Scand J Urol Nephrol* 2012; 46(3):232–8. doi: 10.3109/00365599.2011.649045.
 149. Mann JF, Gerstein HC, Pogue J, Bosch J, Yusuf S. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril: the HOPE randomized trial. *annals of internal medicine* 2001; 134(8):629–36. doi: 10.7326/0003-4819-134-8-200104170-00007.
 150. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *The Lancet* 2017; 389(10075):1238–52. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32064-5.
 151. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; 351(13):1296–305. doi: 10.1056/NEJMoa041031.
 152. Culeton BF, Larson MG, Parfrey PS, Kannel WB, Levy D. Proteinuria as a risk factor for cardiovascular disease and mortality in older people: a prospective study. *Am J Med* 2000; 109(1):1–8. doi: 10.1016/S0002-9343(00)00444-7.
 153. Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *The Lancet* 2010; 375(9731):2073–81. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60674-5.
 154. Packham DK, Alves TP, Dwyer JP, Atkins R, Zeeuw D de, Cooper M et al. Relative incidence of ESRD versus cardiovascular mortality in proteinuric type 2 diabetes and nephropathy: results from the DIAMETRIC (Diabetes Mellitus Treatment for Renal Insufficiency Consortium) database. *Am J Kidney Dis* 2012; 59(1):75–83. doi: 10.1053/j.ajkd.2011.09.017.
 155. Sandsmark DK, Messé SR, Zhang X, Roy J, Nessel L, Lee Hamm L et al. Proteinuria, but Not eGFR, Predicts Stroke Risk in Chronic Kidney Disease:

- Chronic Renal Insufficiency Cohort Study. *Stroke* 2015; 46(8):2075–80. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.009861.
156. van der Velde M, Matsushita K, Coresh J, Astor BC, Woodward M, Levey A et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int* 2011; 79(12):1341–52. doi: 10.1038/ki.2010.536.
 157. Blecker S, Matsushita K, Köttgen A, Loehr LR, Bertoni AG, Boulware LE et al. High-normal albuminuria and risk of heart failure in the community. *American Journal of Kidney Diseases* 2011; 58(1):47–55 [Stand: 08.03.2022]. Verfügbar unter: [https://www.ajkd.org/article/S0272-6386\(11\)00700-1/pdf](https://www.ajkd.org/article/S0272-6386(11)00700-1/pdf).
 158. Podkowińska A, Formanowicz D. Chronic Kidney Disease as Oxidative Stress- and Inflammatory-Mediated Cardiovascular Disease. *Antioxidants (Basel)* 2020; 9(8). doi: 10.3390/antiox9080752.
 159. Gao X, Suo Y, Zhang M, Wang Y, Gao X, Bing Q et al. Angiopietin-like protein 3 markedly enhanced in the hyperlipidemia related proteinuria. *Lipids Health Dis* 2019; 18(1):116. doi: 10.1186/s12944-019-1052-1.
 160. Schieppati A, Remuzzi G. Proteinuria and its consequences in renal disease. *Acta Paediatrica* 2003; 92(0):9–13. doi: 10.1080/08035320310000384.
 161. Schießl IM, Castrop H. Angiotensin II AT2 receptor activation attenuates AT1 receptor-induced increases in the glomerular filtration of albumin: a multiphoton microscopy study. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013:F1189-200. doi: 10.1152/ajprenal.00377.2013.
 162. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *Biomed Res Int* 2018; 2018:8545347. doi: 10.1155/2018/8545347.
 163. Said S, Hernandez GT. The link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *J Nephropathol* 2014; 3(3):99–104. doi: 10.12860/jnp.2014.19.

164. Lin Y-C, Chang Y-H, Yang S-Y, Wu K-D, Chu T-S. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc* 2018; 117(8):662–75. doi: 10.1016/j.jfma.2018.02.007.
165. Yi S-W, Moon SJ, Yi J-J. Low-normal hemoglobin levels and anemia are associated with increased risk of end-stage renal disease in general populations: A prospective cohort study. *PLoS One* 2019; 14(4):e0215920. doi: 10.1371/journal.pone.0215920.
166. Ruggenenti P, Schieppati A, Remuzzi G. Progression, remission, regression of chronic renal diseases. *Lancet* 2001; 357(9268):1601–8. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04728-0.
167. Gaedeke J, Noble NA, Border WA. Angiotensin II and progressive renal insufficiency. *Curr Hypertens Rep* 2002; 4(5):403–7. doi: 10.1007/s11906-002-0071-9.
168. Baigent C, Burbury K, Wheeler D. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *The Lancet* 2000; 356(9224):147–52. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02456-9.
169. Konta T, Hao Z, Takasaki S, Abiko H, Ishikawa M, Takahashi T et al. Clinical utility of trace proteinuria for microalbuminuria screening in the general population. *Clin Exp Nephrol* 2007; 11(1):51–5. doi: 10.1007/s10157-006-0458-z.
170. Shen X, Jiang H, Ying M, Xie Z, Li X, Wang H et al. Calcineurin inhibitors cyclosporin A and tacrolimus protect against podocyte injury induced by puromycin aminonucleoside in rodent models. *Sci Rep* 2016; 6:32087. doi: 10.1038/srep32087.
171. Tangri N, Stevens LA, Griffith J, Tighiouart H, Djurdjev O, Naimark D et al. A predictive model for progression of chronic kidney disease to kidney failure. *JAMA* 2011; 305(15):1553–9. doi: 10.1001/jama.2011.451.
172. Erkan E. Proteinuria and progression of glomerular diseases. *Pediatr Nephrol* 2013; 28(7):1049–58. doi: 10.1007/s00467-012-2335-1.
173. Bryzgunova OE, Zaripov MM, Skvortsova TE, Lekchnov EA, Grigor'eva AE, Zaporozhchenko IA et al. Comparative Study of Extracellular Vesicles from the

- Urine of Healthy Individuals and Prostate Cancer Patients. PLoS One 2016; 11(6):e0157566. doi: 10.1371/journal.pone.0157566.
174. Yoshikawa N, Ito H, Akamatsu R, Hazikano H, Okada S, Matsuo T., Yoshikawa N, Ito H, Akamatsu R, Hazikano H, Okada S et al. Glomerular podocyte vacuolation in focal segmental glomerulosclerosis: PMID: 3754422. Arch Pathol Lab Med 1986; 110(5):394–8.
 175. Lawrence & Brewer. A morphometric, biochemical and histochemical comparison of puromycin aminonucleoside and hyperalbuminaemic induced proteinurias in the female Wistar rat. Journal of Pathology 1983; (139):115–40.
 176. Knepper MA, Pisitkun T. Exosomes in urine: who would have thought...? Kidney Int 2007; 72(9):1043–5. doi: 10.1038/sj.ki.5002510.
 177. Lässer C, Alikhani VS, Ekström K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. J Transl Med 2011; 9:9. doi: 10.1186/1479-5876-9-9.
 178. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. Cell Mol Neurobiol 2016; 36(3):301–12. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10571-016-0366-z>.
 179. Gonzales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, Tchapyjnikov D, Star RA, Kleta R et al. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. J Am Soc Nephrol 2009; 20(2):363–79. doi: 10.1681/ASN.2008040406.
 180. Steinkirchner AB, Zimmermann ME, Donhauser FJ, Dietl A, Brandl C, Koller M et al. Self-report of chronic diseases in old-aged individuals: extent of agreement with general practitioner medical records in the German AugUR study. J Epidemiol Community Health 2022; 76(11):931–8. doi: 10.1136/jech-2022-219096.
 181. Stark K, Olden M, Brandl C, Dietl A, Zimmermann ME, Schelter SC et al. The German AugUR study: study protocol of a prospective study to investigate chronic diseases in the elderly. BMC Geriatr 2015; 15:130. doi: 10.1186/s12877-015-0122-0.

182. Dietl A, Zimmermann ME, Brandl C, Wallner S, Burkhardt R, Maier LS et al. Distribution and specificity of high-sensitivity cardiac troponin T in older adults without acute cardiac conditions: cross-sectional results from the population-based AugUR study. *BMJ Open* 2021; 11(11):e052004. doi: 10.1136/bmjopen-2021-052004.
183. He L, Zhu D, Wang J, Wu X. A highly efficient method for isolating urinary exosomes. *Int J Mol Med* 2019; 43(1):83–90. doi: 10.3892/ijmm.2018.3944.
184. Elliott WJ. Hypertension in Adults Across the Age Spectrum: Current Outcomes and Control in the Community. *Yearbook of Cardiology* 2006; 2006:11–3. doi: 10.1016/S0145-4145(07)70009-6.
185. Levey AS, Coresh J, Tighiouart H, Greene T, Inker LA. Measured and estimated glomerular filtration rate: current status and future directions. *Nat Rev Nephrol* 2020; 16(1):51–64. doi: 10.1038/s41581-019-0191-y.
186. White SL, Polkinghorne KR, Atkins RC, Chadban SJ. Comparison of the prevalence and mortality risk of CKD in Australia using the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study GFR estimating equations: the AusDiab (Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle) Study. *Am J Kidney Dis* 2010; 55(4):660–70. doi: 10.1053/j.ajkd.2009.12.011.
187. Jamison RL, Gehrig JJ. Urinary Concentration and Dilution: Physiology:1219–79. doi: 10.1002/cphy.cp080227.
188. WIRZ H, HARGITAY B, KUHN W. Lokalisation des Konzentrierungsprozesses in der Niere durch direkte Kryoskopie. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 1951; 9(2):196–207.
189. Arndt T. Urine-creatinine concentration as a marker of urine dilution: reflections using a cohort of 45,000 samples. *Forensic Sci Int* 2009; 186(1-3):48–51. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.01.010.
190. Cohen J. A power primer. *Psychological Bulletin* 1992:155–9. doi: 10.1037//0033-2909.112.1.155.

191. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2. ed. Hillsdale, NJ: Erlbaum; 1988. Verfügbar unter: <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0731/88012110-d.html>.
192. Gignac GE, Szodorai ET. Effect size guidelines for individual differences researchers. *Personality and Individual Differences* 2016; 102:74–8. doi: 10.1016/j.paid.2016.06.069.
193. Hemphill JF. Interpreting the magnitudes of correlation coefficients. *Am Psychol* 2003; 58(1):78–9. doi: 10.1037/0003-066x.58.1.78.
194. Denic A, Glassock RJ, Rule AD. Structural and Functional Changes With the Aging Kidney. *Adv Chronic Kidney Dis* 2016; 23(1):19–28. doi: 10.1053/j.ackd.2015.08.004.
195. Pepys MB. C-reactive protein fifty years on. *The Lancet* 1981; 1(8221):653–7. doi: 10.1016/S0140-6736(81)91565-8.
196. Boncler M, Wu Y, Watala C. The Multiple Faces of C-Reactive Protein-Physiological and Pathophysiological Implications in Cardiovascular Disease. *Molecules* 2019; 24(11). doi: 10.3390/molecules24112062.
197. Du Clos TW. C-reactive protein as a regulator of autoimmunity and inflammation. *Arthritis Rheum* 2003; 48(6):1475–7. doi: 10.1002/art.11025.
198. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 2019; 8(7). doi: 10.3390/cells8070727.
199. Dear JW, Street JM, Bailey MA. Urinary exosomes: a reservoir for biomarker discovery and potential mediators of intrarenal signalling. *Proteomics* 2013; 13(10-11):1572–80. doi: 10.1002/pmic.201200285.
200. Deng F, Miller J. A review on protein markers of exosome from different bio-resources and the antibodies used for characterization. *J Histotechnol* 2019; 42(4):226–39. doi: 10.1080/01478885.2019.1646984.
201. Hurley JH, Odorizzi G. Get on the exosome bus with ALIX. *Nat Cell Biol* 2012; 14(7):654–5. doi: 10.1038/ncb2530.
202. Thongboonkerd V. Roles for Exosome in Various Kidney Diseases and Disorders. *Front Pharmacol* 2019; 10:1655. doi: 10.3389/fphar.2019.01655.

203. Pisitkun T, Shen R-F, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(36):13368–73. doi: 10.1073/pnas.0403453101.
204. Sandokji I, Greenberg J. Plasma and Urine Biomarkers of CKD: A Review of Findings in the CKiD Study.
205. Huang J, Gretz N, Weinfurter S. Filtration markers and determination methods for the assessment of kidney function. *Eur J Pharmacol* 2016; 790:92–8. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.06.060.
206. Menon V, Greene T, Wang X, Pereira AA, Marcovina SM, Beck GJ et al. C-reactive protein and albumin as predictors of all-cause and cardiovascular mortality in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005; 68(2):766–72. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00455.x.
207. Abraham G, Sundaram V, Sundaram V, Mathew M, Leslie N, Sathiah V. C-Reactive protein, a valuable predictive marker in chronic kidney disease. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2009; 20(5):811–5.
208. Li J., Chen J., Lan H., Tang Y. Role of C-Reactive Protein in Kidney Diseases.
209. Adejumo OA, Okaka EI, Okwuonu CG, Iyawe IO, Odujoko OO. Serum C-reactive protein levels in pre-dialysis chronic kidney disease patients in southern Nigeria. *Ghana Med J* 2016; 50(1):31–8. doi: 10.4314/gmj.v50i1.5.
210. Menon V, Wang X, Greene T, Beck GJ, Kusek JW, Marcovina SM et al. Relationship between C-reactive protein, albumin, and cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003; 42(1):44–52. doi: 10.1016/s0272-6386(03)00407-4.
211. Francisco ALM de, Stenvinkel P, Vaulont S. Inflammation and its impact on anaemia in chronic kidney disease: from haemoglobin variability to hyporesponsiveness. *NDT Plus* 2009; 2(Suppl_1):i18-i26. doi: 10.1093/ndtplus/sfn176.
212. Li ZI, Chung ACK, Zhou L, Huang XR, Liu F, Fu P et al. C-reactive protein promotes acute renal inflammation and fibrosis in unilateral ureteral obstructive nephropathy in mice. *Lab Invest* 2011; 91(6):837–51. doi: 10.1038/labinvest.2011.42.

213. Muiesan ML, Ambrosioni E, Costa FV, Leonetti G, Pessina AC, Salvetti M et al. Sex differences in hypertension-related renal and cardiovascular diseases in Italy: the I-DEMAND study. *J Hypertens* 2012; 30(12):2378–86. doi: 10.1097/HJH.0b013e328359b6a9.
214. Kattah AG, Garovic VD. Understanding sex differences in progression and prognosis of chronic kidney disease. *Ann Transl Med* 2020; 8(14):897. doi: 10.21037/atm.2020.03.62.
215. Si H, Banga RS, Kapitsinou P, Ramaiah M, Lawrence J, Kambhampati G et al. Human and murine kidneys show gender- and species-specific gene expression differences in response to injury. *PLoS One* 2009; 4(3):e4802. doi: 10.1371/journal.pone.0004802.
216. Uemura O, Honda M, Matsuyama T, Ishikura K, Hataya H, Yata N et al. Age, gender, and body length effects on reference serum creatinine levels determined by an enzymatic method in Japanese children: a multicenter study. *Clin Exp Nephrol* 2011; 15(5):694–9. doi: 10.1007/s10157-011-0452-y.
217. Nitsch D, Grams M, Sang Y, Black C, Cirillo M, Djurdjev O et al. Associations of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with mortality and renal failure by sex: a meta-analysis. *BMJ* 2013; 346:f324. doi: 10.1136/bmj.f324.
218. Perinpan M, Ware EB, Smith JA, Turner ST, Kardia SLR, Lieske JC. Key influence of sex on urine volume and osmolality. *Biol Sex Differ* 2016; 7:12. doi: 10.1186/s13293-016-0063-0.
219. Ebner A, Manz F. Sex difference of urinary osmolality in German children. *Am J Nephrol* 2002; 22(4):352–5. doi: 10.1159/000065226.
220. Yoon HE, Nam Y, Kang E, Hwang HS, Shin SJ, Hong YS et al. Gender-Specific Associations between Low Skeletal Muscle Mass and Albuminuria in the Middle-Aged and Elderly Population. *Int J Med Sci* 2017; 14(11):1054–64. doi: 10.7150/ijms.20286.
221. Verhave JC, Hillege HL, Burgerhof JGM, Navis G, Zeeuw D de, Jong PE de. Cardiovascular risk factors are differently associated with urinary albumin excretion in men and women. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(5):1330–5. doi: 10.1097/01.asn.0000060573.77611.73.

222. Long DA, Kolatsi-Joannou M, Price KL, Dessapt-Baradez C, Huang JL, Papakrivopoulou E et al. Albuminuria is associated with too few glomeruli and too much testosterone. *Kidney Int* 2013; 83(6):1118–29. doi: 10.1038/ki.2013.45.
223. Jones CA, Francis ME, Eberhardt MS, Chavers B, Coresh J, Engelgau M et al. Microalbuminuria in the US population: third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis* 2002; 39(3):445–59. doi: 10.1053/ajkd.2002.31388.
224. Ricardo AC, Yang W, Sha D, Appel LJ, Chen J, Krousel-Wood M et al. Sex-Related Disparities in CKD Progression. *J Am Soc Nephrol* 2019; 30(1):137–46. doi: 10.1681/ASN.2018030296.
225. Ahmed SB, Fisher NDL, Hollenberg NK. Gender and the renal nitric oxide synthase system in healthy humans. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2007; 2(5):926–31. doi: 10.2215/CJN.00110107.
226. Levey AS, Stevens LA. Estimating GFR using the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) creatinine equation: more accurate GFR estimates, lower CKD prevalence estimates, and better risk predictions. *Am J Kidney Dis* 2010; 55(4):622–7. doi: 10.1053/j.ajkd.2010.02.337.
227. Murphy D, McCulloch CE, Lin F, Banerjee T, Bragg-Gresham JL, Eberhardt MS et al. Trends in Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States. *annals of internal medicine* 2016; 165(7):473–81. doi: 10.7326/M16-0273.
228. Carrero JJ, Hecking M, Chesnaye NC, Jager KJ. Sex and gender disparities in the epidemiology and outcomes of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2018; 14(3):151–64. doi: 10.1038/nrneph.2017.181.
229. Silbiger SR, Neugarten J. The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *American Journal of Kidney Diseases* 1995; 25(4):515–33. doi: 10.1016/0272-6386(95)90119-1.
230. Silbiger SR, Neugarten J. The role of gender in the progression of renal disease. *Adv Ren Replace Ther* 2003; 10(1):3–14. doi: 10.1053/jarr.2003.50001.
231. Silbiger S, Neugarten J. Gender and human chronic renal disease. *Gend Med* 2008; 5 Suppl A:S3-S10. doi: 10.1016/j.genm.2008.03.002.

232. Tsai W-C, Wu H-Y, Peng Y-S, Ko M-J, Wu M-S, Hung K-Y et al. Risk Factors for Development and Progression of Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Exploratory Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95(11):e3013. doi: 10.1097/MD.0000000000003013.
233. Swartling O, Rydell H, Stendahl M, Segelmark M, Trolle Lagerros Y, Evans M. CKD Progression and Mortality Among Men and Women: A Nationwide Study in Sweden. *Am J Kidney Dis* 2021; 78(2):190-199.e1. doi: 10.1053/j.ajkd.2020.11.026.
234. Oudar O, Elger M, Bankir L, Ganten D, Ganten U, Kriz W. Differences in rat kidney morphology between males, females and testosterone-treated females. *Ren Physiol Biochem* 1991; 14(3):92–102. doi: 10.1159/000173392.
235. Abdi R, Slakey D, Kittur D, Racusen LC. Heterogeneity of glomerular size in normal donor kidneys: impact of race. *American Journal of Kidney Diseases* 1998; 32(1):43–6. doi: 10.1053/ajkd.1998.v32.pm9669422.
236. Neugarten J, Golestaneh L. Gender and the prevalence and progression of renal disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2013; 20(5):390–5. doi: 10.1053/j.ackd.2013.05.004.
237. Shepard BD. Sex differences in diabetes and kidney disease: mechanisms and consequences. *Am J Physiol Renal Physiol* 2019; 317(2):F456-F462. doi: 10.1152/ajprenal.00249.2019.
238. Shen Y, Cai R, Sun J, Dong X, Huang R, Tian S et al. Diabetes mellitus as a risk factor for incident chronic kidney disease and end-stage renal disease in women compared with men: a systematic review and meta-analysis. *Endocrine* 2017; 55(1):66–76. doi: 10.1007/s12020-016-1014-6.
239. Di Giosia P, Giorgini P, Stamerra CA, Petrarca M, Ferri C, Sahebkar A. Gender Differences in Epidemiology, Pathophysiology, and Treatment of Hypertension. *Curr Atheroscler Rep* 2018; 20(3):13. doi: 10.1007/s11883-018-0716-z.
240. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American

- Heart Association. *Circulation* 2015; 131(4):e29-322. doi: 10.1161/CIR.0000000000000152.
241. Song J-J, Ma Z, Wang J, Chen L-X, Zhong J-C. Gender Differences in Hypertension. *J Cardiovasc Transl Res* 2020; 13(1):47–54. doi: 10.1007/s12265-019-09888-z.
242. Veiras LC, Girardi ACC, Curry J, Pei L, Ralph DL, an Tran et al. Sexual Dimorphic Pattern of Renal Transporters and Electrolyte Homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(12):3504–17. doi: 10.1681/ASN.2017030295.
243. Doublier S, Lupia E, Catanuto P, Periera-Simon S, Xia X, Korach K et al. Testosterone and 17 β -estradiol have opposite effects on podocyte apoptosis that precedes glomerulosclerosis in female estrogen receptor knockout mice. *Kidney Int* 2011; 79(4):404–13. doi: 10.1038/ki.2010.398.
244. O'Hagan TS, Wharton W, Kehoe PG. Interactions between oestrogen and the renin angiotensin system - potential mechanisms for gender differences in Alzheimer's disease. *Am J Neurodegener Dis* 2012; 1(3):266–79.
245. Eisenbach GM, Liew JB, Boylan JW, Manz N, Muir P. Effect of angiotensin on the filtration of protein in the rat kidney: a micropuncture study. *Kidney Int* 1975; 8(2):80–7. doi: 10.1038/ki.1975.83.
246. Axelsson J, Rippe A, Oberg CM, Rippe B. Rapid, dynamic changes in glomerular permeability to macromolecules during systemic angiotensin II (ANG II) infusion in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 303(6):F790-9. doi: 10.1152/ajprenal.00153.2012.
247. Amann K, Simonaviciene A, Medwedewa T, Koch A, Orth S, Gross M-L et al. Blood pressure-independent additive effects of pharmacologic blockade of the renin-angiotensin and endothelin systems on progression in a low-renin model of renal damage. *JASN* 2001; 12(12):2572–84. doi: 10.1681/ASN.V12122572.
248. Vellanki K, Hou S. Menopause in CKD. *Am J Kidney Dis* 2018; 71(5):710–9. doi: 10.1053/j.ajkd.2017.12.019.
249. Schopick EL, Fisher ND, Lin J, Forman JP, Curhan GC. Post-menopausal hormone use and albuminuria. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(12):3739–44. doi: 10.1093/ndt/gfp321.

250. Catanuto P, Doublier S, Lupia E, Fornoni A, Berho M, Karl M et al. 17 beta-estradiol and tamoxifen upregulate estrogen receptor beta expression and control podocyte signaling pathways in a model of type 2 diabetes. *Kidney Int* 2009; 75(11):1194–201. doi: 10.1038/ki.2009.69.
251. Inker LA, Shafi T, Okparavero A, Tighiouart H, Eckfeldt JH, Katz R et al. Effects of Race and Sex on Measured GFR: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Am J Kidney Dis* 2016; 68(5):743–51. doi: 10.1053/j.ajkd.2016.06.021.
252. Inker LA, Levey AS, Tighiouart H, Shafi T, Eckfeldt JH, Johnson C et al. Performance of glomerular filtration rate estimating equations in a community-based sample of Blacks and Whites: the multiethnic study of atherosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2018; 33(3):417–25. doi: 10.1093/ndt/gfx042.
253. Wetzels JFM, Willems HL, Heijer M den. Age- and gender-specific reference values of estimated glomerular filtration rate in a Caucasian population: Results of the Nijmegen Biomedical Study. *Kidney Int* 2008; 73(5):657–8. doi: 10.1038/sj.ki.5002755.
254. Elseviers MM, Verpooten GA, Broe ME de, Backer GG de. Interpretation of creatinine clearance. *The Lancet* 1987; 1(8530):457. doi: 10.1016/s0140-6736(87)90167-x.
255. Jafar TH, Schmid CH, Stark PC, Toto R, Remuzzi G, Ruggenenti P et al. The rate of progression of renal disease may not be slower in women compared with men: a patient-level meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18(10):2047–53. doi: 10.1093/ndt/gfg317.
256. Tan A, Thomas RL, Campbell MD, Prior SL, Bracken RM, Churm R. Effects of exercise training on metabolic syndrome risk factors in post-menopausal women - A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Clin Nutr* 2023; 42(3):337–51. doi: 10.1016/j.clnu.2023.01.008.
257. Moreau KL, Hildreth KL. Vascular Aging across the Menopause Transition in Healthy Women. *Adv Vasc Med* 2014; 2014. doi: 10.1155/2014/204390.
258. Davis SR, Lambrinoudaki I, Lumsden M, Mishra GD, Pal L, Rees M et al. Menopause. *Nat Rev Dis Primers* 2015; 1:15004. doi: 10.1038/nrdp.2015.4.

259. Cignarella A, Bolego C, Barton M. Sex and sex steroids as determinants of cardiovascular risk. *Steroids* 2024; 206:109423. doi: 10.1016/j.steroids.2024.109423.
260. Tanaka H, Shiohira Y, Uezu Y, Higa A, Iseki K. Metabolic syndrome and chronic kidney disease in Okinawa, Japan. *Kidney Int* 2006; 69(2):369–74. doi: 10.1038/sj.ki.5000050.
261. Harris RC, Zhang M-Z. The role of gender disparities in kidney injury. *Ann Transl Med* 2020; 8(7):514. doi: 10.21037/atm.2020.01.23.
262. Yu M, Ryu D-R, Kim S-J, Choi K-B, Kang D-H. Clinical implication of metabolic syndrome on chronic kidney disease depends on gender and menopausal status: results from the Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25(2):469–77. doi: 10.1093/ndt/gfp483.
263. Boardman H, Hartley L, Eisinga A, Main C, Figuls MRI. Cochrane corner: oral hormone therapy and cardiovascular outcomes in post-menopausal women. *Heart* 2016; 102(1):9–11. doi: 10.1136/heartjnl-2015-308287.
264. Zhang X, Jia Y, Jackson EK, Tofovic SP. 2-Methoxyestradiol and 2-ethoxyestradiol retard the progression of renal disease in aged, obese, diabetic ZSF1 rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2007; 49(1):56–63. doi: 10.1097/fjc.0b013e31802cb88e.
265. Lovejoy JC, Champagne CM, Jonge L de, Xie H, Smith SR. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32(6):949–58. doi: 10.1038/ijo.2008.25.
266. Banack HR, Wactawski-Wende J, Hovey KM, Stokes A. Is BMI a valid measure of obesity in postmenopausal women? *Menopause* 2018; 25(3):307–13. doi: 10.1097/GME.0000000000000989.
267. The DECODE Study Group. Age- and sex-specific prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in 13 European cohorts. *Diabetes Care* 2003; 26(1):61–9. doi: 10.2337/diacare.26.1.61.
268. Kautzky-Willer A, Leutner M, Harreiter J. Sex differences in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2023; 66(6):986–1002. doi: 10.1007/s00125-023-05891-x.

269. CKD: The burden of disease invisible to research funders: AIRG-E, EKPF, ALCER, FRIAT, REDINREN, RICORS2040, SENEFRO, SET. *Nefrologia (Engl Ed)* 2022; 42(1):65–84. doi: 10.1016/j.nefro.2021.09.004.
270. Meyer MR, Barton M. Estrogens and Coronary Artery Disease: New Clinical Perspectives. *Adv Pharmacol* 2016; 77:307–60. doi: 10.1016/bs.apha.2016.05.003.
271. Wright PK, May FE, Darby S, Saif R, Lennard TW, Westley BR. Estrogen regulates vesicle trafficking gene expression in EFF-3, EFM-19 and MCF-7 breast cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2009; 2(5):463–75.
272. Wright PK, Jones SB, Ardern N, Ward R, Clarke RB, Sotgia F et al. 17 β -estradiol regulates giant vesicle formation via estrogen receptor-alpha in human breast cancer cells. *Oncotarget* 2014; 5(10):3055–65. doi: 10.18632/oncotarget.1824.
273. Lara-Cruz C, Jiménez-Salazar JE, Arteaga M, Arredondo M, Ramón-Gallegos E, Batina N et al. Gold nanoparticle uptake is enhanced by estradiol in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Nanomedicine* 2019; 14:2705–18. doi: 10.2147/IJN.S196683.
274. Machado JD, Alonso C, Morales A, Gómez JF, Borges R. Nongenomic regulation of the kinetics of exocytosis by estrogens. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301(2):631–7. doi: 10.1124/jpet.301.2.631.
275. Yabuki A, Suzuki S, Matsumoto M, Nishinakagawa H. Effects of sex hormones on the development of giant lysosomes in the proximal tubules of DBA/2Cr mouse kidney. *J Anat* 2003; 202(5):445–52. doi: 10.1046/j.1469-7580.2003.00173.x.
276. Rassat J, Robenek H, Themann H. Kidney tubule cell injury of male rats after estrogen treatment. *Exp Pathol* 1983; 23(1):35–44. doi: 10.1016/s0232-1513(83)80039-5.
277. Schiebler TH, Danner KG. The effect of sex hormones on the proximal tubules in the rat kidney. *Cell Tissue Res* 1978; 192(3):527–49. doi: 10.1007/bf00212331.
278. Kummer S, Jeruschke S, Wegerich LV, Peters A, Lehmann P, Seibt A et al. Estrogen receptor alpha expression in podocytes mediates protection against

- apoptosis in-vitro and in-vivo. PLoS One 2011; 6(11):e27457. doi: 10.1371/journal.pone.0027457.
279. He H, Yang F, Liu X, Zeng X, Hu Q, Zhu Q et al. Sex hormone ratio changes in men and postmenopausal women with coronary artery disease. *Menopause* 2007; 14(3 Pt 1):385–90. doi: 10.1097/01.gme.0000235369.24479.dd.
 280. Rinaldi S, Dossus L, Keski-Rahkonen P, Kiss A, Navionis A-S, Biessy C et al. Circulating endogenous sex steroids and risk of differentiated thyroid carcinoma in men and women. *Int J Cancer* 2024; 154(12):2064–74. doi: 10.1002/ijc.34872.
 281. Gross M-L, Adamczak M, Rabe T, Harbi NA, Krttil J, Koch A et al. Beneficial Effects of Estrogens on Indices of Renal Damage in Uninephrectomized SHRsp Rats. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(2):348–58. doi: 10.1097/01.asn.0000105993.63023.d8.
 282. Vasconsuelo A, Pronsato L, Ronda AC, Boland R, Milanesi L. Role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis. *Steroids* 2011; 76(12):1223–31. doi: 10.1016/j.steroids.2011.08.001.
 283. Elliot SJ, Berho M, Korach K, Doublier S, Lupia E, Striker GE et al. Gender-specific effects of endogenous testosterone: female alpha-estrogen receptor-deficient C57Bl/6J mice develop glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2007; 72(4):464–72. doi: 10.1038/sj.ki.5002328.
 284. Komukai K, Mochizuki S, Yoshimura M. Gender and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Fundam Clin Pharmacol* 2010; 24(6):687–98. doi: 10.1111/j.1472-8206.2010.00854.x.
 285. Schunkert H, Danser AH, Hense HW, Derkx FH, Kürzinger S, Riegger GA. Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation* 1997; 95(1):39–45. doi: 10.1161/01.cir.95.1.39.
 286. Bitzer M, Wiggins J. Aging Biology in the Kidney. *Adv Chronic Kidney Dis* 2016; 23(1):12–8. doi: 10.1053/j.ackd.2015.11.005.
 287. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *American Journal of Kidney Diseases* 2002; 39(2 Suppl 1):S1-266.

288. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements* 2013; 3(1):136–50. doi: 10.1038/kisup.2012.72.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei der Fertigstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hayo Castrop, der in mir das Interesse an experimenteller Forschung erst geweckt hat. Ich danke ihm herzlich für die Überlassung des Themas sowie für die exzellente Betreuung, die wortwörtlich und metaphorisch immer offene Tür, konstruktive Anregungen und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Dem Lehrstuhl für Epidemiologie – insbesondere Frau Prof. Iris Heid und Herrn Prof. Klaus Stark – danke ich herzlich für die Bereitstellung der Proben sowie die wertvolle Beratung bei statistischen Fragestellungen. Diese Unterstützung war außerordentlich bereichernd.

Ich danke dem Lehrstuhl für Biochemie – und hier besonders der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Tschochner – deren Ultrazentrifuge ich mitbenutzen durfte. Die Möglichkeit externe Laborkapazitäten zu nutzen war von unschätzbarem Wert für die Umsetzung dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön gebührt Katharina Fremter und Bernhard Gess für die zuverlässige und kompetente technische Unterstützung. Ihr Engagement, ihre Geduld und die immense Hilfsbereitschaft im Labor haben mir die praktische Arbeit sehr erleichtert und ihre Expertise hat viele Arbeitsschritte überhaupt erst ermöglicht.

Nicht zuletzt danke ich meinen Kolleginnen und Mitstreiterinnen Lorena Mornhinweg, Luisa Schnobrich, Hannah Triebel, Julia Helmchen und Vera Ziegler. Danke für die gute Zusammenarbeit, den fachlichen Austausch sowie die moralische Unterstützung und die vielen motivierenden Gespräche während unserer gemeinsamen Zeit als Doktorandinnen.

11 Selbstständigkeitserklärung

Ich, Rike Brigitte Felgner, geboren am 12.03.1996 in Mainz, erkläre,

- dass ich den Doktorgrad der Medizin nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des medizinischen Doktorgrades zugelassen bin
- dass ich die medizinische Doktorprüfung nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen
- 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 der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.



Frankfurt am Main, 21.11.2025