

Aus der Medizinischen Klinik m. S. Nephrologie und Internistische Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neue Aspekte der Nierenpathophysiologie
durch Untersuchung von humanen
Angiotensin II Typ I Rezeptor aktivierenden Antikörpern
und SLC12A3 Mutationen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jasmin Kehr, geb. Seringer

aus Stuttgart

Datum der Promotion: 27. 02. 2015

Widmung

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis	Seite
Titelseite	1
Widmung	2
Zusammenfassung	4
Einleitung	6
Zielstellungen	10
Material und Methodik	11
Ergebnisse und Diskussion	14
Literatur	20
Anteilerklärung	24
Lebenslauf (Curriculum Vitae)	26
Publikationen	27
Eidesstattliche Versicherung	28
Danksagung	29
Originalarbeiten	30

Zusammenfassung

Das Gitelman Syndrom ist eine relativ häufige monogenetische, renale Tubuluserkrankung (*SLC12A3* Gen) des Menschen mit autosomal-rezessivem Erbgang. Das Gitelman Syndrom führt relativ langsam zur Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) mit der Folge, dass nur wenige betroffene Patienten eine terminale Niereninsuffizienz entwickeln. Für die Abnahme der GFR wird eine übersteigerte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems verantwortlich gemacht. Die Penetranz der Erkrankung in betroffenen Familien sowie Mechanismen vaskulärer Komplikationen nach Nierentransplantation, insbesondere durch Angiotensin II Typ I-Rezeptor aktivierende Antikörper (AT1R-Abs), sind nicht ausreichend untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1) neuartige Mutationen in *SLC12A3* in Patienten mit Gitelman Syndrom identifiziert und 2) die vaskuläre Wirkungsweise von AT1R-Abs bei Nierentransplantatabstoßung untersucht. Die Untersuchungen fokussierten sich auf die Identifizierung von neuartigen Mutationen in *SLC12A3* sowie klinische und laborchemische Analysen von Genotyp-Phänotyp-Beziehungen in betroffenen Familien einer genetischen Patientenkohorte. Die Wirkung von humanen AT1R-Abs wurde in isometrischen Kontraktionsmessungen an isolierten Nierenarterien von Ratten nach akuter Nierenischämie und Nierentransplantation studiert. Es wurden neuartige Mutationen in *SLC12A3* in Patienten mit Gitelman Syndrom identifiziert. Es wurde beobachtet, dass Mutationen in *SLC12A3* eine stark unterschiedliche Penetranz der Erkrankung in betroffenen Familienmitgliedern hervorrufen können. Es wurde gezeigt, dass AT1R-Abs unter prädisponierenden Bedingungen, wie in Ischämie oder Nierentransplantation Gefäßkontraktionen von Nierenarterien induzieren. Neutralisierende Antikörper gegen spezifische Epitope im Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (AT1R) können diese Effekte neutralisieren. Hinweise auf endotheliale Wirkmechanismen der AT1R-Abs (über NO / Prostaglandine und Cytochrome P450-Metabolite, wie Epoxyeicosatriensäuren) ergaben sich nicht. Die Untersuchungen führten zur Aufdeckung einer neuartigen Interaktion von Cytochrome P450-Metaboliten mit der endothelialen NO-Freisetzung. Die vorliegenden Ergebnisse tragen zum besseren Verständnis von tubulären Mechanismen der Nierenfunktion des Menschen, für die ärztliche Betreuung von Patienten mit Gitelman Syndrom bei und eröffnen neue Forschungsansätze für zukünftige Studien zu Mechanismen der vaskulären Nierentransplantatabstoßung.

Abstract

The Gitelman syndrome is a relatively common monogenic, renal tubulopathy (*SLC12A3* gene) in humans with autosomal recessive inheritance. The Gitelman syndrome leads to relatively slow reduction in glomerular filtration rate (GFR), with the result that few affected patients develop end stage renal disease (ESRD). An exaggerated activation of the renin-angiotensin-aldosterone system is thought to be responsible for the decrease in GFR. The penetrance of the disease in affected families, as well as mechanisms of vascular complications after kidney transplantation, especially by angiotensin II type I receptor activating antibodies (AT1R-Abs) have not been adequately studied. In this work,

1) novel mutations were identified in *SLC12A3* in patients with Gitelman syndrome and 2) the vascular action of AT1R-Abs in renal transplant rejection were examined. The studies focused on the identification of novel mutations in *SLC12A3*, as well as clinical and laboratory analysis of genotype-phenotype relationships in a genetic cohort of patients. The effects of human AT1R-Abs were studied in isolated renal arteries of rats after acute renal ischemia and renal transplantation in isometric contraction measurements. Novel mutations were identified in *SLC12A3* gene in patients with Gitelman syndrome. It was observed that mutations in *SLC12A3* can cause a very different penetrance of the disease in affected family members. It has been shown that AT1R-Abs can induce vessel contractions of renal arteries in predisposing conditions, such as ischemia or renal transplantation. Neutralizing antibodies against specific epitopes in the angiotensin II type 1 receptor (AT1R) can neutralize these effects. Possible involvement of endothelial mechanisms of AT1R-Abs via NO / prostaglandins and cytochrome P450 metabolites (such as epoxyeicosatrienoic acid) was studied. The investigations led to the discovery of a novel interaction of cytochrome P450 metabolites with endothelial NO release. The present results contribute to a better understanding of the renal tubular pathophysiology in Gitelman syndrome and may have an impact on every-day patient care. Further this study opens up new lines of research for future studies on the mechanisms of vascular renal transplant rejection.

Einleitung

1. Gitelman Syndrom

Das Gitelman Syndrom ist eine autosomal-rezessiv vererbte, renal tubuläre Krankheit^{1,2}. Sie ist gekennzeichnet durch eine hypokaliämische, metabolische Alkalose mit erhöhten Renin und Aldosteronwerten, Hypomagnesiämie, niedriger Kalziumausscheidung im Urin und normal bis niedrigen Blutdrücken. Die Prävalenz liegt bei 1:40.000, es handelt sich um eine der häufigsten erblichen Tubulopathien. Die Symptome treten meist nicht vor dem Alter von 6 Jahren auf. Die Diagnose wird aber in der Regel erst im Erwachsenenalter gestellt. Oft haben Patienten mit Gitelman Syndrom vorübergehende Episoden von Muskelschwäche und Tetanie, manchmal kombiniert mit Bauchschmerzen, Erbrechen und Fieber. Auch Parästhesien, besonders im Gesicht, sind häufig³.

Das Gitelman Syndrom wird autosomal-rezessiv vererbt. Bei den meisten Patienten werden Mutationen in Exons des *SLC12A3* Gens gefunden⁴; in einem Fall wurden Intron Mutationen beschrieben⁵. Es kodiert den Thiazid sensitiven Na-Cl Kotransporter (NCCT). Dieser ist für 5-7% der gesamten Natriumrückresorption verantwortlich. Folge dieses Defekts ist ein Salzverlust, der zu einer Volumenkontraktion und Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems führt. Der Aldosteronanstieg wiederum führt zu einer vermehrten Expression des epithelialen Natriumkanals (eNaC) mit vermehrter Natriumrückresorption, die dem Salzverlust entgegenwirkt. Die hohe Aldosteronkonzentration und das hohe distale Angebot von Natrium stimulieren den distalen Kationenaustausch (Natrium gegen Kalium und Wasserstoffionen) über ein lumen negatives Potenzial. So wird zumindest teilweise das Entstehen der hypokaliämischen und hypochlorämischen metabolischen Alkalose erklärt³. Mehr als 140 verschiedene *SLC12A3* Mutationen wurden bislang beschrieben^{3,6}.

Die meisten symptomfreien Patienten mit Gitelman Syndrom benötigen keine Behandlung, nur jährliche ambulante Kontrollen. Dagegen benötigen symptomatische Patienten mit Gitelman Syndrom eine lebenslange Substitutionstherapie von Magnesium- und Kaliumionen. Empfohlen werden eine lebenslange Magnesium-Supplementierung mit Magnesiumoxid oder Magnesiumsulfat und eine gründliche kardiologische Untersuchung mit der Suche nach möglichen Risikofaktoren für kardiale

Arrhythmien. Alle Patienten mit Gitelman Syndrom werden ermutigt, eine natrium- und kaliumreiche Diät einzuhalten. Im Allgemeinen ist die Langzeitprognose im Hinblick auf die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und die Gesamtmortalität von Patienten mit Gitelman Syndrom gut ³. Nur wenige betroffene Patienten entwickeln eine terminale Niereninsuffizienz ⁷.

Es ist unbekannt, ob symptomfreie Patienten mit Gitelman Syndrom eine terminale Niereninsuffizienz entwickeln können. Darüberhinaus ist unklar, wer von den symptomatischen Patienten mit Gitelman Syndrom eine Niereninsuffizienz (reduzierte GFR) entwickelt. Neuere Ergebnisse lassen vermuten, dass nicht die persistierende Hypokaliämie, sondern eine übersteigerte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems für die Abnahme der GFR verantwortlich ist ³. Allerdings sind Genotyp-Phänotyp-Beziehungen von Patienten mit Gitelman Syndrom sowie die Penetranz der Erkrankung in betroffenen Familien nicht ausreichend untersucht ⁶. Patienten können auch durch Entwicklung von Autoantikörpern gegen den NCCT ⁸ ein Gitelman Syndrom erwerben, oder als Nebenwirkung von Ciclosporin ⁹.

Das Bartter Syndrom entsteht durch Mutationen im Furosemid-sensiblen Na /K /2Cl Kotransporter Typ 2 (NKCC2) (*SLC12A1*) ¹⁰, oder im ROMK-Kaliumkanal (*KCNJ1*) ¹¹. Die Betroffenen zeigen eine ausgeprägte Polyurie, die sich bereits in utero mit einem Polyhydramnion manifestiert. Postnatal zeigt sich ein massiver Salzverlust und eine nachfolgende hypokaliämische metabolische Alkalose mit zusätzlicher Hyperkalziurie und Nephrokalzinose ¹². Eine Störung des Magnesiumhaushaltes ist aber eher selten. Eine weitere Gruppe von Patienten mit Bartter Syndrom hat Mutationen im Barttin-Gen (*BSND*) welche mit sensorineuraler Taubheit und stärkerem renalen Salz- und Wasserverlust assoziiert ist. Das klassische Bartter-Syndrom (cBS) wird durch Mutationen im *CLCNKB* Gen, das für den Chlorid-Kanal ClC-Kb kodiert, hervorgerufen ¹³. Die klinische Präsentation der Betroffenen variiert. Häufig entwickelt sich ein Phänotyp, der kaum von dem des Gitelman Syndroms zu unterscheiden ist ^{14, 15}. Meist zeigen die Betroffenen, wie ursprünglich von Bartter et al berichtet, Hypokaliämie, Hypochlorämie und Wachstumsverzögerung innerhalb der ersten zwei Lebensjahre ¹⁶.

Im Unterschied zum Gitelman Syndrom hat das Bartter Syndrom eine relativ schlechte Prognose im Hinblick auf die Nierenfunktion (GFR). Ursächlich für eine Nephropathie

können eine Glomerulosklerose und hypertrophe Veränderungen am juxtaglomerulären Apparat bedingt durch chronischen Salzverlust sein, aber auch, insbesondere beim Bartter Syndrom, durch die durch Hyperkalziurie bedingte Nephrokalzinose. Initial wurde vermutet, dass die Hypokaliämie eine hypokaliämische Nephropathie verursachen könnte. Walsh *et al.* zeigten jedoch, dass die Ausprägung der Hypokaliämie nicht mit der GFR korreliert, sondern dass vielmehr der persistierende Salz- und Wasserverlust mit nachfolgendem Hyperaldosteronismus eine Rolle in der Pathogenese spielt ¹⁷. In ihrer retrospektiven Studie verglichen sie Urin- und Serumparameter von Patienten mit Gitelman und Bartter Syndrom. Die Hypokaliämie war in beiden Erkrankungen ähnlich stark ausgeprägt, obgleich eine Nierenfunktionsverschlechterung beim Gitelman selten und beim Bartter Syndrom häufiger auftrat. Die untersuchten Patienten mit Bartter Syndrom hatten jedoch eine höhere fraktionelle Natriumexkretion verglichen mit den Gitelman Syndrom Patienten, ebenso wie höhere Plasmareninaktivität und Serum-Aldosteronwerte. So folgerten sie, dass der Grad der Hypokaliämie nicht mit der GFR korreliert, sondern dass der ständige Salz- und Wasserverlust und begleitende Hyperaldosteronismus für die Nephropathie bei diesen Syndromen verantwortlich ist.

Die Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz ist beim Bartter Syndrom gehäuft. In der Literatur finden sich mehrere Beispiele für eine Nierentransplantation bei Bartter Syndrom ^{18 19}. Nach Nierentransplantation normalisierten sich die Plasma-Renin Aktivität, Angiotensin I, II und Aldosteron-Werte im Serum ²⁰. Interessanterweise wurde die renale Hypertonie in einem Empfänger durch Transplantation einer Niere von einem Spender mit Gitelman Syndrom vollständig geheilt ²¹.

2. Angiotensin II Typ I-Rezeptor aktivierende Antikörper (AT1R-Abs) bei Nierentransplantatabstoßung

Akute und chronische Nierentransplantatabstoßung durch HLA spezifische Antikörper wurden in den letzten Jahrzehnten extensiv untersucht. Abstoßungsreaktionen von HLA identischen Verwandten weisen auf die Bedeutung von Immunreaktionen gegen non-HLA Ziele hin. Antikörper gegen non-HLA Antigene wie Gefäßzellen, MHC Klasse IA Gefäßrezeptoren und Vimentin wurden in die Pathogenese der akuten und chronischen allogenen Rejektionen einbezogen ^{22, 23}.

Dragun *et al.* berichteten über 16 allogene Nierentransplantatempfänger bei denen agonistische Antikörper gegen den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (AT1R), aber keine HLA Antikörper nachweisbar waren und die schwere vaskuläre Rejektionen und maligne Hypertension entwickelten²³. Sie berichteten, dass AT1 Rezeptor Antikörper der IgG1 und IgG3 Unterklasse an die zweite extrazelluläre Schleife des AT1 Rezeptors binden. Diese Antikörper (AT1R-Abs) sind in der Lage ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase) zu phosphorylieren. Es wurde abgeleitet, dass dieser Signalkaskade eine pathophysiologische Bedeutung zukommt, wie Vasokonstriktion, Blutdruckregulation, aber auch endotheliale Dysfunktion, Entzündung, Wachstum von glatten Muskelzellen, Hypertrophie und Zellmigration²³.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob AT1R-Abs nur proinflammatorisch und prokoagulatorisch wirken, oder ob sie auch spezifische Immunantworten auslösen²³. Um zu zeigen, dass AT1R-Abs vaskuläre Rejektionen verursachen, wurden diese Antikörper in nierentransplantierte Ratten infundiert. Eine Woche nach Transplantation, zeigten die Nieren der Ratten Zeichen der Endarteriitis und intravaskuläre Infiltrate. Diese Effekte waren nach Infusion von AT1R-Abs in Ratten mit nativen Nieren nicht nachweisbar²³. Dies legt nahe, dass AT1R-Abs einen direkten Einfluss auf die Pathogenese von vaskulären Rejektionen haben. Die Transplantation fremder Nieren in Empfänger scheint die Organe empfänglich für die Effekte von AT1R-Abs zu machen. Allerdings wurde nicht untersucht, ob AT1R-Abs tatsächlich Bioaktivität im Hinblick auf kontraktile Gefäßreaktivität besitzen. Dragun *et al.* nahmen an, dass der post-Transplantationsreperfusionsschaden die Expression des AT1 Rezeptors innerhalb des Transplantats erhöht, seine Dichte verändern und Konformationsänderungen am Rezeptor verursachen kann²³. Nierenarterien besitzen funktionell vasokonstriktorische AT1 Rezeptoren. In dieser Studie wurde die Wirkung von AT1R-Abs auf die Kontraktilität von Nierenarterien untersucht. Es wurde abgeklärt, ob Hypoxie / Ischämie und Transplantation eine permissive Rolle spielen.

Zielstellungen

Im Einzelnen wurden folgende Hypothesen untersucht:

- 1) Gibt es neue *SLC12A3* Mutationen, anhand derer Einblicke in phänotypische Manifestationen des Gitelman Syndroms und Aufschlüsse über die Genotyp-Phänotyp Korrelation gewonnen werden können? Hier sollte untersucht werden, ob Mutationen in *SLC12A3* eine stark unterschiedliche Penetranz der Erkrankung in betroffenen Familienmitgliedern hervorrufen können. Die Untersuchungen fokussierten sich auf die Identifizierung von neuartigen Mutationen in *SLC12A3* sowie klinisch und laborchemische Analysen von Genotyp-Phänotyp-Beziehungen in betroffenen Familien einer genetischen Patientenkohorte.
- 2) Es sollte untersucht werden, ob AT1R-Abs eine intrinsische vasokonstriktive Aktivität besitzen und ob Hypoxie / Ischämie und Transplantation eine permissive Rolle bei der Vasokonstriktion spielen. Es sollte abgeklärt werden, ob endotheliale Mechanismen eine Rolle spielen und beteiligte Komponenten sollten identifiziert werden.

Die Untersuchung dieser Hypothesen trägt zum besseren Verständnis von tubulären Mechanismen der Nierenfunktion im Menschen bei. Es ist eine bessere Aufklärung inkompletter Syndrome zu erwarten. Einen Beitrag für die ärztliche Betreuung von Patienten mit Gitelman Syndrom wird erbracht und neue Forschungsansätze für zukünftige Studien zu Mechanismen der vaskulären Nierentransplantatabstoßung bei Patienten mit nichtgenetischen und genetischen Erkrankungen, die zur Niereninsuffizienz führen, wie dem Gitelman und Bartter Syndrom, werden aufgezeigt.

Material und Methodik

- 1) Anamnese und klinische Untersuchung der Patienten, Neurologischer Status, Erhebung von Blutdruck und Puls, Laboruntersuchungen (Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium, Chlorid, Kreatinin und Urinalysen)
- 2) Molekulare Diagnostik von Gitelman Syndrom Mutationen. Das *SLC12A3* Gen wurde standardmäßig unter Verwendung der Sanger Technik sequenziert ²⁴.
- 3) Isolation und AT1R-Abs aus dem Serum von Patienten mit vaskulärer Rejektion, bei denen keine anti-HLA Antikörper nachweisbar waren. Die AT1R-Abs wurden in physiologischer Salzlösung (PSS) 1:40 verdünnt. Als AT1 Rezeptor-Antagonisten wurden eingesetzt: Irbesartan sowie neutralisierende Peptide ENTNIT und AFHYESQ, welche an der zweiten extrazellulären Schleife des humanen AT1 Rezeptors angreifen ²⁵.
- 4) Tierexperimente. Alle Tierexperimente wurden an der Charité durchgeführt mit Genehmigung der verantwortlichen Berliner Tierversuchsbehörde: Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo). Es wurden native, isolierte, renale und mesenteriale Arterienringe untersucht. Die Arterien wurden unbehandelten Ratten, Ratten nach vorherigem Ischämie / Reperfusionsschaden (I/R), oder Ratten nach allogener Nierentransplantation entnommen. Um native (Kontroll-) Arterien zu untersuchen, wurden Fisher Ratten (250-300g) durch Exsanguination unter tiefer Allgemeinanästhesie präpariert. Sofort im Anschluss wurden Mesenterialgefäßbett und Nieren entfernt und in kaltes (4°C), oxygeniertes (95% Sauerstoff/5% Kohlendioxid) PSS überführt. Nierenarterien und Mesenterialarterien wurden unter einem Stereomikroskop präpariert ²⁵.
- 5) Modell Ischämie/ Reperfusionsschaden: Die Tiere wurden auf einen beheizten OP Tisch gelegt, um die rektale Temperatur bei 37°C zu halten. Sie erhielten Inhalationsanästhesie mit Isofluran. Eine Längs- Laparotomie wurde durchgeführt. Beide Nierenarterien wurden für 45 min abgeklemmt, danach wurden die Klemmen entfernt und die Narkose beendet. Die Tiere wurden 24

Stunden später getötet, die Nierenarterien wurden entnommen und sofort in kaltes, oxygenierte PSS Lösung transferiert²⁵.

- 6) Allogenes Ratten-Transplantations Modell: Es wurde das weit etablierte Nierentransplantationsmodell „Fisher Ratten auf Lewis Ratten“ eingesetzt. Den Fisher Ratten wurde die linke Niere explantiert; diese wurde mit 5 ml ViaSpan (Bristol-Myers Squibb, München, Deutschland) gespült und dann für 2 h bei 4°C gekühlt. In der Zwischenzeit erhielt der Lewis Empfänger eine linksseitige Nephrektomie. Eine End-zu-Seit Anastomose zwischen den Spender Nierengefäßen (Fisher) und der Aorta und V. cava inf. des Empfängers wurden angelegt, gefolgt von einer End-zu-End Ureteroureterostomie und rechtseitiger nativer Nephrektomie. Der Laparatomieschnitt wurde geschlossen und die Narkose beendet. Die Tiere wurden 24 h später getötet und die Nieren wurden rasch in kaltes PSS für die Präparation der Nierenarterien überführt.

- 7) Myographie an kleinen Gefäßen: Arterienringe mit einer Länge von 2 mm von den unterschiedlichen experimentellen Gruppen, wurden präpariert und in einem Draht-Myograph System aufgespannt (Multi Myograph 610; Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark). Die zwei Drähte haben einen Durchmesser von 40 µm. Die Gefäße werden in PSS mit der folgenden Zusammensetzung inkubiert: NaCl, 119 mM; KCl 4,7 mM; MgCl₂ 1,3 mM; NaH₂PO₄ 0,5mM, KH₂PO₄ 1,2 mM; NaHCO₃ 25 mM; Glucose 11,1 mM; CaCl₂ 2,5 mM; pH 7,4 unter ständiger Oxygenierung mit 95% Sauerstoff/5% Kohlendioxid bei 37°C. Isometrische Veränderungen wurden mit dem Power Lab Data Recorder, Chart V5.3) erfasst und aufgenommen (Software ADInstruments, Germany GmbH, Spechbach Deutschland). Am Anfang jedes Experiments wurden die Gefäße einer isotonischen PSS mit 60 mM KCl ausgesetzt, so lange bis die maximale Kontraktion beobachtet wurde. Diese Kontraktion wurde als Referenzkontraktion der jeweiligen Arterie genutzt. Danach wurde das KCl isotonisch mit NaCl ausgewaschen und eine Equilibrierungsphase von 30 min wurde angeschlossen. Die Reaktion der nativen Nierenarterien auf Ach (Acetylcholin) wurde in Anwesenheit und Abwesenheit des NO Synthase-Inhibitors Nitro-L-arginine-methylester, (30 µM), Cytochrome P450 Inhibitors Indomethacin (5 µM) und Epoxygenase Inhibitors 6-(2-Propargyloxyphenyl)hexanoicsäure (30 µM)

getestet. Die Effekte von Azetylcholin (ACh) wurden in Prozent der Antwort auf Phenylephrin (PE) (100%) angegeben. Native Nieren- und Mesenterialarterienringe wurden in gereinigten, in PSS gelösten AT1R-Abs des Index Patienten inkubiert. Humanes IgG, ohne AT1R-Abs, wurde zur Kontrolle eingesetzt (2 mg/ml). Gefäßkontraktionen wurden in Prozent der Originalkontraktion der Gefäße auf 60 mM KCl (cKCl) angegeben. Den Nierenarterienringen, wurden nach 45 min Inkubationszeit mit AT1R-Abs, nachfolgend Konzentrationen von Angiotensin II (0,001-1 μ M) und PE (0,01-10 μ M) in kumulativer Weise zugesetzt. Die Gefäßkontraktionen wurden wie bereits beschrieben aufgezeichnet. Endothel abhängige Relaxationen wurden durch steigende Konzentrationen von ACh (0,1-10 μ M) nach maximaler Kontraktion durch 10 μ M PE untersucht. Molekulare Komponenten der ACh abhängigen Relaxation wurden mittels pharmakologischer und genetischer Hilfsmittel in Mesenterialarterien der Ratte²⁵ und Maus²⁶ näher charakterisiert. Als nächstes wurden die AT1R-Abs den Nierenarterien nativer Nieren unter Einfluss von Ischämie und Reperfusion bzw. nach Nierentransplantation zugesetzt. Die über den AT1 Rezeptor vermittelte Antwort wurde durch Zugabe des AT1R Antagonisten Irbesartan (1 μ M) 30 min vor Zugabe der AT1R-Abs untersucht, oder durch Zugabe der neutralisierenden synthetischen Peptide (ENTNIT und AFHYESQ) zur AT1R-Abs Lösung (0,5 μ g per 50 μ L).

Eine komplette Übersicht der Methoden findet sich in:

Lukitsch I*, **Kehr J***, Chaykovska L, Wallukat G, Nieminen-Kelhä M, Batuman V, Dragun D, Gollasch M. Renal ischemia and transplantation predispose to vascular constriction mediated by angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies. *Transplantation* 2012;94(1):8-13. * Shared first authorship.

Roser M, Eibl N, Eisenhaber B, **Seringer J**, Nagel M, Nagorka S, Luft FC, Frei U, Gollasch M. Gitelman syndrome. *Hypertension* 2009 Jun;53(6):893-7

Hercule HC, Schunck WH, Gross V, **Seringer J**, Leung FP, Weldon SM, da Costa Goncalves ACh, Huang Y, Luft FC, Gollasch M. Interaction between P450 eicosanoids and nitric oxide in the control of arterial tone in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 Jan;29(1):54-60.

Kopien dieser Publikationen finden sich **im Anhang**.

Ergebnisse und Diskussion

1. Gitelman Syndrom

In der Kohorte von Patienten mit Gitelman Syndrom wurden folgende neue *SLC12A3* Gen Mutationen identifiziert: Phe548Leu, Gln1012Arg, Gly841Arg, Ser987Arg, c.1927delC, Trp161Xaa, Gly770Asp, and IVS25+1G>T (Abb. und Tabelle S1 in Roser et al., 2009).

Für zwei Indexpatienten wurden ausführliche laborchemische Befunde, klinische Untersuchungsergebnisse, klinische Verlaufsdaten und Stammbäume mit klinischen Verläufen der Betroffenen dargestellt. Diese Befunde zeigen, dass die Mutationen pathogen sind. Sie sind zudem aufschlussreich für Genotyp-Phänotyp Beziehungen des Gitelman Syndroms im Menschen und bieten Hinweise auf die mögliche Bedeutung des genetischen Hintergrunds für die klinische Manifestation der Krankheit. Die beiden Indexpatienten klagten seit Jahren über allgemeine Schwäche und Muskelkrämpfe sowie hypotensive Blutdruckwerte. Die erhobenen Laborwerte zeigten eine Hypokaliämie, manche zeigten eine zusätzliche Hyponatriämie. Renin und Aldosteronwerte im Blutplasma waren erhöht. Serum Ca^{2+} und Cl^- lagen im Normbereich. In der arteriellen Blutgasanalyse zeigte sich eine metabolische Alkalose. Die Familienanamnese und weitere klinisch-genetische Untersuchungen zeigten weitere Betroffene mit Mutationen unterschiedlicher Ausprägung sowie unterschiedlichen laborchemischen Zeichen des Gitelman Syndroms, trotz vergleichbaren Alters der Betroffenen.

Beim Indexpatient 1 wurde eine Phe548Leu Mutation identifiziert, die niemals zuvor beschrieben wurde. Diese Mutation ist in einer transmembranären Region des NCCT lokalisiert (Abb. S1). Bereits früher wurde von Gly439Ser und Pro643Leu in heterozygoten Gitelman Syndrom Patienten berichtet. Diese allelische Kombination ²⁷ war jedoch neu.

Obwohl Gly439Ser und Pro643Leu ausreichend wären, um die Symptome des Patienten zu erklären, ist es möglich, dass die Symptome besonders stark ausgeprägt sind, weil der Patient zugleich drei Mutationen trägt (Gly439Ser and Pro643Leu/Phe548Leu). Sein Bruder ist bemerkenswert symptomfrei, obwohl er in ähnlichem Alter ist und auch drei dieser Mutationen trägt.

Der Indexpatient 2 ist compound heterozygot für c.104delCinsTT und Gln1012Arg (Tabelle S1). Gln1012Arg ist eine neue Missense Mutation (Figure 1), die eine Sequenzposition von Glutamin betrifft, welche in allen Vertebraten konserviert ist (Tabelle S1). Weil *SLC12A3* für 1021 Aminosäuren kodiert, ist Gln1012Arg in der Nähe des C-terminalen Endes von NCC lokalisiert. Diese Variante befindet sich am distalen Ende der zytoplasmatischen C-terminalen *SCL12A3* Domäne des NCCT. Bislang wurden keine Mutationen beschrieben, die weiter distal als Gln1012Arg existieren.

Die Patientin hat einen bemerkenswert milden klinischen Verlauf, trotz ausgeprägter Paraklinik. Ihr Bruder ist klinisch beschwerdefrei. Diese Befunde sprechen für schwache Genotyp-Phänotyp Beziehungen beim Gitelman Syndrom, aber für eine relativ bedeutsame Rolle des genetischen Hintergrunds in betroffenen Familien. Mechanismen der Hypomagnesiämie, Hypokaliämie und metabolischen Alkalose werden weiter in Roser et al. diskutiert ^{24, 28}.

Die Studie gibt Einblicke zum Salzhunger und zu genetischen Mechanismen der Blutdruckregulation im Menschen. Die Entdeckung von neuen Mutationen im NCCT eröffnet Möglichkeiten, Blutdruckvariationen in größeren, epidemiologischen Studienkohorten durchzuführen, die auf der Grundlage bekannter heterozygoter Mutationen ausgesucht werden können ²⁹. Kürzlich wurden Mitglieder der Framingham Heart Study auf bekannte Variationen in den 3 Genen untersucht, nämlich *SLC12A3*, *SLC12A1* und *KCNJ1* untersucht. Diese Mutationen waren alle heterozygot und selten, sie wurden bei 1% bis 2% der Framingham Population nachgewiesen. Die Varianten produzierten dennoch eine klinisch signifikante Blutdrucksenkung und vermutlich

schützende Einflüsse auf die Entwicklung von Bluthochdruck in der Allgemeinbevölkerung. Diese Erkenntnisse und die neu entdeckten Mutationen in dieser Studie^{24,29} eignen sich für fortführende genetische Untersuchungen zum Bluthochdruck und andere gemeinsame komplexe Merkmale (common complex traits). Varianten, die die WNK Funktion (lysine deficient protein kinase) beeinflussen, würden auch den Phänotyp von Gitelman Syndrom in Patienten prägen, die NCCT Mutationen tragen. Interessanterweise liegt WNK4 nur 1 Mb vom Locus D17S1299 entfernt, dem Locus, der die stärkste Verbindung zur Blutdruckvariation in der Framingham Heart Study Population zeigt. Die hier geschilderten Patientenbeispiele zeigen aber auch, dass molekulargenetische Analysen häufiger in die Diagnostik von Hypomagnesiämie und Hypokaliämie Syndromen (Gitelman Syndrom) einbezogen werden sollten²⁴.

Für die Findung von optimalen Therapieoptionen von Patienten mit Gitelman Syndrom (Indexpatienten) fällt auf, dass es aktuell keine Daten gibt, die einen Nutzen von Angiotensin-converting enzyme (ACE) Hemmern und Aldosteron Antagonisten beim Gitelman Syndrom belegen. Diesbezüglich wäre es begrüßenswert, wenn zumindest an NCCT-defizienten Mäusen derartige Untersuchungen erfolgen würden.

Unsere Untersuchung unterstreicht die Wichtigkeit des genetischen Hintergrunds für die phänotypische Ausprägung des Gitelman Syndroms und dessen therapeutischen Möglichkeiten. Auch hierfür könnten NCCT-defiziente Mäuse mit verschiedenem Hintergrund als Untersuchungsmodell eingesetzt werden.

Gitelman Syndrom führt relativ langsam zur Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) mit der Folge, dass nur wenige betroffene Patienten eine terminale Niereninsuffizienz entwickeln⁷. Für die Abnahme der GFR wird eine übersteigerte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems verantwortlich gemacht¹⁷. Die hier untersuchte Patientenkohorte konnte aufgrund logistischer Probleme, des Datenschutzes und von Besonderheiten der deutschen Krankenversorgungsstrukturen nicht im Langzeitverlauf beobachtet werden. Der Langzeitverlauf von Patienten mit Gitelman Syndrom könnte durch Schaffung geeigneter Versorgungsstrukturen (z.B. überregionale Spezialsprechstunden für Gitelman und Bartter Syndrom Patienten in Hochschulambulanzen) systematisch untersucht werden. In solchen Zentren könnten auch Langzeituntersuchungen zum Nutzen von Angiotensin Converting Eynzyme (ACE)

Hemmern und Aldosteron Antagonisten bei Betroffenen mit Gitelman Syndrom durchgeführt werden.

2. AT1R Abs

Die übersteigerte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, aber nicht die Hypokaliämie, wird für die Abnahme der GFR im Langzeitverlauf beim Gitelman Syndrom vermutet ¹⁷. Zusätzliche renovaskuläre Probleme sind zu erwarten, wenn Patienten Angiotensin II Typ I-Rezeptor aktivierende Antikörper (AT1R-Abs) entwickeln. Diese Antikörper können eine beschleunigte Abstoßung bei Nierentransplantation verursachen ²³. Sie können aber auch bei nephrologischen Patienten vor einer Nierentransplantation auftreten und dabei möglicherweise pathogen auf die Nierenfunktion wirken und das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse erhöhen ^{30, 31}. Zunächst wurde mit einem Small Vessel Myographen untersucht, ob AT1R-Abs direkt eine Kontraktion an isolierten Mesenterial- und Nierenarterien der Ratte hervorrufen. Dies war der Fall für die Nierenarterien, nicht jedoch für die Mesenterialarterien. Wurden die Nierenarterien zuvor mit AT1R-Abs inkubiert und dann Angiotensin II oder Phenylephrin in steigenden Dosen zugesetzt, wurde kein zusätzlicher, prokontraktiler Effekt von AT1R-Abs beobachtet ²⁵.

Zur Untersuchung eines möglichen endothelabhängigen Einflusses wurden Azetylcholin- (ACh) abhängige Gefäßrelaxationen untersucht. ACh wurde in ansteigenden Dosen auf AT1R-Abs inkubierte Nierenarterien appliziert. Dabei zeigte sich eine normale Relaxation im Vergleich zur Kontrollgruppe mit IgG. Mittels pharmakologischer Hilfsmittel (Indomethazin, L-NAME, PPOH) wurde gezeigt, dass sich die endothelabhängige Relaxation durch ACh aus zwei Komponenten zusammensetzt: einer Komponente durch Freisetzung und Wirkung von NO/Prostaglandine und einer Komponente durch Freisetzung und Wirkung von Cytochrome P450 (CYP450) Metaboliten ²⁵. Diese Daten unterstreichen, dass AT1R-Abs Kontraktionen an Nierenarterien induzieren ohne Mitbeteiligung endothelialer NO/Prostaglandin und CYP 450 Metabolite ²⁵. Hinweise auf endotheliale Wirkmechanismen der AT1R-Abs (über NO/Prostaglandine und Cytochrome P450-Metabolite, wie Epoxyeicosatriensäuren) ergaben sich somit nicht. Die Untersuchungen führten zur Aufdeckung einer neuartigen Interaktion von CYP450 Metaboliten mit der endothelialen NO-Freisetzung ²⁶.

Des Weiteren wurde abgeklärt, ob Ischämie selbst, oder Ischämie während Nierentransplantation einen permissiven Faktor für die prokontraktile Wirkung der AT1R-Abs darstellt. In den Versuchen wurden native Nieren einer 45 min Ischämie ausgesetzt; die isolierten Nierenarterien zeigten eine 10fach stärkere Kontraktion, als die Nierenarterien aus Nieren, die keiner Ischämie ausgesetzt waren. Nierenarterien aus transplantierten Nieren, die 24 Stunden nach der Nierentransplantation mit einer Kaltischämiezeit von 2 Stunden untersucht wurden, zeigten gleich starke Kontraktionen wie native Nierenarterien aus Nieren, die einer 45 min Ischämie ausgesetzt waren. Die AT1R-Abs zeigten 10fach stärkere Kontraktionen in diesen Nierenarterien, als in Gefäßen von Nieren ohne Ischämie ²⁵.

Synthetische AT1R Peptide (ENTNIT und AFHYESQ), analog zu Epitopen der zweiten extrazellulären Schleife des AT1R, hemmten die kontraktile Wirkung der AT1R-Abs. Der AT1R-Antagonist Irbesartan hemmte nur tendenziell, aber statistisch nicht signifikant, die kontraktile Wirkung der AT1R-Abs. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit der These, dass die zweite extrazelluläre Schleife des AT1R eine entscheidende Rolle für unterschiedliche Funktionszustände des AT1R bezüglich seiner Antwort auf teilweise, vollständige und inverse Agonisten spielt ²⁵.

In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass AT1R-Abs von Nierentransplantierten Patienten mit vaskulärer Rejektion und Hypertension, eine prokontraktile Wirkung in Nierenarterien, nicht jedoch in Mesenterialarterien der Ratte, auslösen. Diese kontraktile Wirkung ist verstärkt auslösbar in Nierenarterien nach Ischämie oder nach Nierentransplantation ²⁵. Die Tatsache, dass Ischämie hierbei ein permissiver Faktor für die Auswirkungen der AT1R-Abs auf die Kontraktion der Gefäße ist, könnte eine wichtige pathophysiologische Rolle bei klinischen Zuständen mit übersteigter Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, beim akuten ischämischen Nierenversagen und bei Nierentransplantation, u.a. bei Patienten mit Gitelman Syndrom, spielen.

Die AT1R-Abs sind IgG1 und IgG3 Antikörper, die an zwei benachbarten Epitopen der zweiten extrazellulären Schleife des AT1R binden und dann eine intrazelluläre Signalkaskade in endothelialen und vaskulären glatten Muskelzellen auslösen ²⁵. Die

hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Antikörper diese Kontraktionen in Gefäßen der Niere auslösen, aber nicht in anderen Organen. Sie verändern nicht die Wirkung von $G_{q/11}$ Protein gekoppelten vasokonstriktorisches Rezeptoragonisten, wie Angiotensin II und Phenylephrin. Dabei scheint die AT1R-Abs Wirkung abhängig zu sein von der Konformation des AT1R, der sich durch unterschiedliche Einflüsse, wie zum Beispiel Hypoxie / Ischämie, ändern kann.

In vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass AT1R-Abs die Phosphorylierung von ERK1/2 induzieren und den downstream Transkriptionsfaktor Aktivator Protein 1 in glatten Gefäßmuskelzellen aktivieren, ähnlich der Wirkung von Angiotensin II ²³. Die erhöhte Kontraktilität von Nierenarterien durch den AT1R-Abs könnte auch mit den Unterschieden in der Mobilisation des intrazellulären Ca^{2+} und der Aktivierung von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, NADP, im Zusammenhang stehen. Die AT1R-/-AT1R-Abs Interaktion wird verstärkt unter dem Einfluss der Ischämie. Es ist erwiesen, dass die Angiotensin II Spiegel in der Nierenrinde 24 Stunden nach Ischämie und Transplantation erhöht sind, die AT1R sind jedoch unverändert, oder erniedrigt. Diese Effekte könnten die Wirkung von AT1R-/-AT1R-Abs in Nieren *in vivo* potenzieren und klinisch relevant für die Nierentransplantation sein ²⁵.

Es ist wahrscheinlich, dass eine verstärkte Gefäßkontraktion durch AT1R-Abs in der empfindlichen Phase der Reperfusion zur Verschlechterung der Gewebhypoxie beiträgt und schließlich zur verzögerten Nierentransplantatfunktion führt. Die prokontraktile Wirkung könnte auch die gefäßkonstriktorisches Wirkung von Calcineurin-Inhibitoren verschlimmern und damit zur Calcineurin-Inhibitor-Toxizität beitragen. Ein Screening der Empfänger für AT1R-Abs könnte dazu beitragen, die individuelle Risikobewertung bei Patienten zu verbessern und die Möglichkeit für eine rechtzeitige Intervention, auch bei Gitelman Syndrom Patienten, bieten. Zukünftige Studien sollten das Ziel haben, die Hypothese zu testen, dass AT1R-Abs ihre agonistische Wirkung durch Stabilisierung der agonistischen Rezeptorkonformation des AT1R entfalten.

Eine komplette Übersicht der Ergebnisse und Diskussion findet sich in:

Lukitsch I*, **Kehr J***, Chaykovska L, Wallukat G, Nieminen-Kelhä M, Batuman V, Dragun D, Gollasch M. Renal ischemia and transplantation predispose to vascular constriction mediated by angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies. *Transplantation* 2012;94(1):8-13. * Shared first authorship.

Roser M, Eibl N, Eisenhaber B, **Seringer J**, Nagel M, Nagorka S, Luft FC, Frei U, Gollasch M. Gitelman syndrome. *Hypertension* 2009 Jun;53(6):893-7

Hercule HC, Schunck WH, Gross V, **Seringer J**, Leung FP, Weldon SM, da Costa Goncalves ACh, Huang Y, Luft FC, Gollasch M. Interaction between P450 eicosanoids and nitric oxide in the control of arterial tone in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 Jan;29(1):54-60.

Kopien dieser Publikationen finden sich **im Anhang**.

Literatur

1. Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG. A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Physicians*. 1966;79:221-235.
2. Simon DB, Nelson-Williams C, Bia MJ, Ellison D, Karet FE, Molina AM, Vaara I, Iwata F, Cushner HM, Koolen M, Gainza FJ, Gitelman HJ, Lifton RP. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet*. 1996;12(1):24-30.
3. Knoers NV, Levtchenko EN. Gitelman syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3:22.
4. Vargas-Poussou R, Dahan K, Kahila D, Venisse A, Riveira-Munoz E, Debaix H, Grisart B, Bridoux F, Unwin R, Moulin B, Haymann JP, Vantuyghem MC, Rigotherier C, Dussol B, Godin M, Nivet H, Dubourg L, Tack I, Gimenez-Roqueplo AP,

- Houillier P, Blanchard A, Devuyst O, Jeunemaitre X. Spectrum of mutations in Gitelman syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(4):693-703.
5. Lo YF, Nozu K, Iijima K, Morishita T, Huang CC, Yang SS, Sytwu HK, Fang YW, Tseng MH, Lin SH. Recurrent deep intronic mutations in the SLC12A3 gene responsible for Gitelman's syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;6(3):630-639.
 6. Riveira-Munoz E, Chang Q, Bindels RJ, Devuyst O. Gitelman's syndrome: towards genotype-phenotype correlations? *Pediatr Nephrol*. 2007;22(3):326-332.
 7. Calo LA, Marchini F, Davis PA, Rigotti P, Pagnin E, Semplicini A. Kidney transplant in Gitelman's syndrome. Report of the first case. *J Nephrol*. 2003;16(1):144-147.
 8. Kim YK, Song HC, Kim YS, Choi EJ. Acquired gitelman syndrome. *Electrolyte Blood Press*. 2009;7(1):5-8.
 9. Al-Rasheed AK, Blaser SI, Minassian BA, Benson L, Weiss SK. Cyclosporine A neurotoxicity in a patient with idiopathic renal magnesium wasting. *Pediatr Neurol*. 2000;23(4):353-356.
 10. Vargas-Poussou R, Feldmann D, Vollmer M, Konrad M, Kelly L, van den Heuvel LP, Tebourbi L, Brandis M, Karolyi L, Hebert SC, Lemmink HH, Deschenes G, Hildebrandt F, Seyberth HW, Guay-Woodford LM, Knoers NV, Antignac C. Novel molecular variants of the Na-K-2Cl cotransporter gene are responsible for antenatal Bartter syndrome. *Am J Hum Genet*. 1998;62(6):1332-1340.
 11. Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, Hamdan JH, DiPietro A, Trachtman H, Sanjad SA, Lifton RP. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK. *Nat Genet*. 1996;14(2):152-156.
 12. Karolyi L, Koch MC, Grzeschik KH, Seyberth HW. The molecular genetic approach to "Bartter's syndrome". *J Mol Med (Berl)*. 1998;76(5):317-325.
 13. Konrad M, Vollmer M, Lemmink HH, van den Heuvel LP, Jeck N, Vargas-Poussou R, Lakings A, Ruf R, Deschenes G, Antignac C, Guay-Woodford L, Knoers NV, Seyberth HW, Feldmann D, Hildebrandt F. Mutations in the chloride channel gene CLCNKB as a cause of classic Bartter syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(8):1449-1459.
 14. Jeck N, Konrad M, Peters M, Weber S, Bonzel KE, Seyberth HW. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, leading to a mixed Bartter-Gitelman phenotype. *Pediatr Res*. 2000;48(6):754-758.

15. Jeck N, Konrad M, Hess M, Seyberth HW. The diuretic- and Bartter-like salt-losing tubulopathies. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15 Suppl 6:19-20.
16. Bartter FC, Pronove P, Gill JR, Jr., Maccardle RC. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. *Am J Med*. 1962;33:811-828.
17. Walsh SB, Unwin E, Vargas-Poussou R, Houillier P, Unwin R. Does hypokalaemia cause nephropathy? An observational study of renal function in patients with Bartter or Gitelman syndrome. *QJM*. 2011;104(11):939-944.
18. Chaudhuri A, Salvatierra O, Jr., Alexander SR, Sarwal MM. Option of pre-emptive nephrectomy and renal transplantation for Bartter's syndrome. *Pediatr Transplant*. 2006;10(2):266-270.
19. Kim JY, Kim GA, Song JH, Lee SW, Han JY, Lee JS, Kim MJ. A case of living-related kidney transplantation in Bartter's syndrome. *Yonsei Med J*. 2000;41(5):662-665.
20. Lee SE, Han KH, Jung YH, Lee HK, Kang HG, Moon KC, Ha IS, Choi Y, Cheong HI. Renal transplantation in a patient with Bartter syndrome and glomerulosclerosis. *Korean J Pediatr*. 2011;54(1):36-39.
21. Hu DC, Burtner C, Hong A, Lobo PI, Okusa MD. Correction of renal hypertension after kidney transplantation from a donor with Gitelman syndrome. *Am J Med Sci*. 2006;331(2):105-109.
22. Dragun D. Humoral responses directed against non-human leukocyte antigens in solid-organ transplantation. *Transplantation*. 2008;86(8):1019-1025.
23. Dragun D, Muller DN, Brasen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelha M, Dechend R, Kintscher U, Rudolph B, Hoebeke J, Eckert D, Mazak I, Plehm R, Schonemann C, Unger T, Budde K, Neumayer HH, Luft FC, Wallukat G. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 2005;352(6):558-569.
24. Roser M, Eibl N, Eisenhaber B, Seringer J, Nagel M, Nagorka S, Luft FC, Frei U, Gollasch M. Gitelman syndrome. *Hypertension*. 2009;53(6):893-897.
25. Lukitsch I, Kehr J, Chaykovska L, Wallukat G, Nieminen-Kelha M, Batuman V, Dragun D, Gollasch M. Renal ischemia and transplantation predispose to vascular constriction mediated by angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies. *Transplantation*. 2012;94(1):8-13.

26. Hercule HC, Schunck WH, Gross V, Seringer J, Leung FP, Weldon SM, da Costa Goncalves A, Huang Y, Luft FC, Gollasch M. Interaction between P450 eicosanoids and nitric oxide in the control of arterial tone in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(1):54-60.
27. Cruz DN, Shaer AJ, Bia MJ, Lifton RP, Simon DB. Gitelman's syndrome revisited: an evaluation of symptoms and health-related quality of life. *Kidney Int.* 2001;59(2):710-717.
28. Nijenhuis T, Vallon V, van der Kemp AW, Loffing J, Hoenderop JG, Bindels RJ. Enhanced passive Ca²⁺ reabsorption and reduced Mg²⁺ channel abundance explains thiazide-induced hypocalciuria and hypomagnesemia. *J Clin Invest.* 2005;115(6):1651-1658.
29. Ji W, Foo JN, O'Roak BJ, Zhao H, Larson MG, Simon DB, Newton-Cheh C, State MW, Levy D, Lifton RP. Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat Genet.* 2008;40(5):592-599.
30. Hiemann NE, Meyer R, Wellnhofer E, Schoenemann C, Heidecke H, Lachmann N, Hetzer R, Dragun D. Non-HLA antibodies targeting vascular receptors enhance alloimmune response and microvasculopathy after heart transplantation. *Transplantation.* 2012;94(9):919-924.
31. Riemekasten G, Philippe A, Nather M, Slowinski T, Muller DN, Heidecke H, Matucci-Cerinic M, Czirjak L, Lukitsch I, Becker M, Kill A, van Laar JM, Catar R, Luft FC, Burmester GR, Hegner B, Dragun D. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2010;70(3):530-536.

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Jasmin Kehr hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Lukitsch I*, Kehr J*, Chaykovska L, Wallukat G, Nieminen-Kelhä M, Batuman V, Dragun D, Gollasch M.

„Renal ischemia and transplantation predispose to vascular constriction mediated by angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies.“

Transplantation 2012;94(1):8-13. * Shared first authorship.

Beitrag im Einzelnen:

Entwurf von Versuchsprotokollen, Präparation von Gefäßen, Isometrische Kontraktionskraftmessungen an Rattenarterien, Auswertung und Interpretation der Daten, Mitarbeit beim Verfassen des Manuskripttextes, Interpretation der Ergebnisse, Literaturrecherchen.

Publikation 2:

Roser M, Eibl N, Eisenhaber B, Seringer J, Nagel M, Nagorka S, Luft FC, Frei U, Gollasch M. Gitelman syndrome. Hypertension 2009 Jun;53(6):893-7

Beitrag im Einzelnen:

Anamnese und Untersuchung der Indexpatienten, Entwurf von Diagnostik- und Therapieplänen, Genetische Datenanalyse, Interpretation der Ergebnisse, Literaturrecherchen.

Publikation 3:

Hercule HC, Schunck WH, Gross V, Seringer J, Leung FP, Weldon SM, da Costa Goncalves ACh, Huang Y, Luft FC, Gollasch M. Interaction between P450 eicosanoids and nitric oxide in the control of arterial tone in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009 Jan;29(1):54-60.

Beitrag im Einzelnen:

Entwurf von Versuchsprotokollen, Präparation von Gefäßen, Durchführung von Versuchen zu biochemischen Komponenten der Endothelfunktion, Auswertung und Interpretation von Daten, Mitarbeit beim Verfassen des Manuskripttextes, Interpretation der Ergebnisse, Literaturrecherchen

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers
Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Maik Gollasch

Unterschrift der Doktorandin
Jasmin Kehr geb. Seringer

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

1. Lukitsch I*, Kehr J*, Chaykovska L, Wallukat G, Nieminen-Kelhä M, Batuman V, Dragun D, Gollasch M.
„Renal ischemia and transplantation predispose to vascular constriction mediated by angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies.“
Transplantation 2012;94(1):8-13. * Shared first authorship.
2. Roser M, Eibl N, Eisenhaber B, Seringer J, Nagel M, Nagorka S, Luft FC, Frei U, Gollasch M. Gitelman syndrome.
Hypertension 2009 Jun;53(6):893-7
3. Hercule HC, Schunck WH, Gross V, Seringer J, Leung FP, Weldon SM, da Costa Goncalves ACh, Huang Y, Luft FC, Gollasch M. Interaction between P450 eicosanoids and nitric oxide in the control of arterial tone in mice.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009 Jan;29(1):54-60.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jasmin Kehr, geb. Seringer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neue Aspekte der Nierenpathophysiologie durch Untersuchung von humanen Angiotensin II Typ I Rezeptor aktivierenden Antikörpern und SLC12A3 Mutationen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind.

Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen Bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Maik Gollasch für die Bereitstellung dieser Arbeit.

Danke für die Unterstützung, Motivation, Diskussionsbereitschaft, Geduld und das Vertrauen dieses Projekt gemeinsam abzuschließen.

Ich möchte dem Team der Arbeitsgruppe Gollasch für Hilfe, Ratschläge und eine nette Arbeitsatmosphäre danken, insbesondere Dr. med. Ivo Lukitsch, Dr. med. Hantz Hercule sowie Dr. med. Mattias Roser. Ich danke Melina Nieminen-Kelhä und Lyubov Chaykovska für die Durchführung der Operationen in den narkotisierten Tieren.

Ganz besonders danke ich Dr. med Ingo Steffen für die ständige Hilfsbereitschaft und die mentale Unterstützung bis zuletzt.

Zum Schluss möchte ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben danken, meiner Familie. Ohne ihre Unterstützung und ihre Liebe wäre diese Arbeit und vieles andere nicht möglich gewesen.

Insbesondere Daniel danke ich für die vielen aufbauenden Worte, Diskussionsbereitschaft und Geduld sowie all die schönen Momente der vergangenen Jahre.

Originalarbeiten

Gitelman syndrome. Hypertension 2009 Jun;53(6):893-7

<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.127993>

Renal ischemia and transplantation predispose to vascular constriction mediated by angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies.

Transplantation 2012;94(1):8-13.

<http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e3182529bb7>

Interaction between P450 eicosanoids and nitric oxide in the control of arterial tone in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009 Jan;29(1):54-60.

<http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.171298>
