



Aus der Klinik für Nephrologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Lars Christian Rump

# Molekulare Mechanismen glomerulärer Permeabilität

Habilitationsschrift  
zur Erlangung der Venia Legendi für Innere Medizin an der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dr. med. Eva Königshausen

2024

## **Inhaltsverzeichnis**

### **1 Einleitung**

- 1.1 Epidemiologie und Ursachen der chronischen Nierenerkrankheit
- 1.2 Bedeutung der Albuminurie
- 1.3 Aufbau des glomerulären Filters
- 1.4. Klinisch relevante Einflussgrößen der glomerulären Permeabilität

### **2 Darstellung und Diskussion eigener Ergebnisse**

- 2.1 Methoden zur Analyse des glomerulären Filters und dessen Permeabilität
  - 2.1.1 Expansionsmikroskopie zur Darstellung podozytärer Proteine
  - 2.1.2 *In vivo* Markierung glomerulärer Zelloberflächenproteine zur Untersuchung des glomerulären Proteintransports
  - 2.1.3 Hochsensitive Bestimmung der glomerulären Permeabilität mit fluoreszenzmarkierter Polysuccrose
- 2.2 Mechanismen der Angiotensin II vermittelten glomerulären Permeabilitätserhöhung
- 2.3 Mechanismen der Hyperglykämie induzierten Steigerung der glomerulären Permeabilität
- 2.4 Rolle der glomerulären Basalmembran bei angeborenen proteinurischen Nierenerkrankungen

### **3 Zusammenfassung**

### **4 Literaturverzeichnis**

### **5 Danksagung**

### **A1 Gesamtverzeichnis der eigenen Publikationen**

### **A2 Lebenslauf**

### **A3 Publikationen der Habilitationsschrift**

Der Habilitationsschrift liegen folgende Arbeiten zugrunde:

I. **Königshausen E**, Zierhut UM, Ruetze M, Potthoff SA, Stegbauer J, Woznowski M, Quack I, Rump LC, Sellin L.

“Angiotensin II increases glomerular permeability by beta-arrestin mediated nephrin endocytosis.”

Sci Rep **6**:39513, 2016.

PMID: 28004760

II. **Königshausen E**, Potthoff SA, Haase R, Meyer-Schwesinger C, Kaufmann E, Rump LC, Stegbauer J, Sellin L, Quack I, Woznowski M.

“Isolation of Glomeruli and *In Vivo* Labeling of Glomerular Cell Surface Proteins.”

J Vis Exp. 18;(143). doi: 10.3791/58542., 2019.

PMID: 30735184

III. **Königshausen E**, Potthoff SA, Woznowski M, Stegbauer J, Rump LC, Sellin L.

“Highly Sensitive Measurement of Glomerular Permeability in Mice with Fluorescein Isothiocyanate-polysuccrose 70.”

J Vis Exp. (150). doi: 10.3791/59064, 2019.

PMID: 31449238

IV. **Königshausen E\***, Schmitz CT\*, Rump LC, Sellin L. (\*contributed equally as first authors)

„Imaging of Podocytic Proteins Nephrin, Actin, and Podocin with Expansion Microscopy.”

J Vis Exp 2021 Apr 23;(170). doi: 10.3791/629, 2021

PMID: 33970139.

V. **Königshausen E**, Zierhut UM, Ruetze M, Rump LC, Sellin L. A molecular mechanism for angiotensin II receptor blocker-mediated slit membrane protection: Angiotensin II increases nephrin endocytosis via AT1-receptor-dependent ERK 1/2 activation.

FASEB J. 2024 Sep 15;38(17):e70018. doi: 10.1096/fj.202400369R.

PMID: 39212304.

VI. Quack I, Woznowski M, Potthoff SA, Palmer R, **Königshausen E**, Sivritas S, Schiffer M, Stegbauer J, Vonend O, Rump LC, Sellin L.

“PKC alpha mediates beta-arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia.”

J Biol Chem 286:12959-12970, 2011.

PMID: 21321125.

VII. Randles MJ, Collinson S, Starborg T, Mironov A, Krendel M, **Königshausen E**, Sellin L, Roberts IS, Kadler KE, Miner JH, Lennon R.

“Three-dimensional electron microscopy reveals the evolution of glomerular barrier injury.”

Sci Rep 6:35068. 2016.

PMID: 27725732.

VIII. Haase R, Potthoff SA, Meyer-Schwesinger C, Frosch C, Wiech T, Panzer U, **Königshausen E**, Stegbauer J, Sellin L, Rump LC, Quack I, Woznowski M.

„A novel in vivo method to quantify slit diaphragm protein abundance in murine proteinuric kidney disease.”

Plos one, **12:6** e0179217. 2017.

PMID: 28604827.

IX. Woznowski MP, Potthoff SA, **Königshausen E**, Haase R, Hoch H, Meyer-Schwesinger C, Wiech T, Stegbauer J, Rump LC, Sellin L, Quack I.

„Inhibition of p38 MAPK decreases hyperglycemia-induced nephrin endocytosis and attenuates albuminuria.”

J Mol Med (Berl).,100(5):781-795. 2022.

PMID: 35451598.

*\*geteilte Erstautorenschaft*

## **Abkürzungsverzeichnis**

### **Abkürzung**

AcX	6-((Acryloyl)amino)hexansäure, Succinimidylester
ACEi	Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor
ACR	Albumin Creatinin Ratio
AER	Albumin Exkretionsrate
ADR	Adriamycin
Akt	Ak strain transforming
AT1-Rezeptor	Angiotensin II Typ I Rezeptor
ARB	Angiotensin II Rezeptor Blocker
CAS	Crk-associated substrate
CME	Clathrin-medierte Endozytose
CKD	Chronic kidney disease (Chronische Nierenkrankheit)
Crk	CT10 regulator of kinase
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ERK 1/2	Extracellular-signal regulated kinase 1/2
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
ExM	Expansions Mikroskopie
FN III	Fibronectin III
FSGS	Fokal Segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICAM-2	Intracellular adhesion molecule 2
KHK	Koronare Herzerkrankung
LATS-2	Large tumor suppressor kinase 2
Nck	non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein
NTN	Nephrotoxische Nephritis

N-wasp	Neural Wiskott Aldrich Syndrome protein
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCD	Minimal Change Disease
MRA	Mineralokortikoid Rezeptor Antagonist
Pak	P21 activated kinase
PALM	Photo-activated Localization Microscopy
PBSCM	Phosphat buffered Saline mit Kalzium und Magnesium
PICK	Protein interacting with c-kinase
PI3-K	Phosphoinositol-3 Phosphat Kinase
PLC	Phospholipase C
PKC	Proteinkinase C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
SBF-SEM	Serial block phase scanning electron microscopy (Rasterelektronenmikroskopie)
SGLT2	Sodium Glucose Transporter 2
ShcA	Src-homology/collagen adaptor protein
siRNA	Small interfering RNA
STED	Stimulated Emission Depletion
STORM	Stochastic Optical Reconstitution Microscopy
VE-cadherin	Vascular endothelial - cadherin

# 1. Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und Ursachen der chronischen Nierenkrankheit

Die chronische Nierenkrankheit (CKD) ist definiert als eine länger als 3 Monate bestehende Veränderung der Nierenfunktion oder -anatomie mit Beeinflussung der Gesundheit <sup>1</sup>. Klassifiziert wird die CKD über deren Ursache, das Stadium der glomerulären Filtrationsrate (GFR) sowie über das Ausmaß der Ausscheidung von Albumin in den Urin (Albuminurie) <sup>1</sup>. Rezente Untersuchungen legen nahe, dass weltweit ca. 700 Millionen Menschen an einer CKD leiden und weitere 150 Millionen Menschen durch eine akute Nierenschädigung oder einen vollständigen Funktionsverlust auf eine Nierenersatztherapie wie Dialyse oder Nierentransplantation angewiesen sind <sup>2</sup>. Die Bedeutung der CKD für die globale Gesundheit wird dadurch unterstrichen, dass die CKD damit fast doppelt so häufig auftritt wie der Diabetes mellitus und 20 mal so häufig wie Krebserkrankungen weltweit <sup>1,3</sup>. Durch die Zunahme der Weltbevölkerung und des Patientenalters wird ein weiterer Anstieg der CKD-Prävalenz erwartet <sup>2</sup>. Morbidität und Mortalität werden durch die Diagnose einer CKD deutlich verschlechtert, wobei die CKD weltweit die siebthäufigste Todesursache darstellt <sup>2</sup>.

In Deutschland, ebenso wie in anderen Ländern mit hohem sozio-ökonomischen Status, liegen die häufigsten Ursachen der CKD in bekannten Komorbiditäten wie dem Diabetes mellitus und der arteriellen Hypertonie, die zu einer diabetischen oder hypertensiven Nephropathie führen <sup>2</sup>. Gemeinsam ist diesen beiden Erkrankungen, dass in der frühen Phase eine Albuminurie nachgewiesen werden kann. Patienten mit Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie werden im Rahmen von Screening-Programmen leitliniengerecht auf die Entwicklung einer Albuminurie untersucht. Die Höhe und die Dauer der Albuminurie bestimmen neben weiteren Risikofaktoren die Progression der Nierenerkrankung.

## 1.2 Bedeutung einer Albuminurie

Albumin ist ein 67 Kilodalton großes Protein, das ca. 50 % des Plasmaproteinpools ausmacht und für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes im Gefäßsystem verantwortlich ist <sup>4</sup>. Der Verlust von Albumin über den Urin wird als

Albuminurie ( $\geq 30$  mg/gC) bezeichnet und ist Bestandteil der unter 1.1 dargestellten Klassifikation der CKD (Tab. 1).

Kategorie	AER (mg/24h)	ACR (mg/gC)	Bezeichnung
A1	< 30	< 30	Normal bis leicht erhöht
A2	30 - 300	30 - 300	Moderat erhöht
A3	> 300	> 300	Schwer erhöht

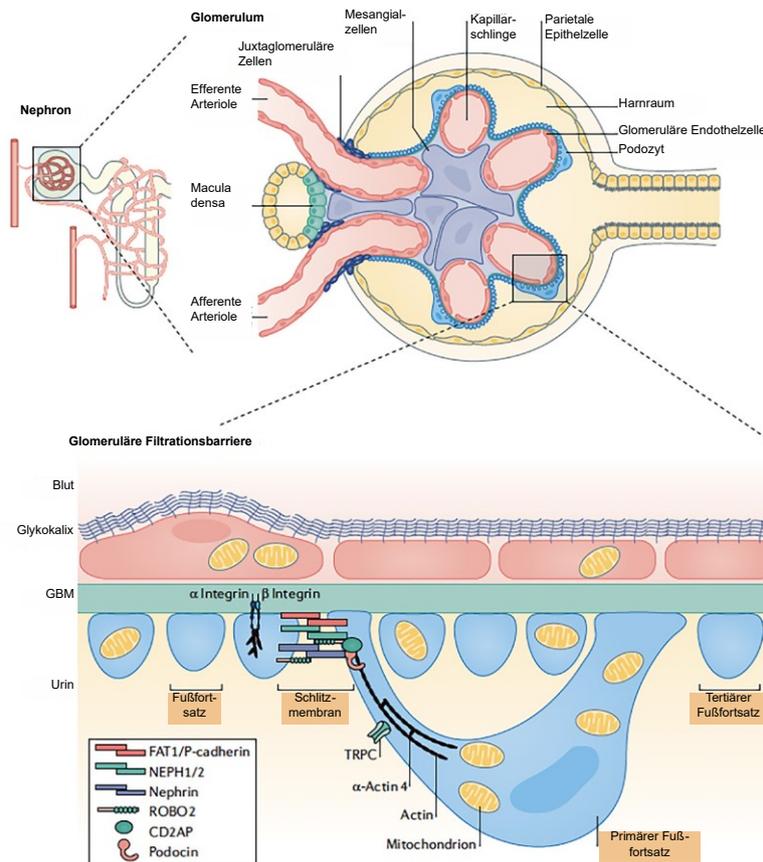
**Tab. 1: Albuminurie Kategorien bei chronischer Nierenkrankheit**

AER – Albumin Exkretionsrate ; ACR – Albumin-Creatinin Ratio; modifiziert nach <sup>1</sup>.

Metaanalysen belegen die Assoziation einer Albuminurie mit dem erhöhten Auftreten zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen wie der koronaren Herzerkrankung (KHK) <sup>5-10</sup>, dem Schlaganfall <sup>11,12</sup>, arterieller Gefäßsteifigkeit <sup>13</sup>, Herzinsuffizienz <sup>14,15</sup> und Herzrhythmusstörungen <sup>16,17</sup>. Neben der Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen geht eine Albuminurie nach Adjustierung klassischer Risikofaktoren und der eGFR mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Sterblichkeit und einer Erhöhung der Gesamtmortalität einher <sup>18,19</sup>. Interessanterweise geht bereits eine Steigerung der Albuminurie (Albumin-Kreatinin Ratio im Spoturin) von 5 mg/gC auf mehr als 10 mg/gC mit einer Verdopplung des Mortalitätsrisikos einher, obwohl die untere Normgrenze für die Albuminurie bei < 30 mg/gC festgelegt ist <sup>18,19</sup>. Der Zusammenhang zwischen einer Albuminurie und kardiovaskulären Erkrankungen ist pathophysiologisch noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass die Permeabilitätserhöhung des glomerulären Filters Ausdruck einer generalisierten vaskulären Permeabilitätsstörung sein könnte. Es ist daher sinnvoll, die pathophysiologischen Ursachen der glomerulären Permeabilitätsstörung frühzeitig im Rahmen des Krankheitsprozesses zu untersuchen, um das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen zu vertiefen und den Weg für bessere und präventive Therapiemöglichkeiten zu ebnen.

### 1.3 Aufbau des glomerulären Filters

Eine Albuminurie entsteht durch die Schädigung einer oder mehrerer Schichten des glomerulären Filters. Dieser besteht aus drei Schichten: dem fenestrierten Endothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und der glomerulären Schlitzmembran (Abb. 1).



**Abb. 1: Aufbau des glomerulären Filters**

Das Glomerulum bildet die zentrale Filtereinheit des Nephrons, welches aus einer Kapillarschlinge mit aufliegender glomerulärer Basalmembran und den glomerulären Epithelzellen (Podozyten) besteht. Der Primärharn wird durch die Filtrationsbarriere in den Harnraum filtriert. Die glomeruläre Filtrationsbarriere besteht aus drei Schichten, dem fenestrierten Endothel mit Glykokalix, der glomerulären Basalmembran und den Podozyten. Letztere bilden zwischen ihren tertiären Fußfortsätzen die glomeruläre Schlitzmembran aus, deren Hauptbestandteil Nephrin homophile Interaktion mit Nephrinmolekülen gegenüberliegender Podozyten eingeht. Nephrin ist über Adapterproteine (z.B. Podocin, CD2AP oder Nck 1/2 (nicht abgebildet)) mit dem Aktinzytoskelett verbunden. GBM – glomeruläre Basalmembran. (modifiziert nach <sup>20</sup> – Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Rechteinhaber, *Springer Nature*)

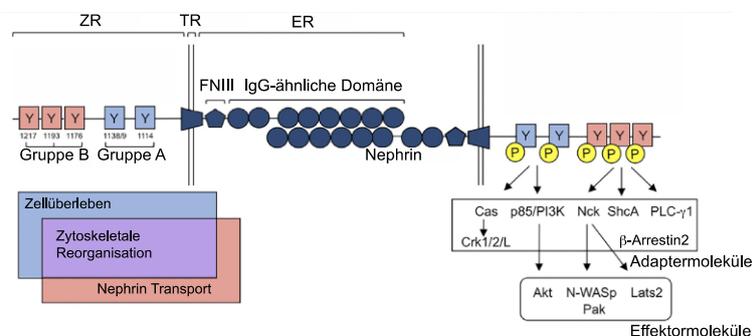
Das Endothel ist von einer negativ geladenen Glykokalix überzogen, welche blutseitig eine wichtige Barrierefunktion für die überwiegend negativ geladenen Plasmaproteine darstellt<sup>21</sup>. Wichtige Oberflächenproteine der Endothelzellen sind vascular endothelial (VE)-cadherin und intracellular adhesion molecule 2 (ICAM-2)<sup>22</sup>.

Die glomeruläre Basalmembran ist eine komplexe Struktur aus extrazellulärer Matrix (ECM), die für die normale Funktion des glomerulären Filters essenziell ist<sup>23</sup>. Mehr als 70 verschiedene ECM-Proteine konnten durch die Massenspektrometrie der glomerulären Basalmembran zugeordnet werden<sup>24</sup>. In der glomerulären Basalmembran des Erwachsenen liegen Kollagen IV Isoformen  $\alpha3\alpha4\alpha5$  als Heterotrimere vor und werden u.a. durch Laminin 521, Agrin und Perlecan ergänzt<sup>24</sup>. Beispielsweise führt eine Mutation in den für die Kollagen IV Isoformen  $\alpha3\alpha4\alpha5$  kodierenden Genen zum Alport Syndrom, welches die häufigste angeborene glomeruläre Erkrankung darstellt<sup>24</sup>. Beim Alport Syndrom kommt es zu einer Erythrozyturie (Hämaturie) und Albuminurie mit fortschreitendem Nierenfunktionsverlust, häufig begleitet von Innenohrschwerhörigkeit und Augenveränderungen<sup>24</sup>.

Bei den Podozyten handelt es sich um terminal differenzierte Epithelzellen, die aufgrund der persistierenden Filtration von Blut und den damit verbundenen hydrostatischen Kräften einer dynamischen Regulation unterliegen. Podozyten weisen sog. primäre, sekundäre und tertiäre Fußfortsätze auf, die der GBM harnseitig aufsitzen<sup>25,26</sup>. Durch ihre dynamische Verankerung in der GBM sind sie einerseits an der Stabilität des Glomerulums als auch an der Aufrechterhaltung der Filtrationsbarriere durch Ausbildung der Schlitzmembran zwischen benachbarten podozytären Fußfortsätzen beteiligt. Seit der Erstbeschreibung der glomerulären Schlitzmembran 1974 durch Rodewald und Karnovsky hat sich das Verständnis über den Aufbau und die molekulare Funktion dieses Strukturelementes in den letzten 50 Jahren mit Hilfe moderner Techniken vertieft<sup>27</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die komplexe Architektur der glomerulären Schlitzmembran flexibel, dynamisch und mehrschichtig ist<sup>28</sup>. Hauptbestandteil der glomerulären Schlitzmembran ist neben NEPH1 und Podocin das Molekül Nephrin, welches mit seinem extrazellulären Anteil homophile Interaktionen mit gegenüberliegenden Nephrinmolekülen eingeht (Abb. 1)<sup>25</sup>. Mutationen in NPHS1, dem für Nephrin kodierenden Gen, verursachen das Nephrotische Syndrom vom Finnischen Typ<sup>26</sup>, welches mit einer ausgeprägten

Proteinurie *in utero* und einem nephrotischen Syndrom bei Geburt eingehergeht. In Analogie zu dem schweren Phänotyp einer Nephrinmutation bei Menschen, zeigen Nephrin defiziente Mäuse eine gestörte Formation der glomerulären Schlitzmembran mit begleitender ausgeprägter Proteinurie<sup>29,30</sup>. Rezente Untersuchungen in einer Kohorte von Patienten mit einer sog. Minimal Change Erkrankung (MCD), die zu einem nephrotischen Syndrom führt, konnte bei bis zu 44 % der Patienten Antikörper gegen Nephrin nachgewiesen werden<sup>31,32</sup>.

Nephrin fungiert einerseits als sog. Strukturprotein, welches ein großes Netzwerk von Signal- und Verankerungsproteinen mit dem Aktinzytoskelett bildet<sup>33</sup>. Die Verankerung im Aktinzytoskelett wird über verschiedene Proteine u.a. Nck1/2 vermittelt<sup>33-36</sup>. Neben der physikalischen Barrierefunktion sowie der Verankerung im Zytoskelett fungiert der intrazelluläre Anteil von Nephrin als Signaltransduktions-Plattform durch Bindung an ein großes Netzwerk aus Signalmolekülen, die zelluläre Prozesse wie die Differenzierung, Polarität, Aktinreorganisation und Membrantrafficking steuern<sup>33</sup>. Für die Steuerung der Signaltransduktionsprozesse spielt die Nephrinphosphorylierung an konservierten Tyrosinen im Nephrin C-Terminus eine entscheidende Rolle (Abb. 2). Die Phosphorylierung von Nephrin an Tyrosin 1176, 1193 und 1217 führt zur Rekrutierung von Nck 1/2, welches wiederum Proteine, die die Aktin Polymerisation koordinieren, rekrutiert<sup>34-37</sup>. Zudem wird über Nephrin Tyrosin 1193 die Bindung an das Adapterprotein  $\beta$ -Arrestin2 vermittelt, welches eine Clathrin-medierte Endozytose (CME) von Nephrin einleitet<sup>38</sup>. Neben der CME ist auch die Clathrin unabhängige Endozytose in Podozyten beschrieben<sup>39</sup>, wobei die CME die vorherrschende Form des Proteinumsatzes des Podozyten darstellt<sup>40</sup>.



**Abb. 2: Nephrin Tyrosinphosphorylierung reguliert diverse Signalwege in Podozyten**

Nephrin ist ein transmembranäres Protein mit einer extrazellulären Region (ER), einer transmembranären Region (TR) und einer intrazellulären Region (ZR). Die ER ist aus einer singulären

Fibronectin III-artigen Domäne (FNIII) sowie acht IgG-ähnlichen Domänen aufgebaut, die homophile Interaktionen mit Nephrinmolekülen gegenüberliegender Podozyten eingehen. Im Nephrin C-Terminus befinden sich hochkonservierte Tyrosinreste, die in zwei grobe Gruppen (A und B) eingeteilt werden können. Durch Phosphorylierung der konservierten Tyrosinreste werden Adapterproteine und Effektormoleküle an Nephrin rekrutiert. Die zytoskeletale Reorganisation wird über Cas-Crk 1/2/L, Nck-N-WASp/Pak und oder PLC $\gamma$  sowohl über Gruppe A als auch B Tyrosine vermittelt. P85/PI3K-AKT Aktivierung erfolgt überwiegend über Gruppe A Tyrosine und führt zu Zellüberleben. Der Nephrintransport wird über Gruppe B Tyrosine eingeleitet (über ShcA und  $\beta$ -Arrestin2).

Cas – Crk-associated substrate, Crk – CT10 regulator of kinase, PI3K – Phosphoinositol-3-Kinase, Nck – non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein, ShcA – Src-homology/collagen adaptor protein, PLC – Phospholipase C, Akt – Ak strain transforming, N-wasp – neural wiskott Aldrich syndrome protein, LATS-2 – large tumor suppressor kinase 2, Pak – p21activated kinase, FNIII – fibronectin III, ZR – zyttoplasmatische Region, TR – transmembranäre Region, ER – extrazelluläre Region.

(modifiziert nach <sup>33</sup> – Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Rechteinhaber, *Frontiers Media S.A.*)

Wie oben erwähnt, wird durch Bindung eines Transmembranrezeptors an das ubiquitär exprimierte, intrazelluläre Adapter- und Signaltransduktionsmolekül  $\beta$ -Arrestin2 die CME eingeleitet.  $\beta$ -Arrestin2 wurde ursprünglich als Protein identifiziert, welches die Signaltransduktionsprozesse G-Protein abhängiger Rezeptoren wie z. B. des AT1-Rezeptors durch Endozytose beendet <sup>41</sup>. Mittlerweile wurde gezeigt, dass  $\beta$ -Arrestin2 eine zusätzliche Funktion als sog. Gerüst- und Signaltransduktionsmolekül mit Aktivierung verschiedenster intrazellulärer Signalwege (u.a. extracellular-signal regulated kinase (ERK 1/2)) besitzt. In Podozyten wurde bisher gezeigt, dass Nephrin mit  $\beta$ -Arrestin2 interagiert und zu einer Nephrinendozytose führt <sup>38</sup>. Die Bindungsstelle von  $\beta$ -Arrestin2 im Nephrinmolekül und auch *vice versa* war bisher jedoch nicht bekannt. Lediglich wurde Nephrin Y1193 als wichtiger Schalter zwischen der Nephrinendozytose oder dessen Bindung an Podocin etabliert <sup>38</sup>.

Bei Podocin handelt es sich um ein haarnadelförmiges, intrazelluläres Protein, das in den membranständigen sog. „Lipid Rafts“ lokalisiert ist <sup>42-44</sup>. Hierbei handelt es sich um spezielle Domänen der Zellmembran, die sich durch eine veränderte Lipid- und Proteinzusammensetzung auszeichnen und an Signalübertragung beteiligt sind. Zudem fungiert Podocin sowohl als Gerüstprotein für die glomeruläre Schlitzmembran als auch als Signalprotein <sup>45</sup>. Mutationen im Podocin kodierenden Gen (NPHS2) sind die häufigste Ursache für ein steroid-resistentes Nephrotisches Syndrom ab einem

Lebensalter von 4 Monaten und gehen mit progredientem Verlust der Nierenfunktion einher <sup>46</sup>.

#### 1.4. Klinisch relevante Einflussgrößen der glomerulären Permeabilität

Bei Nachweis einer erhöhten glomerulären Permeabilität im Sinne einer Albuminurie sollte immer die Diagnosestellung und Behandlung der zugrundeliegenden Erkrankung im Vordergrund stehen. Neben der krankheitsspezifischen Therapie werden allgemeine nephroprotektive Maßnahmen empfohlen, um die glomeruläre Permeabilität günstig zu beeinflussen. Ein kardinales Konzept bei der Verlangsamung der Progression einer CKD mit und ohne vermehrte Permeabilität ist die Verhinderung einer sog. Hyperfiltration, die durch einen vermehrten intraglomerulären Druck entsteht.

Ein wichtiger Progressionsfaktor und Treiber einer intraglomerulären Druckerhöhung ist die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS), dessen Bedeutung für die Schädigung des glomerulären Filters durch klinische und grundlagenwissenschaftliche Studien belegt ist. Seit den bahnbrechenden Studien zur Nephroprotektion durch Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitoren (ACEi) und Angiotensin II-Rezeptor Blockern (ARB) in den 80er und 90er Jahren ist die Therapie mit einer der beiden pharmakologischen Substanzklassen einer der wichtigsten Bestandteile in der Progressionsverzögerung einer CKD bei Patienten mit oder auch ohne Diabetische Nephropathie <sup>47-53</sup>. Der Wirkmechanismus der ACEi oder ARBs beruht insbesondere auf der Senkung des intraglomerulären Druckes, indem die vasokonstriktorische Wirkung von Angiotensin II an der efferenten glomerulären Arteriole inhibiert wird <sup>54</sup>. Durch ACEi und ARBs wird zudem der systemische Blutdruck reduziert und weitere Angiotensin II Effekte wie die Förderung von Inflammation unterdrückt.

Sodium Glucose Transporter (SGLT)-2 Inhibitoren wurden 2012 ursprünglich zur Behandlung des Diabetes mellitus eingeführt. Sie hemmen die Rückresorption von Glukose im proximalen Tubulus und senken somit den Blutzucker. Placebo-kontrollierte Studien und Metaanalysen konnten zeigen, dass SGLT2-Inhibitoren das Risiko für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen, Herzinsuffizienz und CKD bei Patienten mit und ohne Diabetes mellitus reduzieren <sup>55-57</sup>. SGLT2-Inhibitoren reduzieren das Risiko für die Progression einer CKD, wie in einer großen Metaanalyse

gezeigt, um 37 % unabhängig vom Vorhandensein eines Diabetes mellitus <sup>55</sup>. Die Ursache der nephroprotektiven Eigenschaften von SGLT2-Inhibitoren sind bisher nicht vollständig verstanden. SGLT2-Inhibitoren hemmen den Natrium-Glukose Co-Transporter im proximalen Tubulus und erhöhen so die Ausscheidung von Glukose und Natrium. Durch vermehrte Natriurese senken SGLT2-Inhibitoren einerseits diskret den systemischen Blutdruck und aktivieren andererseits den tubuloglomerulären Feedback. Durch Aktivierung dessen wird die zuführende Arteriole des Glomerulums kontrahiert, so dass der intraglomeruläre Druck sinkt und eine Hyperfiltration verhindert wird <sup>58,59</sup>. In klinischen und präklinischen Studien wurde u.a. eine Reduktion proinflammatorischer und profibrotischer Marker sowie eine Verbesserung der Energieeffizienz der Niere gezeigt, die zu den nephroprotektiven Eigenschaften von SGLT2-Inhibitoren beitragen <sup>60</sup>.

Bei Patienten mit diabetischer Nephropathie konnte durch Hemmung mit dem nichtsteroidalen Mineralokortikoidrezeptor Antagonisten (MRA) Finerenon eine Senkung der glomerulären Permeabilität sowie eine Reduktion einer CKD-Progression erreicht werden <sup>61</sup>. Analog zu den SGLT2-Inhibitoren wurde eine verminderte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Diabetes mellitus gezeigt <sup>62</sup>. Nichtsteroidale MRAs senken diskret den systemischen Blutdruck, verringern den oxidativen Stress, verbessern eine endotheliale Dysfunktion und wirken antifibrotisch <sup>63</sup>. Bei Patienten ohne Diabetes mellitus werden bei fehlender Studienlage steroidbasierte MRAs zur Reduktion einer großen Proteinurie eingesetzt.

Weitere beeinflussbare und anerkannte Progressionsfaktoren einer Albuminurie und CKD sind der Blutzucker, die Menge des Salzkonsums sowie der arterielle Blutdruck. Hierbei gilt, je höher der jeweilige Progressionsfaktor ist, desto höher ist der Einfluss auf die Albuminurie und die Wahrscheinlichkeit einer CKD-Progression.

## **2. Darstellung und Diskussion eigener Ergebnisse**

### **2.1 Methoden zur Analyse des glomerulären Filters und dessen Permeabilität**

(Publikationen II, III, IV)

Um die komplexe Struktur des glomerulären Filters, insbesondere der Podozyten, bei erworbenen Nierenerkrankungen einfacher und präziser zu untersuchen, haben wir

neue Untersuchungsmethoden zur Analyse der beteiligten Strukturen auf ultrastruktureller und molekularer Ebene etabliert.

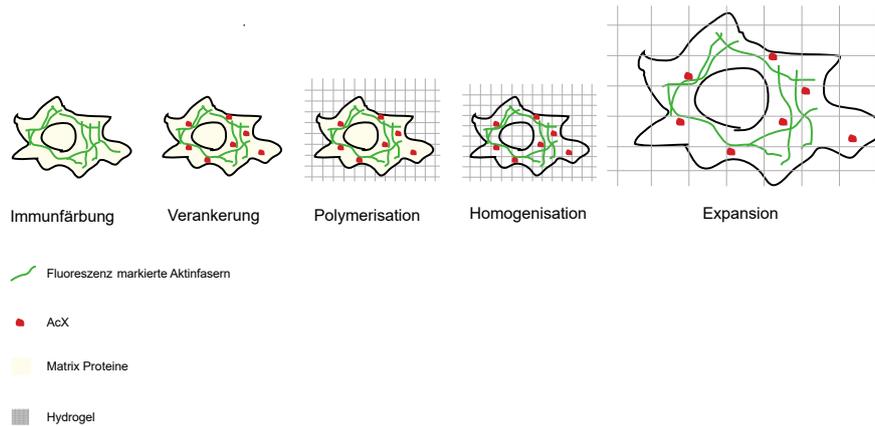
### 2.1.1 Expansionsmikroskopie zur Darstellung podozytärer Proteine (Publikation IV)

Mikroskopische Untersuchungen des glomerulären Filters nehmen seit Jahrzehnten eine zentrale Rolle in der Diagnostik und Erforschung von Nierenerkrankungen ein. Die Ultrastruktur des glomerulären Filters kann aufgrund der Auflösungsgrenze des Lichtes (200 nm) jedoch nur mit der hochauflösenden Elektronenmikroskopie beurteilt werden <sup>64</sup>. Seit den 2000er Jahren wurden zudem neue mikroskopische Techniken, wie „Stimulated Emission Depletion (STED)“ <sup>65,66</sup>, „Photo-activated Localization Microscopy (PALM)“, „Stochastic Optical Reconstitution Microscopy (STORM)“ <sup>67</sup> u.a. entwickelt, die eine Auflösung von bis zu 10 nm ermöglichen und bisher für wissenschaftliche Zwecke genutzt werden. Die so genannte Super Resolution Mikroskopie und die Elektronenmikroskopie sind aufgrund der sehr teuren Mikroskope und der aufwendigen Mitarbeiterausbildung nur in wenigen Laboren verfügbar.

2015 wurde die Technik der Expansionsmikroskopie (ExM) erstmalig beschrieben <sup>68</sup>. Sie beruht auf dem Prinzip, dass eine biologische Probe in einem Polyelektrolyt-Hydrogel verankert wird, welches durch Kontakt mit Wasser anschwillt und expandiert. Die zu untersuchende Probe wird durch die Gelexpansion isotrop physikalisch so vergrößert, dass die Auflösung der Probe in den Bereich der Super Resolution Mikroskopie reicht (je nach Protokoll bis zu 10 nm). Für die Untersuchung der ExM behandelten Probe reicht ein normales Fluoreszenzmikroskop aus, so dass diese Methode in zahlreichen Laboren genutzt werden kann.

Glomeruläre Strukturen wurden mit ExM bisher nur in murinen und humanen Nierengewebe visualisiert <sup>69,70</sup>. Wir haben die ExM Methode zur Darstellung Schlitzmembran-assoziiertes Proteine und deren Verankerung mit dem Aktinzytoskelett *in vitro* etabliert <sup>71</sup>. Das Prinzip der ExM-Methode ist in Abbildung 3 erklärt. Cos7-Zellen exprimierten die Schlitzmembranproteine Podocin und Nephrin. Nach Fixierung der Zellen wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Podocin und Nephrin durchgeführt und die Aktinfasern mit einem ExM kompatiblen Phalloidin markiert. Nach abgeschlossener Immunfärbung folgte einer der essenziellen Schritte für die erfolgreiche Durchführung der ExM: die Verankerung aller Proteine (und Immunfluoreszenzantikörper) im Hydrogel. Diese Verankerung wurde durch 6-((Acryloyl)amino)hexansäure, Succinimidylester (AcX) erreicht, welches an

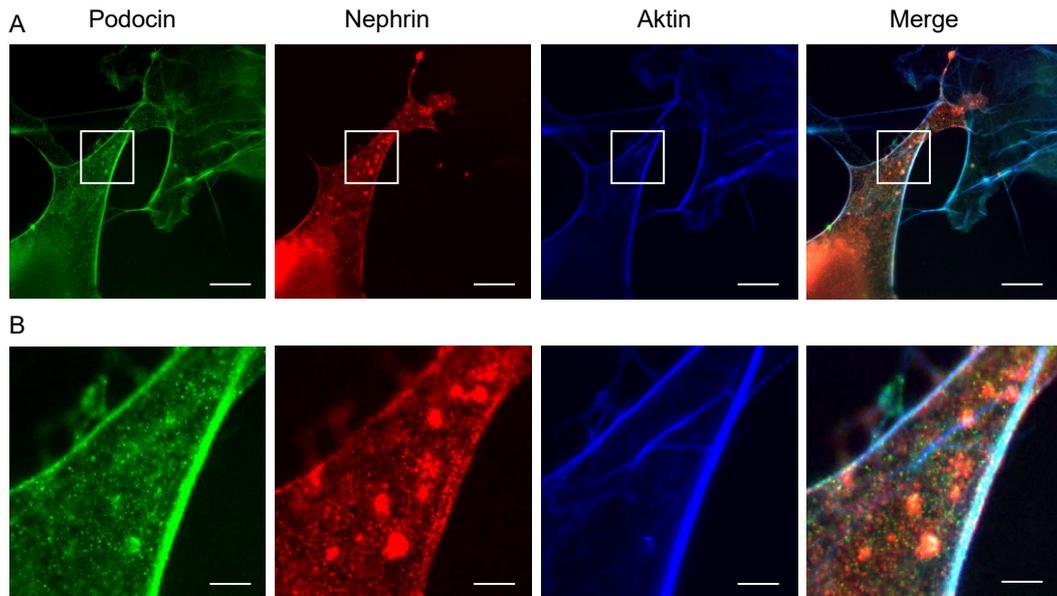
Amingruppen von Proteinen kovalent bindet und so deren Inkorporation im Hydrogel vermittelt<sup>72,73</sup>. Nach Verankerung mit AcX polymerisierte das auf der Probe gegossene Hydrogel. Durch Applikation von Proteinase K wurden die im Hydrogel verankerten Strukturproteine der Probe homogenisiert. Erst durch den Verdau der relevanten Strukturproteine mit Proteinase K wurde die im Folgenden durchgeführte Expansion der Probe durch Wasser ohne die Entstehung von Rissartefakten ermöglicht.



### Abb. 3: Prinzip der Expansionsmikroskopie

Nach Transfektion der Zellen erfolgt die Immunfärbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern. Das Molekül AcX (rote Punkte) bindet an Proteine und vermittelt deren Verankerung mit dem im nächsten Schritt gegossenen Hydrogel. Alle Proteine und Fluoreszenzantikörper sind kovalent mit AcX und Hydrogel gebunden (Polymerisation). Durch Verdau relevanter Strukturproteine (gelb) kommt es zur Homogenisation der Probe. Die Expansion der Probe erfolgt durch Dialyse in Wasser. AcX - 6-207 ((Acryloyl)amino)hexanoid Säure, succinimidyl Ester. (modifiziert nach<sup>71</sup> – Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Rechteinhaber, JoVE.)

Mithilfe dieser neuen ExM Technik wurde die Kolokalisation der Schlitzmembran- und Adaptorproteine Nephrin und Podocin mit Aktin gezeigt (Abb. 4). Es konnte eine maximale Expansion der Zellen um den Faktor 4 erreicht werden, welche in einer Auflösung von ca. 70 nm (bei einer 1,15 numerischen Apertur) resultiert. Diese Vergrößerung erlaubt noch keine ultrastrukturelle Auflösung wie im Elektronenmikroskop. Es handelt sich jedoch um eine deutlich präzisere Visualisierung der Kolokalisationen der genannten Schlitzmembranproteine mithilfe eines normalen Fluoreszenzmikroskopes.



**Abb. 4: ExM Technik: Podocin kolokalisiert mit Nephrin und Aktin**

Cos7 Zellen wurden mit Antikörpern gegen Podocin (grün), Aktin (blau) und Nephrin (rot) gefärbt und mittels ExM dargestellt. (A) Podocin kolokalisiert mit Nephrin und Aktin (weiß). Messbalken = 200 nm, Expansionsfaktor 4. (B) Digitale Vergrößerung des markierten Ausschnittes in (A), Messbalken = 40 nm. (modifiziert nach <sup>71</sup> – Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Rechteinhaber, JoVE.)

### 2.1.2 In vivo Markierung glomerulärer Zelloberflächenproteine zur Untersuchung des glomerulären Proteintransports (Publikation II, VIII)

Neben der ultrastrukturellen Darstellung von Nephrin und anderen Schlitzmembranproteinen interessierte uns zudem die Untersuchung der Oberflächenexpression Schlitzmembran-assoziiierter Proteine wie Nephrin *in vivo*. Eigene Untersuchungen sowie Erkenntnisse anderen Arbeitsgruppen konnten mit *ex vivo* Untersuchungsmethoden zeigen, dass podozytäre Oberflächenproteine nach Markierung mit Biotin in die Zelle aufgenommen (endozytiert) werden und eine Albuminurie im Mausmodell resultiert <sup>38,40,74,75</sup>. Für diese Untersuchungen wurden zur Untersuchung des Proteintransportes Glomeruli isoliert. Jedoch kann es bei der Isolation von Glomeruli zur *ex vivo* Markierung von Oberflächenproteinen zu Scherkräften und mechanischer Manipulation an den Glomeruli kommen, so dass eine Beeinflussung der Proteinendozytose nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Wir haben daher eine neue *in vivo* Methode zur Untersuchung von glomerulären Oberflächenproteinen in Mäusen etabliert <sup>76</sup>. Mit dieser Methode werden sowohl

endotheliale als auch podozytäre Proteine mit Biotin markiert und können nach Isolation der Glomeruli weiter zellspezifisch analysiert werden.

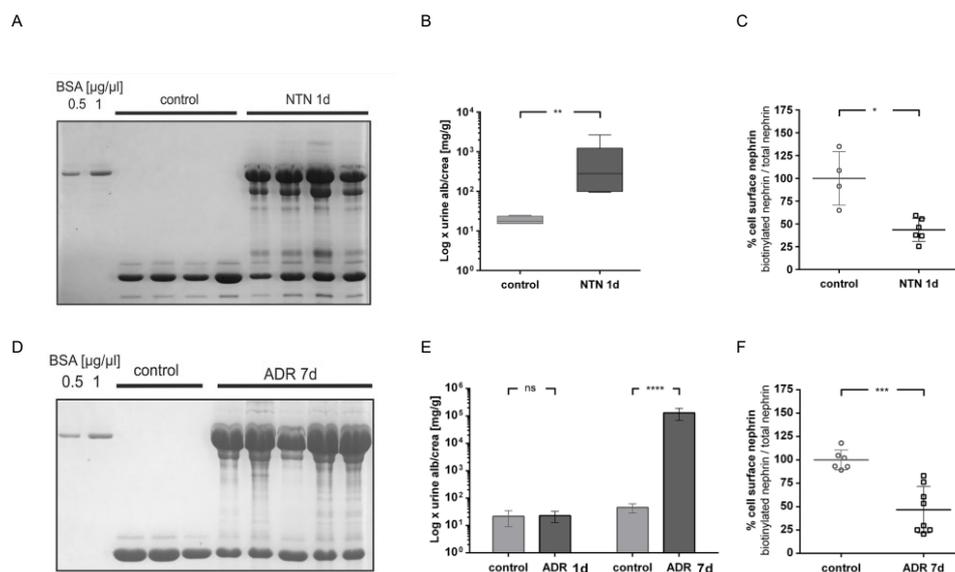
Die Mausnieren werden mit eiskaltem phosphathaltigem Puffer mit Kalzium und Magnesium (PBSCM) perfundiert. Nachfolgend werden die Nieren zur Markierung aller Oberflächenproteine mit einer Biotin-haltigen PBSCM Lösung durchspült. Durch anschließende Perfusion mit Glycin-haltiger PBSCM Lösung werden unspezifische Bindungen reduziert. Die Isolation der nun markierten Glomeruli wird mit Hilfe einer Perfusion mit kleinen magnetischen Kügelchen (Beads) erreicht, welche die Größe der glomerulären Kapillaren aufweisen, und diese daher embolisieren. Nach enzymatischem Verdau und mechanischer Passage des Nierengewebes durch ein 100 µm Sieb werden die Biotin-markierten Glomeruli mit verschiedenen Waschschritten und einem Magneten isoliert und aufgereinigt. Nach Lyse und Proteinbestimmung werden die glomerulären Lysate mit Streptavidin-Agarose Beads inkubiert. Streptavidin bindet hochaffin an Biotin und ermöglicht so die Trennung von biotinylierten (*in vivo* an der Oberfläche von Zellen exprimierten Proteinen) und nicht biotinylierten Proteinen (*in vivo* intrazellulär exprimierten Proteinen) durch Immunopräzipitation. Die beiden Proteinfractionen werden mittels Westernblotanalyse durch Antikörper (z.B. gegen Nephrin oder Podocalyxin als Markerproteine von Podozyten) markiert <sup>76</sup>.

Anhand dieser entwickelten *in vivo* Biotinylierungsmethode konnte gezeigt werden, dass die an der Oberfläche von Podozyten exprimierten Proteine Nephrin und Podocalyxin das Prinzip der *in vivo* Biotinylierung bestätigen. Intrazelluläre Proteine wie z.B. Extracellular-signal regulated kinase (ERK) 1/2 hingegen wurden nicht biotinyliert <sup>76</sup>. Neben podozytären Proteinen wurde zudem das endotheliale Oberflächenprotein VE-cadherin mit dieser *in vivo* Biotinylierungsmethode nachgewiesen und bestätigt, dass diese Methode zur Untersuchung endothelialer Oberflächenproteine geeignet ist <sup>76</sup>.

Im Folgenden wurde die Nephrinoberflächenexpression in zwei proteinurischen Erkrankungsmodellen mit Hilfe der *in vivo* Biotinylierungsmethode in Mäusen untersucht <sup>77</sup>. Für die Induktion der Nephrotoxischen Nephritis (NTN) wurde C57Bl/6 Mäusen ein nephrotoxisches Serum (Serum gegen murine glomeruläre Basalmembran) injiziert, welches ein etabliertes Modell für eine Immunkomplex-Glomerulonephritis darstellt <sup>78</sup>. An Tag 1 der NTN zeigte sich eine deutliche Zunahme der Albuminurie, die mit einer Reduktion von Nephrin an der podozytären Membran

verbunden ist <sup>78</sup>. Der Nephtrinverlust von der Oberfläche betrug in NTN behandelten Mäusen im Vergleich mit den Kontrollmäusen 57 %, während die Gesamt Nephtrinmenge in beiden Gruppen vergleichbar blieb (Abb. 5)<sup>76,77</sup>. Die späte Phase der NTN zeichnet sich durch einen deutlichen Rückgang der Albuminurie aus <sup>76,77</sup>. Entsprechend zeigten sich 18 Tage nach Auslösung der NTN keine signifikanten Unterschiede in der Oberflächenexpression von Nephtrin zwischen Kontroll- und NTN behandelten Tieren <sup>76,77</sup>.

Die Adriamycin (ADR) induzierte Nephropathie ist ein Krankheitsmodell für die Fokal-Segmentale Glomerulosklerose (FSGS) und die CKD <sup>79</sup>. An Tag 7 nach ADR Injektion konnte eine 4-fache Zunahme der Albuminurie detektiert werden <sup>77</sup>, die mit einer Abnahme der Oberflächenexpression von Nephtrin um 53 % im Vergleich zur Kontrolle einherging (Abb. 5) <sup>77</sup>.



**Abb. 5: Albuminurie und Nephtrinexpression in zwei Modellen einer proteinurischen Nierenerkrankung**

(A) Commassiegel mit Nachweis einer deutlichen Albuminurie in NTN-behandelten Tieren an Tag 1 (d1) im Vergleich zur Kontrolle. (B) Quantitative Albumin-Creatinin Ratio (ACR) von Kontrolltieren (control) vs. NTN-behandelten Tieren (NTN d1). \*\*p<0,01 (Kontrolle n = 4, NTN n = 6). (C) Densitometrische Analyse von Westernblots dargestellt als Biotinyliertes Nephtrin bezogen auf Gesamtnephtrin, \*p<0,01 (Kontrolle n = 4, NTN n = 6). (D) Commassiegel in Kontrollmäusen (control) und Adriamycin-behandelten Tieren (ADR) an Tag 7. (E) ACR von Kontrollmäusen (control) vs. ADR an Tag 1 und Tag 7, \*\*\*\*p<0,0001 (Kontrolle n = 9, ADR n = 12). (F) Densitometrie von Westernblots dargestellt als biotinyliertes Nephtrin/Gesamtnephtrin \*\*\*p < 0,001 (Kontrolle n = 6, ADR n = 8).

BSA – bovines serum albumin, NTN – Nephrotoxic Serum Nephritis, alb/crea – Albumin/Creatinin Ratio, ADR – Adriamycin.

(modifiziert nach <sup>76,77</sup> – Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Rechteinhaber, *JoVE and PLOS.*)

Beide Modelle einer proteinurischen Nierenerkrankung zeigten eine inverse Korrelation der Oberflächenexpression von Nephrin mit der Albuminurie als Zeichen der schweren podozytären Schädigung.

### 2.1.3 Hochsensitive Bestimmung der glomerulären Permeabilität mit fluoreszenzmarkierter Polysuccrose (*Publikation III*)

Schwere podozytäre Schädigungen gehen im Tiermodell und auch beim Menschen mit einer ausgeprägten Albuminurie einher. Hingegen lassen sich transiente und geringfügige Erhöhungen der glomerulären Permeabilität durch Sammelurinmessungen oder Spontanurinuntersuchungen im Tiermodell häufig nicht ausreichend gut detektieren. Es gab bereits durch die Arbeitsgruppe von B. Rippe den Versuch, das Problem der sensitiven Detektion einer transienten und geringfügigen glomerulären Permeabilitätserhöhung zu adressieren. Diese sensitive Methode nutzt die Applikation einer Fluoreszenzmarkierten Trägersubstanz, FITC-Polysuccrose, im Rattenmodell <sup>80</sup>. Das Polysuccrosemolekül hat dabei die Größe von Albumin (FITC-Polysuccrose 70). Eine andere Arbeitsgruppe transferierte dieses Modell in die Maus. Allerdings erwies sich die weitere Aufarbeitung des Urins (zur Analyse der FITC-Polysuccrose 70 Konzentration und der GFR) durch vorherige Aufreinigung mittels aufwendiger Gel Filtration oder größenselektive Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) in beiden Fällen als zeit-, kosten- und materialintensiv <sup>81,82</sup>.

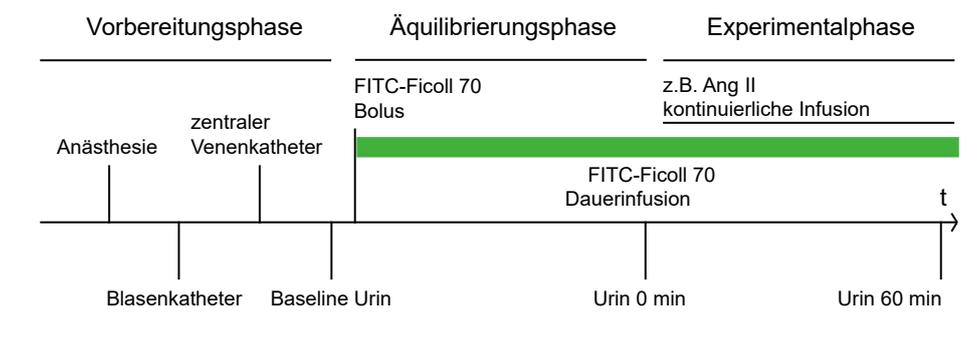
In der zugrundeliegenden Publikation wird eine alternative, hochsensitive, nicht-radioaktive Methode beschrieben, durch die die glomeruläre Permeabilität von Mäusen mit transienter glomerulärer Schädigung durch eine einfache Analyse des Urins untersucht werden kann <sup>74,83</sup>. Diese neue Methodik zur hochsensitiven Bestimmung der glomerulären Permeabilität steht somit zahlreichen Laboren ohne HPLC oder Gel-Filtrationsmöglichkeit zur Verfügung.

FVB-Mäusen wurde ein transjugulärer Katheter angelegt, über den FITC-markierte Polysuccrose 70 kontinuierlich infundiert wurde (Abb. 6). Nach einer Äquilibrationsphase wurde den Mäusen eine nicht blutdruckwirksame Dosis von Angiotensin II infundiert und der Blutdruck überwacht. Der Urin wurde über einen

Blasenkatheter gewonnen, um Blutkontaminationen bei Blasenpunktionen oder Urethrotomie zu vermeiden. Die Analyse des Urins wurde bei sehr geringen Mengen (5  $\mu$ l) auf einem Fluoreszenzplattenreader (FITC-Polysucrose 70 Fluoreszenz) durchgeführt und auf die Kreatininkonzentration im Urin (Bestimmung durch Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)) normalisiert<sup>83</sup>. In bisherigen Protokollen wurde die GFR als Referenz aufwendig radioaktiv mit <sup>51</sup>Cr-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) gemessen<sup>80,84</sup>.

Anhand dieser Methode konnte eine signifikante Steigerung der glomerulären Permeabilität durch Angiotensin II gezeigt werden<sup>74,83</sup>. Die Angiotensin II vermittelte Permeabilitätserhöhung wurde durch Vorbehandlung mit einem ARB verhindert<sup>74,83</sup>.

Zusammengefasst wurde eine deutliche Vereinfachung der Urinanalyse durch weniger invasive Gewinnung des Urins sowie den Verzicht auf radioaktive Messung der GFR und aufwendige Aufreinigungsverfahren des Urins in dieser neuen Methode etabliert.



**Abb: 6: Ablauf der glomerulären Permeabilitätsmessung mit FITC-Polysucrose (Ficoll) 70**

Ein Blasenkatheter wird der narkotisierten Maus angelegt. Nach Implantation des zentralen Venenkatheters wird der Baseline Urin entnommen und ein Bolus von FITC-Ficoll 70 gefolgt von einer Dauergabe infundiert. Am Ende der Äquilibrationsphase wird der Urin zum Zeitpunkt 0 Minuten (0 min) entnommen. 60 Minuten nach Beginn einer Angiotensin II Infusion wird der Urin erneut gewonnen und analysiert. (modifiziert nach<sup>83</sup>– Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Rechteinhaber, JoVE.)

## 2.2 Mechanismen der Angiotensin II vermittelten glomerulären Permeabilitätserhöhung (Publikationen I, V)

Wie bereits unter 1.4 genannt, trägt die RAAS Blockade wesentlich zur Reduktion einer Albuminurie bei. Therapie mit ACEi oder ARBs reduzieren und verzögern die Entwicklung einer Albuminurie im Kontext der diabetischen und hypertensiven

Nephropathie<sup>47-53</sup>. Seit Jahren ist bekannt, dass die Senkung der Albuminurie über den blutdrucksenkenden Effekt dieser Substanzen hinausgeht<sup>53,85</sup>. Ein molekularer Effekt auf den glomerulären Filter wurde seither postuliert. Ziel der hier vorgelegten Arbeiten war es, einen molekularen, blutdruckunabhängigen Effekt von Angiotensin II auf den glomerulären Filter zu untersuchen. Aus den Vorarbeiten war bekannt, dass eine vermehrte Nephriendozytose zu einer glomerulären Permeabilitätserhöhung führt. Es wurde daraufhin die Hypothese aufgestellt, dass Angiotensin II zu einer blutdruckunabhängigen glomerulären Permeabilitätserhöhung durch Steigerung der Nephriendozytose führt.

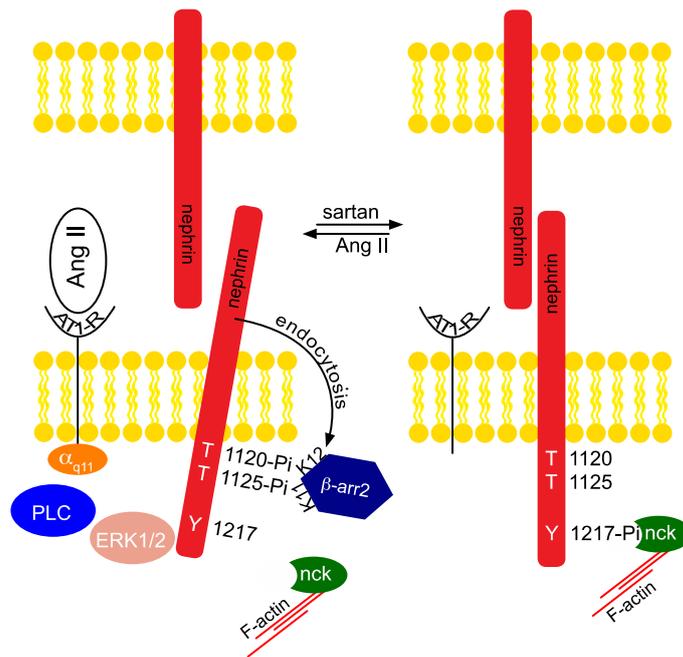
Zur Prüfung der Hypothese wurde mithilfe der glomerulären Permeabilitätsmessung mit FITC-Ficoll (wie unter 2.1.2 beschrieben) eine signifikante, blutdruckunabhängige Steigerung der glomerulären Permeabilität durch Angiotensin II gezeigt<sup>74</sup>. Diese konnte durch die Therapie mit dem ARB Candesartan signifikant reduziert werden<sup>74</sup>. Zur Klärung des zugrundeliegenden Mechanismus wurden murine Glomeruli mit Angiotensin II *ex vivo* stimuliert. Daraus resultierte eine verstärkte endogene Interaktion von Nephrin mit dem Adaptermolekül  $\beta$ -Arrestin2<sup>74</sup>. Folge der Nephrin  $\beta$ -Arrestin2-Interaktionsverstärkung durch Angiotensin II ist die gesteigerte Nephriendozytose, die sowohl in HEK293T Zellen als auch in Podozyten gezeigt werden konnte<sup>74,86</sup>. Um die vermehrte Nephriendozytose durch Angiotensin II mithilfe einer weiteren Technik darzustellen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Es zeigte sich eine vermehrte Kolo-kalisation von Nephrin mit einem Marker von sog. „späten Endosomen“ rab 7, welche die Lokalisation von Nephrin in Endosomen der Zelle bestätigte<sup>86</sup>. Mithilfe des unter 2.1.2 beschriebenen Verfahrens der *in vivo* Biotinylierung wurde zudem eine Reduktion der Nephrioberflächenexpression nach 60 min Angiotensin II Infusion in murinen Glomeruli dokumentiert, die durch Gabe eines ARB geblockt wurde<sup>74</sup>.

Im Weiteren wurde der zugrundeliegende intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismus der vermehrten  $\beta$ -Arrestin2 vermittelten Nephriendozytose entschlüsselt. Der Angiotensin II Effekt auf die Nephrin  $\beta$ -Arrestin2 Interaktion ist abhängig vom AT1-Rezeptor und dessen Signaltransduktion<sup>74,86</sup>. Durch Mutanten des AT1-Rezeptors, Inhibitoren verschiedener sekundärer Botenstoffe sowie durch Einsatz der siRNA-Technologie konnte gezeigt werden, dass sowohl die G-Protein-abhängige Signaltransduktion als auch die G-protein unabhängige Signaltransduktion des AT1-Rezeptors für die Angiotensin II vermittelte

Bindungsverstärkung von Nephrin mit  $\beta$ -Arrestin2 verantwortlich ist <sup>74,86</sup>. Hemmung der Phospholipase C (PLC) mit U73122 verhindert die Angiotensin II bedingte Verstärkung der Nephrin  $\beta$ -Arrestin2 Bindung und reduziert die Nephrinendozytose <sup>74</sup>. Sowohl PLC als auch die G-Protein unabhängigen Signale des AT1-Rezeptors - wie die EGFR-Transaktivierung und die  $\beta$ -Arrestin2 abhängige Signaltransduktion – resultieren in einer Aktivierung der extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 <sup>86</sup>. Die Hemmung des ERK 1/2 Signalweges verhindert die Angiotensin II vermittelte Nephrin  $\beta$ -Arrestin2 Bindungsverstärkung und die Nephrinendozytose <sup>86</sup>.

Zudem wurde Nephrin Y1217 als essenzielle Aminosäure für die verstärkte Bindung an  $\beta$ -Arrestin2 durch Analyse trunkierter Proteine sowie Mutationsanalysen ermittelt <sup>74</sup>. Nephrin Y1217 stellt dabei eines der Bindungsstellen für ein weiteres wichtiges Nephrin Adapterprotein Nck2 dar, welches den Kontakt zum Aktinzytoskelett vermittelt <sup>34-37</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass unter Angiotensin II Stimulation die Bindung von Nephrin an Nck2 abnimmt und so eine Verschiebung einer stabilen Verankerung im Aktinzytoskelett zugunsten einer Nephrinendozytose mit resultierender glomerulärer Permeabilitätserhöhung unter Angiotensin II stattfindet <sup>74</sup>.

Zusammengefasst konnte einerseits die  $\beta$ -Arrestin2 abhängige Nephrinendozytose als ein molekularer Effekt von Angiotensin II auf den glomerulären Filter identifiziert werden (Abb. 7). Andererseits wurde der zugrundeliegende Signaltransduktionsmechanismus entschlüsselt. Diese wissenschaftlichen Erkenntnisse stellen eine Erklärung für den seit Jahren postulierten Blutdruck unabhängigen Effekt von ARBs auf die Albuminurie dar.



**Abb. 7: Mechanismus der Angiotensin II bedingten, blutdruckunabhängigen Nephrin-endozytose und Erhöhung der glomerulären Permeabilität**

Angiotensin II (Ang II) aktiviert den AT1-Rezeptor (AT1-R), der über Gαq/11, PLC und ERK 1/2 intrazellulär das Signal zur Nephrinphosphorylierung an T1120/T1125 weitergibt. Phosphoryliertes T1120/T1125 wird zur β-Arrestin2 Bindungsstelle<sup>75</sup>. Durch β-Arrestin2 Bindung über K11/K12 resultiert eine verstärkte Nephrinendozytose. Durch Inhibition des AT1-Rezeptors mit ARBs wird die Nephrin-β-Arrestin2 Bindung reduziert. Sartan = ARB, AT1-R – Angiotensin II Typ 1 Rezeptor, PLC – Phospholipase C, ERK 1/2 – extracellular signal-regulated kinase 1/2, β-arr2 - β-Arrestin2. (modifiziert nach<sup>86</sup> – Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Rechteinhaber, *John Wiley and Sons.*)

### 2.3. Mechanismen der Hyperglykämie induzierten Steigerung der glomerulären Permeabilität (Publikationen VI, IX)

Neben glomerulären Schäden durch eine unbehandelte arterielle Hypertonie stellt der Diabetes mellitus die häufigste Ursache für eine CKD mit Albuminurie dar. Eine chronische Hyperglykämie im Rahmen eines Diabetes mellitus führt zu klassischen glomerulären Schäden im Sinne einer endothelialen Dysfunktion sowie Schädigung von Podozyten und der glomerulären Basalmembran<sup>87</sup>. Frühe glomeruläre Veränderungen aufgrund rezidivierender Hyperglykämien sind weniger gut untersucht. Im Rattenmodell konnte eine transiente glomeruläre Permeabilitätserhöhung bereits durch eine akute Hyperglykämie gezeigt werden<sup>84</sup>. Im Rahmen der Hypothese der hochdynamischen Regulation der glomerulären Schlitzmembran durch

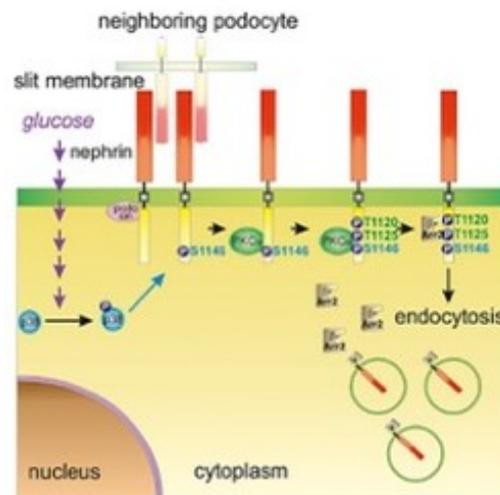
Nephrinendozytose wurde eine vermehrte Nephrinendozytose unter hyperglykämischen Bedingungen postuliert.

Es konnte gezeigt werden, dass eine akute Hyperglykämie und nicht die daraus resultierende Hyperosmolarität die Nephrin  $\beta$ -Arrestin2 Interaktion verstärkt <sup>75</sup>. Protein Kinase C $\alpha$  (PKC) war essenziell für die Hyperglykämie vermittelte Nephrin  $\beta$ -Arrestin2 Bindungsverstärkung <sup>75</sup>. In weiteren proteinbiochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass PKC $\alpha$  über Protein interacting with c-kinase (PICK) an Nephrin und  $\beta$ -Arrestin2 bindet und in einem Proteinkomplex vorliegt <sup>75</sup>. Sequenzanalysen zeigten ein potenzielles PKC-Bindungsmotiv in Nephrin (S/TX<sub>4-5</sub>S/T), welches der Nephrinaminosäuresequenz T1120-1125 (TGERDT) entsprach. Mittels Co-immunopräzipitation-, Pulldown- sowie einem *in vitro* Phosphorylierungsassay konnte gezeigt werden, dass dieses Motiv im Rahmen einer Hyperglykämie verstärkt durch PKC $\alpha$  phosphoryliert wird. Phosphoryliertes Nephrin T1120 und T1125 bildet das Bindungsmotiv für die Interaktion mit  $\beta$ -Arrestin2 <sup>75</sup>. Diese *in vitro* Daten konnten im Tiermodell bestätigt werden <sup>75</sup>.

In weiteren Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, an welcher Stelle und unter welchen Bedingungen die entscheidende PKC $\alpha$  Interaktion mit Nephrin unter Hyperglykämiebedingungen stattfindet. Die Literatur legt eine Aktivierung der Mitogen aktiviertes Protein Kinase (MAPK) p38 in sämtlichen Stadien einer diabetischen Nephropathie nahe, insbesondere in glomerulären Zellen wie Mesangialzellen und Podozyten <sup>88,89</sup>. In Glomeruli diabetischer Mäuse und Podozyten konnte eine verstärkte Phosphorylierung von p38 MAPK unter Hyperglykämie nachgewiesen werden <sup>90</sup>. Die nachgewiesene Phosphorylierung an p38 MAPK führt zu einer Aktivierung der Kinase <sup>91</sup>. Durch Hemmung der p38 MAPK konnte die Entstehung einer Hyperglykämie im diabetischen Mausmodell nicht verhindert werden. Jedoch blieb durch Inhibition der p38 MAPK die Entstehung einer Albuminurie aus <sup>75,90</sup>. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob p38 MAPK Nephrin phosphoryliert. Durch *in vitro* Kinase Assays mit trunkierten Proteinen konnte die Phosphorylierungsstelle in Nephrin auf die Aminosäuren 1145-1152 eingegrenzt werden. In diesem Bereich blieb Nephrin S1146 als potenzielle Phosphorylierungsstelle durch p38 MAPK, welche durch Mutationsuntersuchungen bestätigt wurde <sup>90</sup>. Die Phosphorylierung von Nephrin S1146 wiederum scheint eine wichtige Voraussetzung für die Bindung von PKC $\alpha$  an Nephrin T1120/T1125 zu sein, da die nicht-phosphorylierbare Mutante Nephrin S1146A die Bindung von PKC $\alpha$  mit Nephrin reduziert <sup>75</sup>. Zudem konnte die Endozytose

von Nephrin als bereits beschriebener molekularer Mechanismus der Entstehung einer Albuminurie konnte durch Hemmung der p38 MAPK reduziert werden und stellt damit ein potenzielles Target in der Senkung der Albuminurie im Rahmen einer Hyperglykämie dar <sup>75,90</sup>.

Somit wurde die Nephrinendozytose als molekularer Mechanismus der Hyperglykämie-assoziierten glomerulären Permeabilitätserhöhung identifiziert und die beteiligten intrazellulären Signalwege dokumentiert (Abb. 8).



**Abb. 8: Schematische Darstellung der Mechanismen der glomerulären Permeabilitätserhöhung unter Hyperglykämie**

Hyperglykämie führt zur direkten Aktivierung der p38 MAPK, die Nephrin an S1146 phosphoryliert. Phosphoryliertes Nephrin S1146 ermöglicht die Phosphorylierung an Nephrin T1120/T1125 durch PKCα, welches als Bindungsmotiv für β-Arrestin2 fungiert. Durch Interaktion von β-Arrestin2 mit Nephrin wird Nephrin endozytiert und die glomeruläre Permeabilität steigt.

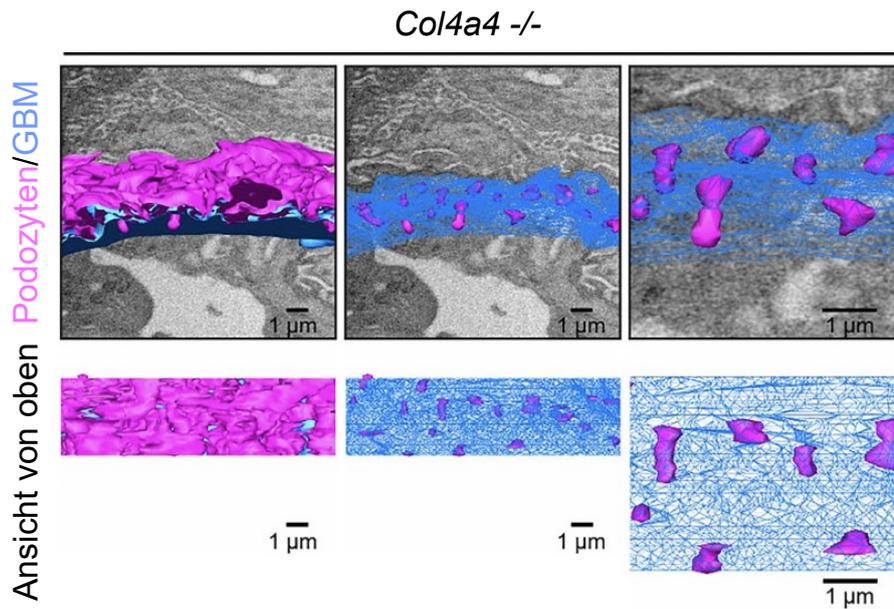
(modifiziert nach <sup>75</sup> – Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Rechteinhaber, *Springer Nature*.)

#### 2.4. Rolle der glomerulären Basalmembran bei angeborenen proteinurischen Nierenerkrankung (Publikation VII)

Neben erworbenen glomerulären Schäden durch RAAS-Aktivierung und Hyperglykämie, spielen auch angeborene Nierenerkrankungen eine wichtige Rolle in der Entstehung einer Albuminurie. Das Alport Syndrom ist die häufigste monogenetische, glomeruläre Erkrankung, die durch Mutationen in den für Kollagen IV kodierenden Genen COL4A3, COL4A4 oder COL4A5 verursacht wird <sup>92</sup>. Um die

morphologischen Veränderungen beim Alport Syndrom wie die Verdickung der glomerulären Basalmembran und den Verlust der Fußfortsätze im Krankheitsverlauf zu verstehen, wurde die Methode der Seriell Block Face Rasterelektronenmikroskopie (SBF-SEM) verwendet <sup>93</sup>. Die Methode ermöglicht es, die Ultrastruktur des glomerulären Filters und insbesondere die Interaktion von Podozyten mit der erkrankten glomerulären Basalmembran (GBM) über einen großen Bereich dreidimensional abzubilden <sup>93</sup>.

Anhand des *Col4a3 knockout* Mausmodells wurden SBF-SEM Bilder von Wildtyp und *Col4a3* defizienten Mäusen im Alter von 6, 16 - 18 und 28 Wochen untersucht. Dabei zeigte sich, dass insbesondere in 28 Wochen alten *Col4a3* *-/-* Mäusen der typische glomeruläre Schaden im Sinne eines podozytären Fußfortsatzverlustes sowie Verdickung und Ausdünnung der GBM vorliegt <sup>93</sup>. Interessanterweise wurden podozytäre Invaginationen ausgehend von podozytären Fußfortsätzen identifiziert, die überwiegend in 28 Wochen alten *Col4a3* *-/-* Mäusen beobachtet wurden (Abb. 9) <sup>93</sup>. Dass es sich bei dem Phänomen der podozytären Invasion der GBM nicht um ein isoliertes Phänomen in *Col4a* *-/-* Mäusen handelt, wurde anhand von zwei weiteren Mausmodellen untersucht. *Myo1e* *-/-* Mäuse gelten als Modell für die fokale segmentale Glomerulosklerose <sup>94,95</sup>. Mutationen im *Ptpro* Gen führen zu einem nephrotischen Syndrom im Kindesalter, so dass *Ptpro* *-/-* Mäuse als weiteres Modell für eine glomeruläre Erkrankung verwendet wurden <sup>96,97</sup>. In beiden Modellen konnte in Analogie zum Mausmodell des Alport Syndroms eine podozytäre Invasion in die GBM ausgehend von podozytären Fußfortsätzen und in Bereichen verdickter Basalmembran bestätigt werden <sup>93</sup>. Transmissionselektronenmikroskopische Bilder von Nierenbiopsien zweier Patienten mit gesicherter hemizygoter *COL4A5* Mutation sowie hemizygoter *COL4A5* und homozygoter *MYO1E* Mutation wiesen ebenfalls podozytäre Invasionen der GBM auf <sup>93</sup>. Die Ursache der beobachteten podozytären Invasionen ist nicht geklärt. Sie könnten einerseits dem Versuch entsprechen, den podozytären Verlust bei erkrankter GBM durch verstärkte Verankerung zu verhindern. Andererseits könnten die podozytären Invasionen einen Umbau oder Remodeling der GBM-Zusammensetzung beeinflussen und verbessern.



**Abb. 9: Invasion podozytärer Fußfortsätze in die GBM in *Col4a3* <sup>-/-</sup> Mäusen**

Rekonstruierte Podozytenfußfortsätze (magenta) und GBM (blau) Morphologie in 28 Wochen alten *Col4a3* <sup>-/-</sup> Mäusen. Es zeigt sich eine podozytäre Fußfortsatz Invasion in die GBM.

GBM – glomeruläre Basalmembran

(modifiziert nach <sup>93</sup> – Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Rechteinhaber, *Springer Nature*.)

Zusammengefasst konnten mithilfe der SBF-SEM bisher nicht bekannte podozytäre Invasionen in die GBM in unterschiedlichen Modellen einer glomerulären Erkrankung aufgedeckt werden. Die pathophysiologische Funktion dieser podozytären Invasionen ist bisher noch nicht abschließend verstanden.

### 3. Zusammenfassung

Eine Erhöhung der glomerulären Permeabilität mit resultierender Albuminurie ist Teil der Definition einer chronischen Nierenkrankheit (CKD) und geht mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität sowie Progression einer Nierenerkrankung einher. Der glomeruläre Filter stellt die entscheidende Barriere gegen den Verlust von Albumin in den Urin dar. Das komplexe Zusammenspiel der Filterkomponenten Endothel, glomeruläre Basalmembran und Podozyten mit der glomerulären Schlitzmembran erschwert dieser Struktur. Der Fokus der Untersuchungen richtete

sich auf die Rolle des Podozyten bei der Entstehung einer glomerulären Permeabilitätserhöhung.

Um die Morphologie von podozytären Proteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersuchen zu können, wurde die neue Technik der Expansionsmikroskopie (ExM) zur Darstellung von Proteinen der glomerulären Schlitzmembran etabliert. Sie ermöglichte die hochauflösende Darstellung der Schlitzmembran assoziierten Proteine Nephrin und Podocin und deren Kollokalisierung mit Aktin. Es wurde aufgrund der Expansion der Probe eine Auflösung von 70 nm erreicht, die die normalerweise erreichte Auflösung von 200 nm bei einem Lichtmikroskop deutlich übersteigt. Die Nutzung dieser Methode zur Darstellung und Analyse podozytärer Proteine oder Strukturen wird helfen, die Komplexität des glomerulären Filters mit einfachen, verhältnismäßig kostengünstigen Mikroskopen untersuchen zu können.

Nach Darstellung von Nephrin *in vitro* mithilfe der ExM sollte die *in vivo* Nephrinexpression an der Zelloberfläche im Kontext einer Albuminurie untersucht werden. Durch Perfusion von Mausnieren mit einer Biotinhaltigen Lösung werden alle Oberflächenproteine markiert und können nach Isolation der Glomeruli mithilfe von Immunopräzipitation und Antikörperfärbung untersucht werden. Mithilfe dieser Methode konnten in zwei Mausmodellen (Nephrotoxische Serum Nephritis und Adriamycin induzierter Nierenschaden) gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression von Nephrin mit Entstehung einer Albuminurie abnimmt. Erste Hinweise auf eine ursächliche Nephrinendozytose ergaben sich aus der glomerulär nicht mehr linearen, sondern punktförmigen Nephrin Immunfluoreszenz Färbung bei albuminurischen Tieren. Neben der Nephrinendozytose könnte zudem eine Veränderung der Podozytenmorphologie im Sinne einer Fußfortsatzverschmelzung oder dem Verlust von Podozyten bei geschädigten Tieren ursächlich sein. Interessanterweise konnte im Modell der Nephrotoxischen Serum Nephritis gezeigt werden, dass nach erwartetem Rückgang der Albuminurie nach der frühen Krankheitsphase, der Verlust von Nephrin an der Zelloberfläche reversibel war. Dieses Phänomen spricht für einen grundsätzlichen Mechanismus im Sinne einer dynamischen Regulation der glomerulären Schlitzmembran.

Um auch eine geringe glomeruläre Permeabilitätserhöhung detektieren zu können, wurde ein Assay etabliert, in welchem sich mithilfe eines fluoreszenzmarkierten Tracers (FITC-Polysucrose 70) bereits kleinste Mengen des Tracers im Urin

nachweisen ließen. Mithilfe dieser Methodik wurde gezeigt, dass Blutdruck unwirksame Dosierungen von Angiotensin II die glomeruläre Permeabilität erhöhen. Als ursächlichen Mechanismus für die Angiotensin II induzierte Steigerung der glomerulären Permeabilität wiesen wir die Nephrin- $\beta$ -Arrestin2 vermittelte Nephrinendozytose nach. Die Therapie mit einem ARB hemmte den molekularen Mechanismus der Nephrinendozytose. In weiteren Untersuchungen konnten wir den intrazellulären Signaltransduktionsmechanismus der Angiotensin II bedingten Verstärkung der Nephrinendozytose klären. Hier sind AT1-Rezeptor G-Protein abhängige und -unabhängige Wege mit Aktivierung von PLC und ERK 1/2 beteiligt. Die Phosphorylierung an Nephrin Y1217 führt zur Bindung an das Adapterprotein Nck2 und stabilisiert Nephrin im Aktinzytoskelett. Durch Angiotensin II kommt es zur Dephosphorylierung an Nephrin Y1217 mit resultierender Nephrinendozytose über Bindung an  $\beta$ -Arrestin2.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen können somit den klinisch lange postulierten, Blutdruck unabhängigen, molekularen Effekt von ARB und ACEi auf den glomerulären Filter erklären. Ob SGLT2-Inhibitoren oder nicht-steroidale MRA einen Einfluss auf die Nephrinendozytose haben, muss in weiteren Projekten untersucht werden.

Auch ohne klassische Veränderungen im Rahmen einer diabetischen Nephropathie kann bei Hyperglykämie eine Albuminurie entstehen. Es konnte gezeigt werden, dass Glucose die p38 MAPK unter hyperglykämischen Bedingungen aktiviert. P38 phosphoryliert wiederum Nephrin an S1146. Phosphoryliertes Nephrin S1146 erleichtert die Bindung der Proteinkinase  $C\alpha$  ( $PKC\alpha$ ), die das  $\beta$ -Arrestin2 Bindungsmotiv in Nephrin (T1120, T1125) phosphoryliert und die Interaktion mit  $\beta$ -Arrestin2 vermittelt. Hieraus resultiert die Nephrinendozytose. *In vitro* und *in vivo* konnte dieser Mechanismus nachvollzogen werden und stellt somit einen wichtigen Erklärungsansatz für die Entstehung einer transienten und reversiblen Albuminurie im Rahmen einer Hyperglykämie dar. Ob eine persistierende Nephrinendozytose einen dauerhaften podozytären Schaden mit Aktinreorganisation und Fußfortsatzverlust auslösen kann, bleibt offen und wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die reife GBM wird von Podozyten gebildet und stellt neben Podozyt und Endothel einen entscheidenden Bestandteil des glomerulären Filters dar. Die reife GBM zeichnet sich u.a. durch Vernetzung von Kollagen Typ IV Heterotrimeren aus.

Mutationen in einem der drei Kollagen Typ IV kodierenden Genen führen zum Alport Syndrom, welches mit einer Hämaturie, Albuminurie und CKD einhergeht. Durch Serial Block Face Rasterelektronenmikroskopie konnten bisher unbekannte von Podozyten ausgehende Invasionen in die GBM in verschiedenen Mausmodellen mit Albuminurie identifiziert werden. Der Podozyt könnte im Rahmen einer krankhaften Zusammensetzung der GBM durch deren Invasion versuchen, seine Adhäsion auf der Basalmembran zu verbessern. Andererseits könnten die Invasionsstellen dazu nutzen, neu gebildete und ersetzende GBM-Bestandteile in die Basalmembran zu integrieren. Weitere Untersuchungen sind zur Klärung des zugrundeliegenden Mechanismus der podozytären Invasionen der GBM nötig.

Die Behandlung einer Albuminurie zur Senkung des kardiovaskulären Risikos und der Progression der Nierenerkrankung fußt bisher je nach Grunderkrankung auf einer immunsuppressiven Therapie und auf Senkung des intraglomerulären Druckes durch Hemmung des RAAS und SGLT2 Inhibition. Das Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen einer glomerulären Permeabilitätserhöhung wird helfen, in Zukunft neue Targets wie z.B. MAPK oder PKC $\alpha$  zu identifizieren, um selektivere Therapieansätze einer glomerulären Permeabilitätserhöhung zu entwickeln.

#### 4. Literaturverzeichnis

1. Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKDWG. KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 2024;105:S117-S314. doi: 10.1016/j.kint.2023.10.018
2. Francis A, Harhay MN, Ong ACM, Tummalapalli SL, Ortiz A, Fogo AB, Fliser D, Roy-Chaudhury P, Fontana M, Nangaku M, et al. Chronic kidney disease and the global public health agenda: an international consensus. *Nat Rev Nephrol.* 2024;20:473-485. doi: 10.1038/s41581-024-00820-6
3. Global Burden of Disease 2021: Findings from the GBD 2021 Study. 2024.
4. Barzilay JI, Farag YMK, Durthaler J. Albuminuria: An Underappreciated Risk Factor for Cardiovascular Disease. *J Am Heart Assoc.* 2024;13:e030131. doi: 10.1161/JAHA.123.030131
5. Ozyol A, Yucel O, Ege MR, Zorlu A, Yilmaz MB. Microalbuminuria is associated with the severity of coronary artery disease independently of other cardiovascular risk factors. *Angiology.* 2012;63:457-460. doi: 10.1177/0003319711423528
6. Song JJ, Lee KB, Hyun YY, Kim H. Trace Albumin in the Urine Dipstick Test is Associated with Coronary Artery Calcification in Korean Adults. *Nephron.* 2018;140:169-174. doi: 10.1159/000490954
7. Giovacchini G, Cappagli M, Carro S, Borrini S, Montepagani A, Leoncini R, Mazzotta G, Sambuceti G, Mariani G, Volterrani D, et al. Microalbuminuria predicts silent myocardial ischaemia in type 2 diabetes patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2013;40:548-557. doi: 10.1007/s00259-012-2323-5
8. Topsakal R, Kaya MG, Duran M, Gunebakmaz O, Dogan A, Inanc T, Yarlioglues M, Celik A, Ergin A. The relation between microalbuminuria and coronary collateral vessel development in patients with unstable coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2009;20:431-434. doi: 10.1097/MCA.0b013e3283277650
9. George LK, Molnar MZ, Lu JL, Kalantar-Zadeh K, Koshy SK, Kovesdy CP. Association of Pre-Operative Albuminuria with Post-Operative Outcomes after Coronary Artery Bypass Grafting. *Sci Rep.* 2015;5:16458. doi: 10.1038/srep16458
10. Rein P, Saely CH, Vonbank A, Fraunberger P, Drexel H. Is albuminuria a myocardial infarction risk equivalent for atherothrombotic events? *Atherosclerosis.* 2015;240:21-25. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.02.037
11. Li M, Cheng A, Sun J, Fan C, Meng R. The role of urinary albumin-to-creatinine ratio as a biomarker to predict stroke: A meta-analysis and systemic review. *Brain Circ.* 2021;7:139-146. doi: 10.4103/bc.bc\_64\_20
12. Kelly DM, Rothwell PM. Proteinuria as an independent predictor of stroke: Systematic review and meta-analysis. *Int J Stroke.* 2020;15:29-38. doi: 10.1177/1747493019895206
13. Vasan RS, Short MI, Niiranen TJ, Xanthakis V, DeCarli C, Cheng S, Seshadri S, Mitchell GF. Interrelations Between Arterial Stiffness, Target Organ Damage, and Cardiovascular Disease Outcomes. *J Am Heart Assoc.* 2019;8:e012141. doi: 10.1161/JAHA.119.012141
14. Swoboda PP, McDiarmid AK, Erhayiem B, Ripley DP, Dobson LE, Garg P, Musa TA, Witte KK, Kearney MT, Barth JH, et al. Diabetes Mellitus, Microalbuminuria, and Subclinical Cardiac Disease: Identification and Monitoring of Individuals at Risk of Heart Failure. *J Am Heart Assoc.* 2017;6. doi: 10.1161/JAHA.117.005539
15. Blecker S, Matsushita K, Kottgen A, Loehr LR, Bertoni AG, Boulware LE, Coresh J. High-normal albuminuria and risk of heart failure in the community. *Am J Kidney Dis.* 2011;58:47-55. doi: 10.1053/j.ajkd.2011.02.391
16. Kim ED, Soliman EZ, Coresh J, Matsushita K, Chen LY. Two-Week Burden of Arrhythmias across CKD Severity in a Large Community-Based Cohort: The ARIC Study. *J Am Soc Nephrol.* 2021;32:629-638. doi: 10.1681/ASN.2020030301
17. Bansal N, Zelnick LR, Alonso A, Benjamin EJ, de Boer IH, Deo R, Katz R, Kestenbaum B, Mathew J, Robinson-Cohen C, et al. eGFR and Albuminuria in Relation to Risk of Incident

- Atrial Fibrillation: A Meta-Analysis of the Jackson Heart Study, the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis, and the Cardiovascular Health Study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12:1386-1398. doi: 10.2215/CJN.01860217
18. Chronic Kidney Disease Prognosis C, Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, Coresh J, Gansevoort RT. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet*. 2010;375:2073-2081. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60674-5
  19. Writing Group for the CKDPC, Grams ME, Coresh J, Matsushita K, Ballew SH, Sang Y, Surapaneni A, Alencar de Pinho N, Anderson A, Appel LJ, et al. Estimated Glomerular Filtration Rate, Albuminuria, and Adverse Outcomes: An Individual-Participant Data Meta-Analysis. *JAMA*. 2023;330:1266-1277. doi: 10.1001/jama.2023.17002
  20. Daehn IS, Duffield JS. The glomerular filtration barrier: a structural target for novel kidney therapies. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20:770-788. doi: 10.1038/s41573-021-00242-0
  21. Satchell S. The role of the glomerular endothelium in albumin handling. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9:717-725. doi: 10.1038/nrneph.2013.197
  22. Satchell SC, Tasman CH, Singh A, Ni L, Geelen J, von Ruhland CJ, O'Hare MJ, Saleem MA, van den Heuvel LP, Mathieson PW. Conditionally immortalized human glomerular endothelial cells expressing fenestrations in response to VEGF. *Kidney Int*. 2006;69:1633-1640. doi: 10.1038/sj.ki.5000277
  23. Suh JH, Miner JH. The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9:470-477. doi: 10.1038/nrneph.2013.109
  24. Naylor RW, Morais M, Lennon R. Complexities of the glomerular basement membrane. *Nat Rev Nephrol*. 2021;17:112-127. doi: 10.1038/s41581-020-0329-y
  25. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med*. 2006;354:1387-1401. doi: 10.1056/NEJMra052131
  26. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*. 1998;1:575-582. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80057-x
  27. Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol*. 1974;60:423-433. doi: 10.1083/jcb.60.2.423
  28. Grahammer F, Wigge C, Schell C, Kretz O, Patrakka J, Schneider S, Klose M, Kind J, Arnold SJ, Habermann A, et al. A flexible, multilayered protein scaffold maintains the slit in between glomerular podocytes. *JCI Insight*. 2016;1. doi: 10.1172/jci.insight.86177
  29. Putaala H, Soinen R, Kilpelainen P, Wartiovaara J, Tryggvason K. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet*. 2001;10:1-8. doi: 10.1093/hmg/10.1.1
  30. Rantanen M, Palmen T, Patari A, Ahola H, Lehtonen S, Astrom E, Floss T, Vauti F, Wurst W, Ruiz P, et al. Nephrin TRAP mice lack slit diaphragms and show fibrotic glomeruli and cystic tubular lesions. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:1586-1594. doi: 10.1097/01.asn.0000016142.29721.22
  31. Watts AJB, Keller KH, Lerner G, Rosales I, Collins AB, Sekulic M, Waikar SS, Chandraker A, Riella LV, Alexander MP, et al. Discovery of Autoantibodies Targeting Nephrin in Minimal Change Disease Supports a Novel Autoimmune Etiology. *J Am Soc Nephrol*. 2022;33:238-252. doi: 10.1681/ASN.2021060794
  32. Hengel FE, Dehde S, Lasse M, Zahner G, Seifert L, Schnarre A, Kretz O, Demir F, Pinnschmidt HO, Grahammer F, et al. Autoantibodies Targeting Nephrin in Podocytopathies. *N Engl J Med*. 2024;391:422-433. doi: 10.1056/NEJMoa2314471
  33. 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

34. Martin CE, New LA, Phippen NJ, Keyvani Chahi A, Mitro AE, Takano T, Pawson T, Blasutig IM, Jones N. Multivalent nephrin-Nck interactions define a threshold for clustering and tyrosine-dependent nephrin endocytosis. *J Cell Sci.* 2020;133. doi: 10.1242/jcs.236877
35. Jones N, New LA, Fortino MA, Eremina V, Ruston J, Blasutig IM, Aoudjit L, Zou Y, Liu X, Yu GL, et al. Nck proteins maintain the adult glomerular filtration barrier. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:1533-1543. doi: 10.1681/ASN.2009010056
36. Jones N, Blasutig IM, Eremina V, Ruston JM, Bladt F, Li H, Huang H, Larose L, Li SS, Takano T, et al. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature.* 2006;440:818-823. doi: 10.1038/nature04662
37. New LA, Keyvani Chahi A, Jones N. Direct regulation of nephrin tyrosine phosphorylation by Nck adaptor proteins. *J Biol Chem.* 2013;288:1500-1510. doi: 10.1074/jbc.M112.439463
38. Quack I, Rump LC, Gerke P, Walther I, Vinke T, Vonend O, Grunwald T, Sellin L. beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:14110-14115. doi: 10.1073/pnas.0602587103
39. Qin XS, Tsukaguchi H, Shono A, Yamamoto A, Kurihara H, Doi T. Phosphorylation of nephrin triggers its internalization by raft-mediated endocytosis. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:2534-2545. doi: 10.1681/ASN.2009010011
40. Soda K, Balkin DM, Ferguson SM, Paradise S, Milosevic I, Giovedi S, Volpicelli-Daley L, Tian X, Wu Y, Ma H, et al. Role of dynamin, synaptojanin, and endophilin in podocyte foot processes. *J Clin Invest.* 2012;122:4401-4411. doi: 10.1172/JCI65289
41. Ma TL, Zhou Y, Zhang CY, Gao ZA, Duan JX. The role and mechanism of beta-arrestin2 in signal transduction. *Life Sci.* 2021;275:119364. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119364
42. Butt L, Unnersjo-Jess D, Reilly D, Hahnfeldt R, Rinschen MM, Bozek K, Schermer B, Benzing T, Hohne M. In vivo characterization of a podocyte-expressed short podocin isoform. *BMC Nephrol.* 2023;24:378. doi: 10.1186/s12882-023-03420-x
43. Huber TB, Schermer B, Muller RU, Hohne M, Bartram M, Calixto A, Hagmann H, Reinhardt C, Koos F, Kunzelmann K, et al. Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:17079-17086. doi: 10.1073/pnas.0607465103
44. Schermer B, Benzing T. Lipid-protein interactions along the slit diaphragm of podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:473-478. doi: 10.1681/ASN.2008070694
45. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, Shaw AS, Holzman LB, Mundel P. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest.* 2001;108:1621-1629. doi: 10.1172/JCI12849
46. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet.* 2000;24:349-354. doi: 10.1038/74166
47. Taguma Y, Kitamoto Y, Futaki G, Ueda H, Monma H, Ishizaki M, Takahashi H, Sekino H, Sasaki Y. Effect of captopril on heavy proteinuria in azotemic diabetics. *N Engl J Med.* 1985;313:1617-1620. doi: 10.1056/NEJM198512263132601
48. Ruggenti P, Perna A, Gherardi G, Garini G, Zoccali C, Salvadori M, Scolari F, Schena FP, Remuzzi G. Renoprotective properties of ACE-inhibition in non-diabetic nephropathies with non-nephrotic proteinuria. *Lancet.* 1999;354:359-364. doi: 10.1016/S0140-6736(98)10363-X
49. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 2001;345:861-869. doi: 10.1056/NEJMoa011161
50. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med.* 1993;329:1456-1462. doi: 10.1056/NEJM19931113292004

51. Parving HH, Lehnert H, Brochner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P, Irbesartan in Patients with Type D, Microalbuminuria Study G. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2001;345:870-878. doi: 10.1056/NEJMoa011489
52. Viberti G, Wheeldon NM, MicroAlbuminuria Reduction With VSI. Microalbuminuria reduction with valsartan in patients with type 2 diabetes mellitus: a blood pressure-independent effect. *Circulation*. 2002;106:672-678. doi: 10.1161/01.cir.0000024416.33113.0a
53. Haller H, Ito S, Izzo JL, Jr., Januszewicz A, Katayama S, Menne J, Mimran A, Rabelink TJ, Ritz E, Ruilope LM, et al. Olmesartan for the delay or prevention of microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2011;364:907-917. doi: 10.1056/NEJMoa1007994
54. Weder AB. Renal protective effects of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Am J Hypertens*. 1990;3:273S-277S. doi: 10.1093/ajh/3.11s.273s
55. Nuffield Department of Population Health Renal Studies G, Consortium SIM-AC-RT. Impact of diabetes on the effects of sodium glucose co-transporter-2 inhibitors on kidney outcomes: collaborative meta-analysis of large placebo-controlled trials. *Lancet*. 2022;400:1788-1801. doi: 10.1016/S0140-6736(22)02074-8
56. The E-KCG, Herrington WG, Staplin N, Wanner C, Green JB, Hauske SJ, Emberson JR, Preiss D, Judge P, Mayne KJ, et al. Empagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med*. 2023;388:117-127. doi: 10.1056/NEJMoa2204233
57. Heerspink HJL, Stefansson BV, Correa-Rotter R, Chertow GM, Greene T, Hou FF, Mann JFE, McMurray JJV, Lindberg M, Rossing P, et al. Dapagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med*. 2020;383:1436-1446. doi: 10.1056/NEJMoa2024816
58. Bailey CJ, Day C, Bellary S. Renal Protection with SGLT2 Inhibitors: Effects in Acute and Chronic Kidney Disease. *Curr Diab Rep*. 2022;22:39-52. doi: 10.1007/s11892-021-01442-z
59. Yau K, Cherney DZI, van Raalte DH, Wever BE. Kidney protective mechanisms of SGLT2 inhibitors: evidence for a hemodynamic effect. *Kidney Int*. 2024;105:1168-1172. doi: 10.1016/j.kint.2024.03.019
60. Heerspink HJL, Perco P, Mulder S, Leierer J, Hansen MK, Heinzl A, Mayer G. Canagliflozin reduces inflammation and fibrosis biomarkers: a potential mechanism of action for beneficial effects of SGLT2 inhibitors in diabetic kidney disease. *Diabetologia*. 2019;62:1154-1166. doi: 10.1007/s00125-019-4859-4
61. Bakris GL, Agarwal R, Anker SD, Pitt B, Ruilope LM, Rossing P, Kolkhof P, Nowack C, Schloemer P, Joseph A, et al. Effect of Finerenone on Chronic Kidney Disease Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2020;383:2219-2229. doi: 10.1056/NEJMoa2025845
62. Pitt B, Filippatos G, Agarwal R, Anker SD, Bakris GL, Rossing P, Joseph A, Kolkhof P, Nowack C, Schloemer P, et al. Cardiovascular Events with Finerenone in Kidney Disease and Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2021;385:2252-2263. doi: 10.1056/NEJMoa2110956
63. Piko N, Bevc S, Hojs R, Ekart R. Finerenone: From the Mechanism of Action to Clinical Use in Kidney Disease. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2024;17. doi: 10.3390/ph17040418
64. Galbraith CG, Galbraith JA. Super-resolution microscopy at a glance. *J Cell Sci*. 2011;124:1607-1611. doi: 10.1242/jcs.080085
65. Willig KI, Rizzoli SO, Westphal V, Jahn R, Hell SW. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature*. 2006;440:935-939. doi: 10.1038/nature04592
66. van de Linde S, Loschberger A, Klein T, Heidbreder M, Wolter S, Heilemann M, Sauer M. Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat Protoc*. 2011;6:991-1009. doi: 10.1038/nprot.2011.336
67. Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods*. 2006;3:793-795. doi: 10.1038/nmeth929
68. Wassie AT, Zhao Y, Boyden ES. Expansion microscopy: principles and uses in biological research. *Nat Methods*. 2019;16:33-41. doi: 10.1038/s41592-018-0219-4

69. Chozinski TJ, Mao C, Halpern AR, Pippin JW, Shankland SJ, Alpers CE, Najafian B, Vaughan JC. Volumetric, Nanoscale Optical Imaging of Mouse and Human Kidney via Expansion Microscopy. *Sci Rep*. 2018;8:10396. doi: 10.1038/s41598-018-28694-2
70. Moller-Kerutt A, Rodriguez-Gatica JE, Wacker K, Bhatia R, Siebrasse JP, Boon N, Van Marck V, Boor P, Kubitscheck U, Wijnholds J, et al. Crumbs2 Is an Essential Slit Diaphragm Protein of the Renal Filtration Barrier. *J Am Soc Nephrol*. 2021;32:1053-1070. doi: 10.1681/ASN.2020040501
71. Konigshausen E, Schmitz CT, Rump LC, Sellin L. Imaging of Podocytic Proteins Nephrin, Actin, and Podocin with Expansion Microscopy. *J Vis Exp*. 2021. doi: 10.3791/62079
72. Chen F, Tillberg PW, Boyden ES. Optical imaging. Expansion microscopy. *Science*. 2015;347:543-548. doi: 10.1126/science.1260088
73. Asano SM, Gao R, Wassie AT, Tillberg PW, Chen F, Boyden ES. Expansion Microscopy: Protocols for Imaging Proteins and RNA in Cells and Tissues. *Curr Protoc Cell Biol*. 2018;80:e56. doi: 10.1002/cpcb.56
74. Konigshausen E, Zierhut UM, Ruetze M, Potthoff SA, Stegbauer J, Woznowski M, Quack I, Rump LC, Sellin L. Angiotensin II increases glomerular permeability by beta-arrestin mediated nephrin endocytosis. *Sci Rep*. 2016;6:39513. doi: 10.1038/srep39513
75. Quack I, Woznowski M, Potthoff SA, Palmer R, Konigshausen E, Sivritas S, Schiffer M, Stegbauer J, Vonend O, Rump LC, et al. PKC alpha mediates beta-arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia. *J Biol Chem*. 2011;286:12959-12970. doi: 10.1074/jbc.M110.204024
76. Konigshausen E, Potthoff SA, Haase R, Meyer-Schwesinger C, Kaufmann E, Rump LC, Stegbauer J, Sellin L, Quack I, Woznowski M. Isolation of Glomeruli and In Vivo Labeling of Glomerular Cell Surface Proteins. *J Vis Exp*. 2019. doi: 10.3791/58542
77. Haase R, Potthoff SA, Meyer-Schwesinger C, Frosch C, Wiech T, Panzer U, Konigshausen E, Stegbauer J, Sellin L, Rump LC, et al. A novel in vivo method to quantify slit diaphragm protein abundance in murine proteinuric kidney disease. *PLoS One*. 2017;12:e0179217. doi: 10.1371/journal.pone.0179217
78. Hoppe JM, Vielhauer V. Induction and analysis of nephrotoxic serum nephritis in mice. *Methods Mol Biol*. 2014;1169:159-174. doi: 10.1007/978-1-4939-0882-0\_15
79. Lee VW, Harris DC. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton)*. 2011;16:30-38. doi: 10.1111/j.1440-1797.2010.01383.x
80. 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:F790-799. doi: 10.1152/ajprenal.00153.2012
81. Grande G, Rippe C, Rippe A, Rahman A, Sward K, Rippe B. Unaltered size selectivity of the glomerular filtration barrier in caveolin-1 knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297:F257-262. doi: 10.1152/ajprenal.00075.2009
82. Jeansson M, Haraldsson B. Glomerular size and charge selectivity in the mouse after exposure to glucosaminoglycan-degrading enzymes. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:1756-1765. doi: 10.1097/01.asn.0000072742.02714.6e
83. Konigshausen E, Potthoff SA, Woznowski M, Stegbauer J, Rump LC, Sellin L. Highly Sensitive Measurement of Glomerular Permeability in Mice with Fluorescein Isothiocyanate-polysucrose 70. *J Vis Exp*. 2019. doi: 10.3791/59064
84. Axelsson J, Rippe A, Rippe B. Acute hyperglycemia induces rapid, reversible increases in glomerular permeability in nondiabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;298:F1306-1312. doi: 10.1152/ajprenal.00710.2009
85. Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. The GISEN Group (Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia). *Lancet*. 1997;349:1857-1863.
86. Konigshausen E, Zierhut UM, Ruetze M, Rump LC, Sellin L. A molecular mechanism for angiotensin II receptor blocker-mediated slit membrane protection: Angiotensin II increases

- nephrin endocytosis via AT1-receptor-dependent ERK 1/2 activation. *FASEB J*. 2024;38:e70018. doi: 10.1096/fj.202400369R
87. Thomas MC, Brownlee M, Susztak K, Sharma K, Jandeleit-Dahm KA, Zoungas S, Rossing P, Groop PH, Cooper ME. Diabetic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15018. doi: 10.1038/nrdp.2015.18
  88. Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Cohen DM, Anderson S. Renal p38 MAP kinase activity in experimental diabetes. *Lab Invest*. 2007;87:548-558. doi: 10.1038/labinvest.3700549
  89. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*. 2010;429:403-417. doi: 10.1042/BJ20100323
  90. Woznowski MP, Potthoff SA, Konigshausen E, Haase R, Hoch H, Meyer-Schwesinger C, Wiech T, Stegbauer J, Rump LC, Sellin L, et al. Inhibition of p38 MAPK decreases hyperglycemia-induced nephrin endocytosis and attenuates albuminuria. *J Mol Med (Berl)*. 2022;100:781-795. doi: 10.1007/s00109-022-02184-5
  91. Kang SW, Adler SG, Lapage J, Natarajan R. p38 MAPK and MAPK kinase 3/6 mRNA and activities are increased in early diabetic glomeruli. *Kidney Int*. 2001;60:543-552. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.060002543.x
  92. Chavez E, Goncalves S, Rheault MN, Fornoni A. Alport Syndrome. *Adv Kidney Dis Health*. 2024;31:170-179. doi: 10.1053/j.akdh.2024.02.004
  93. Randles MJ, Collinson S, Starborg T, Mironov A, Krendel M, Konigshausen E, Sellin L, Roberts IS, Kadler KE, Miner JH, et al. Three-dimensional electron microscopy reveals the evolution of glomerular barrier injury. *Sci Rep*. 2016;6:35068. doi: 10.1038/srep35068
  94. Krendel M, Kim SV, Willinger T, Wang T, Kashgarian M, Flavell RA, Mooseker MS. Disruption of Myosin 1e promotes podocyte injury. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:86-94. doi: 10.1681/ASN.2007111172
  95. Chase SE, Encina CV, Stolzenburg LR, Tatum AH, Holzman LB, Krendel M. Podocyte-specific knockout of myosin 1e disrupts glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303:F1099-1106. doi: 10.1152/ajprenal.00251.2012
  96. Ozaltin F, Ibsirlioglu T, Taskiran EZ, Baydar DE, Kaymaz F, Buyukcelik M, Kilic BD, Balat A, Iatropoulos P, Asan E, et al. Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet*. 2011;89:139-147. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.05.026
  97. Wharram BL, Goyal M, Gillespie PJ, Wiggins JE, Kershaw DB, Holzman LB, Dysko RC, Saunders TL, Samuelson LC, Wiggins RC. Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptpo)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. *J Clin Invest*. 2000;106:1281-1290. doi: 10.1172/JCI7236

## 5. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an diejenigen aussprechen, die mich in der Phase der Habilitation unterstützt und begleitet haben.

Zunächst gilt mein großer Dank Herrn Professor Dr. med. Lars Christian Rump, der nicht nur meine Entwicklung als Ärztin durch seine große klinische Expertise maßgeblich geprägt hat, sondern meine grundlagenwissenschaftliche Arbeit durch die Gewährung von Freiräumen erst ermöglichte. Sein Vertrauen in meine Fähigkeiten, die Habilitation neben den klinischen Aufgaben und meiner Familie zu vollenden, haben mir in herausfordernden Situationen Kraft gegeben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Lorenz Sellin, der mein Interesse für glomeruläre Erkrankungen weckte und mich zur Erforschung molekularer Mechanismen derselben motivierte. Seine kreativen Ideen, seine umfassenden Kenntnisse molekularbiologischer Techniken und seine Beharrlichkeit wissenschaftliche Fragen zu beantworten, haben mich während unserer gemeinsamen Arbeit immer beeindruckt und nachhaltig beeinflusst.

Ich bin in der glücklichen Situation, dass viele meiner Wegbegleiter und Kollegen zu guten Freunden geworden sind. Hieraus entstand eine positive Synergie aus wissenschaftlichem und privatem Austausch über den eigenen wissenschaftlichen Schwerpunkt hinaus. Neben Herrn Prof. Dr. med. Lorenz Sellin möchte ich an dieser Stelle Herrn PD Dr. med. Sebastian A. Potthoff, Frau Dr. med. Magdalena Langendorf, Herrn Professor Dr. med. Ivo Quack und Herrn Professor Dr. med. Johannes Stegbauer für die ausgezeichnete Zusammenarbeit danken. Auch bei meinen Kollegen aus der Klinik möchte ich mich sehr für die Unterstützung bedanken, ohne die eine Freistellung von klinischen Tätigkeiten gar nicht möglich gewesen wäre.

Während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit habe ich zahlreiche Doktoranden betreut. Auch Ihnen möchte ich für Ihre sorgfältige und beständige Arbeit im Labor danken.

Ich möchte mich sehr bei Frau Blanka Duvnjak, leitende Technische Assistentin des nephrologischen Forschungslabors, und ihren Kolleginnen Nikola Kuhr, Christina Schwandt und Helen Schulte bedanken. Dank ihrer tatkräftigen Unterstützung war der

Fortgang verschiedener wissenschaftlicher Projekte erst möglich. Glücklicherweise verbindet mich mit Frau Blanka Duvnjak ebenfalls seit vielen Jahren eine Freundschaft.

Meinem Mann Jochen Herold danke ich von Herzen für sein Verständnis, seine Geduld und seine stetigen Ermutigungen. Seine unerschütterliche Unterstützung ist für mich von unschätzbarem Wert. Die Lebendigkeit und Lebensfreude unserer Kinder Lukas und David haben mir nicht nur während schwieriger wissenschaftlicher Phasen Kraft gegeben.

Meine Eltern Horst und Karla Königshausen haben mich immer gefördert und meinen Lebensweg eng begleitet. Ihnen und meinem Bruder Klaus Königshausen danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung in jeder Lebenslage.

Meine Freundinnen Frau Dr. med. Christina Priegnitz, Frau Dr. med. Kristina Stöwe und Frau Dr. med. Anita Hansen begleiten meinen Lebensweg seit Anfang des Studiums bzw. seit dem Beginn meiner beruflichen Tätigkeit. In freudigen und zweifelnden Momenten standen sie mir zur Seite und haben mich motiviert, meine wissenschaftlichen Projekte voranzubringen. Dafür bin ich ihnen sehr dankbar.

## A1 - Gesamtverzeichnis der eigenen Publikationen

1. Koenigshausen E, Magnusson K, Vester EG. Successful thrombolysis in patient with right heart thromboembolism : a case report and literature overview. *Clin Res Cardiol.* 2007;96:755-758. doi: 10.1007/s00392-007-0555-3
2. Konigshausen E, Potthoff SA, Haase R, Meyer-Schwesinger C, Kaufmann E, Rump LC, Stegbauer J, Sellin L, Quack I, Woznowski M. Isolation of Glomeruli and In Vivo Labeling of Glomerular Cell Surface Proteins. *J Vis Exp.* 2019. doi: 10.3791/58542
3. Stegbauer J, Potthoff SA, Quack I, Mergia E, Clasen T, Friedrich S, Vonend O, Woznowski M, Konigshausen E, Sellin L, et al. Chronic treatment with angiotensin-(1-7) improves renal endothelial dysfunction in apolipoproteinE-deficient mice. *Br J Pharmacol.* 2011;163:974-983. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01295.x
4. Quack I, Woznowski M, Potthoff SA, Palmer R, Konigshausen E, Sivritas S, Schiffer M, Stegbauer J, Vonend O, Rump LC, et al. PKC alpha mediates beta-arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia. *J Biol Chem.* 2011;286:12959-12970. doi: 10.1074/jbc.M110.204024
5. Konigshausen E, Zierhut UM, Ruetze M, Potthoff SA, Stegbauer J, Woznowski M, Quack I, Rump LC, Sellin L. Angiotensin II increases glomerular permeability by beta-arrestin mediated nephrin endocytosis. *Sci Rep.* 2016;6:39513. doi: 10.1038/srep39513
6. Randles MJ, Collinson S, Starborg T, Mironov A, Krendel M, Konigshausen E, Sellin L, Roberts IS, Kadler KE, Miner JH, et al. Three-dimensional electron microscopy reveals the evolution of glomerular barrier injury. *Sci Rep.* 2016;6:35068. doi: 10.1038/srep35068
7. Domenig O, Manzel A, Grobe N, Konigshausen E, Kaltenecker CC, Kovarik JJ, Stegbauer J, Gurley SB, van Oyen D, Antlanger M, et al. Neprilysin is a Mediator of Alternative Renin-Angiotensin-System Activation in the Murine and Human Kidney. *Sci Rep.* 2016;6:33678. doi: 10.1038/srep33678
8. Potthoff SA, Stamer S, Grave K, Konigshausen E, Sivritas SH, Thieme M, Mori Y, Woznowski M, Rump LC, Stegbauer J. Chronic p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves vascular function and remodeling in angiotensin II-dependent hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2016;17. doi: 10.1177/1470320316653284
9. Konigshausen E, Sellin L. Circulating Permeability Factors in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Review of Proposed Candidates. *Biomed Res Int.* 2016;2016:3765608. doi: 10.1155/2016/3765608
10. Konigshausen E, Hengel H, Adams O, Bry H, Steiner S, Priegnitz C, Hansen A, Sellin L, Rump LC, Voiculescu A. Pulmonary Cytomegalovirus Replication in Renal Transplant Patients with Late Onset Pneumonitis. *Ann Transplant.* 2016;21:235-240. doi: 10.12659/aot.896938
11. Haase R, Potthoff SA, Meyer-Schwesinger C, Frosch C, Wiech T, Panzer U, Konigshausen E, Stegbauer J, Sellin L, Rump LC, et al. A novel in vivo method to quantify slit diaphragm protein abundance in murine proteinuric kidney disease. *PLoS One.* 2017;12:e0179217. doi: 10.1371/journal.pone.0179217

12. Königshausen E, Sellin L. Recent Treatment Advances and New Trials in Adult Nephrotic Syndrome. *Biomed Res Int*. 2017;2017:7689254. doi: 10.1155/2017/7689254
13. Stegbauer J, Chen D, Herrera M, Sparks MA, Yang T, Königshausen E, Gurley SB, Coffman TM. Resistance to hypertension mediated by intercalated cells of the collecting duct. *JCI Insight*. 2017;2:e92720. doi: 10.1172/jci.insight.92720
14. Königshausen E, Potthoff SA, Woznowski M, Stegbauer J, Rump LC, Sellin L. Highly Sensitive Measurement of Glomerular Permeability in Mice with Fluorescein Isothiocyanate-polysucrose 70. *J Vis Exp*. 2019. doi: 10.3791/59064
15. Königshausen E, Schmitz CT, Rump LC, Sellin L. Imaging of Podocytic Proteins Nephrin, Actin, and Podocin with Expansion Microscopy. *J Vis Exp*. 2021. doi: 10.3791/62079
16. Kantauskaite M, Müller L, Hillebrandt J, Lamberti J, Fischer S, Kolb T, Ivens K, Koch M, Andree M, Lubke N, et al. Immune response to third SARS-CoV-2 vaccination in seronegative kidney transplant recipients: Possible improvement by mycophenolate mofetil reduction. *Clin Transplant*. 2022;36:e14790. doi: 10.1111/ctr.14790
17. Woznowski MP, Potthoff SA, Königshausen E, Haase R, Hoch H, Meyer-Schwesinger C, Wiech T, Stegbauer J, Rump LC, Sellin L, et al. Inhibition of p38 MAPK decreases hyperglycemia-induced nephrin endocytosis and attenuates albuminuria. *J Mol Med (Berl)*. 2022;100:781-795. doi: 10.1007/s00109-022-02184-5
18. Kantauskaite M, Müller L, Kolb T, Fischer S, Hillebrandt J, Ivens K, Andree M, Luedde T, Orth HM, Adams O, et al. Intensity of mycophenolate mofetil treatment is associated with an impaired immune response to SARS-CoV-2 vaccination in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2022;22:634-639. doi: 10.1111/ajt.16851
19. Tometten I, Landmann S, Kantauskaite M, Lamberti J, Hillebrandt J, Müller L, Kittel M, Kolb T, Ivens K, Schmitz M, et al. Factors Associated With Vaccine-Induced T-Cell Immune Responses Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Kidney Transplant Recipients. *J Infect Dis*. 2023;227:641-650. doi: 10.1093/infdis/jiac449
20. Orth HM, Flasshove C, Berger M, Hattenhauer T, Biederbick KD, Mispelbaum R, Klein U, Stemler J, Fisahn M, Doleschall AD, et al. Early combination therapy of COVID-19 in high-risk patients. *Infection*. 2024;52:877-889. doi: 10.1007/s15010-023-02125-5
21. Königshausen E, Zierhut UM, Ruetze M, Rump LC, Sellin L. A molecular mechanism for angiotensin II receptor blocker-mediated slit membrane protection: Angiotensin II increases nephrin endocytosis via AT1-receptor-dependent ERK 1/2 activation. *FASEB J*. 2024;38:e70018. doi: 10.1096/fj.202400369R

## A2 - Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name Dr. med. Eva Königshausen  
Geburtsdatum/-ort 20. März 1978 in Düsseldorf  
Familienstand verheiratet, 2 Kinder

### BERUFLICHER WERDEGANG

---

10/2007 - heute Klinik für Nephrologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,  
Prof. Dr. med. L.C. Rump  
Ab 10/2020 Oberärztliche Tätigkeit  
11/2019 - 10/2020 Mutterschutz/Elternzeit  
08/2018 - 11/2019 Oberärztliche Tätigkeit  
10/2017 - 08/2018 Elternzeit  
01/2016 - 10/2017 Funktionsoberärztliche Tätigkeit  
10/2007 - 01/2016 wissenschaftliche Mitarbeiterin  
12/2006 - 10/2007 Klinik für Nephrologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,  
Prof. Dr. med. B. Grabensee  
Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
10/2004 - 12/2006 Medizinische Klinik, Ev. Krankenhaus Düsseldorf, Prof. Dr.  
med. H. Neuhaus  
Assistenzärztin

### FORT- UND WEITERBILDUNG

---

05/2016 Hypertensiologin DHL®  
01/2016 Zusatzbezeichnung Notfallmedizin  
01/2014 Facharzt für Innere Medizin mit Schwerpunkt Nephrologie  
07/2008 Fachkunde Rettungsmedizin

## AUSBILDUNG

---

10/1999 - 05/2004	Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Staatsexamen Humanmedizin
09/1997 - 07/1999	Semmelweis Universität, Budapest, Ungarn, Physikum
08/1988 - 07/1997	Görres-Gymnasium, Düsseldorf, Abitur
08/1994 - 07/1995	Darlington School, Rome, Georgia, USA, Austauschjahr

## PROMOTION

---

04/2006	Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin, TU Dresden, Frau Prof. Dr. med. T. Koch: „Einfluss von Perfluorhexan auf die oxidative Burstaktivität und Phagozytose neutrophiler Granulozyten und Monozyten“
---------	---

## WISSENSCHAFTLICHE PREISE, STIPENDIEN UND FÖRDERUNGEN

---

2021	Förderung im Rahmen des Förderprogrammes für Habilitandinnen im Fachbereich Medizin „Chancen ergreifen – Forschung und Familie fördern“
09/2011	Posterpreis, 3. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie
03/2011	Bewilligung eines Forschungsantrages durch die Forschungskommission der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
09/2010	Posterpreis, 20th Meeting of European Society of Hypertension, Oslo, Norwegen
12/2010	Forschungsstipendium der Deutschen Hochdruckliga

### **A3 – Publikationen der Habilitationsschrift**

(Reproduktion und Nutzung im Rahmen der Habilitationsschrift genehmigt durch die einzelnen Rechteinhaber / Verlage.)