

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss endogener und exogener Faktoren  
auf Podozyten und Nierenfunktion

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Langer

aus Parchim

Datum der Promotion: 14.09.2018

## **Inhaltsverzeichnis**

Zusammenfassung .....	1
Abstrakt .....	1
Abstract .....	2
Einführung .....	3
Methodik.....	5
Ergebnisse .....	7
Diskussion .....	10
Literaturverzeichnis .....	15
Eidesstattliche Versicherung .....	A
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	B
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen.....	C
Lebenslauf.....	D
Komplette Publikationsliste.....	E
Danksagung .....	F

# Zusammenfassung

## Abstrakt

**Einleitung:** Humane Podozyten (hPC) stellen hochdifferenzierte Zellen dar, die einen elementaren Bestandteil der renalen Filtrationsbarriere bilden. Ihre intensive Erforschung *in vitro* ist erst seit wenigen Jahren möglich. Schädigungen der hPC durch Diabetes mellitus oder Bluthochdruck (Nephrosklerose) gehen häufig mit einem renalen Funktionsverlust einher. Das orale Biguanid-Antidiabetikum Metformin kann erhöhte Blutglukosespiegel und die Entwicklung einer Albuminurie vermindern.

Angiotensin (Ang) II reguliert den Blutdruck und die intrarenale Hämodynamik. Diese Arbeit untersucht die Modifikation der intrazellulären Expression und Phosphorylierung von AMPK, Akt1 und des *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR) sowie das Zellüberleben von hPC durch Stimulation mit Glukose und Metformin. Darüber hinaus wird die Regulation des Glykoproteins Podoplanin (PDPN) in hPC durch AngII und miR-29b untersucht. Weiterhin wurde in einer *in vivo* Studie die Bedeutung von Testosteron auf die Entwicklung einer progressiven Albuminurie männlicher Tiere im Tiermodell der Munich Wistar Frömter (MWF) Ratte untersucht.

**Methodik:** Ausdifferenzierte hPC wurden verschiedenen Konzentrationen von Glukose und Metformin oder AngII ausgesetzt. Die Transfektion mit small interfering RNA oder miRNA-Mimics erfolgte mittels Lipofectamine®2000.

Proteinexpression und Phosphorylierungsgrad wurden durch Western Blots bestimmt. Zellapoptose und Zellviabilität wurden über funktionelle Assays erfasst.

Männliche MWF-Ratten wurden in der zehnten Woche orchiektomiert. Die einzelnen Gruppen wurden scheinoperiert, mit Testosteron oder Testosteron plus Flutamid behandelt. Als Kontrolle dienten Wistar-Ratten. Bestimmt wurden der Testosteron Gehalt im Blut und die Albuminausscheidung im Urin ( $U_{Alb}$ ).

**Ergebnisse:** Metformin hemmt die Phosphorylierung von AMPK und induziert die mTOR-Phosphorylierung. Unter Hochglukosebedingungen (HG)-Bedingungen regt Metformin die zelluläre Produktion von AMPK und Akt1 an, reduziert jedoch die zelluläre mTOR-Expression. Damit erhöht es das Zellüberleben unter HG signifikant.

AngII induziert eine erhöhte miR-29b-Expression und reduziert die PDPN-mRNA und -Proteinexpression. Proapoptotische Effekte wie die Cytosol-C-Verteilung und die Caspase3-Aktivierung waren verstärkt.

Die erhöhte  $U_{Alb}$  bei MWF konnte durch durch Orchiectomie signifikant reduziert werden. Eine gleichzeitige Behandlung mit Testosteron plus Flutamid bewirkte bei MWF-Tieren eine weitere, signifikante Absenkung der  $U_{Alb}$ .

**Schlussfolgerung:** Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Metformin direkt auf hPC wirken und unabhängig von einer systemischen Absenkung des Blutzuckerspiegels proapoptotischen Effekte unter HG abschwächen sowie das Zellüberleben verbessern kann. Die zelluläre Integrität von hPC wird durch AngII beeinflusst. Über miRNA-29b wird die PDPN-Expression reguliert. PDPN ist für den Funktionserhalt, Stresstoleranz und Überleben der hPC relevant.

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass Testosteron in die pathologische Albuminurieentwicklung bei männlichen Ratten involviert ist. Um aus diesen Studien mögliche renoprotektive Maßnahmen für die Klinik abzuleiten, sind weiterführende Arbeiten nötig.

## **Abstract**

**Introduction:** Human podocytes (hPC) are highly differentiated cells and representing an important part of the renal filtration barrier. Methods to study hPC in *in vitro* were only recently established. Damage to hPCs due to diabetes mellitus or hypertension frequently leads to renal impairment. The oral biguanid Metformin can reduce blood glucose levels and prevent the development of albuminuria.

Angiotensin (Ang) II regulates blood pressure and intrarenal hemodynamic. This work examines the modification of expression and phosphorylation of AMPK, Akt1 and mTOR as well as the cell survival of hPC after stimulation with glucose and Metformin.

Furthermore, the regulation of glycoprotein podoplanin (PDPN) in hPC through Ang II and miR-29b is examined. Additionally, an *in vivo* study investigated the effect of testosterone on the development of progressive albuminuria in male Munich Wistar Frömter (MWF) rats.

**Methods:** Differentiated hPC were exposed to various concentrations of glucose and Metformin or AngII. The transfection with small interfering RNA or miRNA-mimics was done with Lipofectamine®2000.

Protein expression and phosphorylation were determined with Western blots. Cell apoptosis and viability were measured with functional assays.

Male MWF rats were orchietomized at ten weeks of age. MWF were sham operated or treated with either testosterone or testosterone plus flutamid. Wistar rats were used as controls. Testosterone serum levels and urinary albumin excretion ( $U_{Alb}$ ) were measured.

**Results:** Metformin inhibits AMPK phosphorylation and induces mTOR phosphorylation. Under high glucose conditions (HG) metformin stimulates cellular production of AMPK and Akt1 but reduces cellular mTOR expression. This significantly increases cell survival under HG. AngII induces miR-29b expression and reduces cellular mRNA and protein expression of PDPN. Proapoptotic effects such as Cytosol-C distribution and Caspase3 activation were elevated. Testosterone serum concentrations and increased albuminuria in male MWF was significantly reduced by orchietomy. Concomitant treatment with testosterone plus lead to a further significant decrease of  $U_{Alb}$  in MWF.

**Conclusion:** Metformin affects hPC directly. Metformin reduces apoptosis under HG and increases cell survival independently from systemic blood sugar reduction.

Cellular integrity of hPC is influenced by AngII. PDPN expression is regulated through miRNA-29b. PDPN is of relevance for function, stress tolerance and survival of hPC.

Furthermore, testosterone is involved in the development of increased albuminuria in male rats. To generate future renoprotective applications from these studies for clinical use, further investigation is required.

## Einführung

Der Verlust der Nierenfunktion stellt eine der gravierendsten Langzeitfolgen verschiedener Systemerkrankungen dar. Im Jahr 2005 litten laut Frei und Schober-Halstenberg 35% aller Dialysepatienten in Deutschland an Diabetes mellitus (Typ 1 und 2) und weitere 23% an vaskulärer Nephropathie hervorgerufen durch Bluthochdruck [1]. Diabetes und Bluthochdruck sind damit für mehr als die Hälfte aller dialysepflichtigen Nierenschäden verantwortlich. Können harnpflichtige Substanzen nicht mehr ausgeschieden oder essentielle Moleküle nicht mehr rückresorbiert werden, kann eine zusätzliche Verschlechterung des durch die chronische Grunderkrankung bereits reduzierten Allgemeinzustands resultieren. Die Behandlung weiterer Erkrankungen wird durch die eingeschränkte Anwendbarkeit renal eliminerter Medikamente additiv erschwert. Daher ist ein verbessertes Verständnis der zum Nierenversagen führenden pathophysiologischen Mechanismen sowie möglicher protektiver Maßnahmen erstrebenswert.

Die renale Filtrationsbarriere besteht aus Endothelzellen, Basalmembran und Podozyten. Die hochdifferenzierten humanen Podozyten (hPC) sind teilungsunfähig. Sterben sie ab oder verlieren sie den Kontakt zur Basalmembran, werden sie mit dem Urin ausgeschieden und können nicht ersetzt werden [2]. Seit 2002 stehen immortalisierte hPC zur Verfügung, welche die Podozytenmarker Nephrin und Podocin exprimieren [3]. Damit wurden umfangreiche *in vitro* Versuche ermöglicht.

Zwar gingen Wolf und Ziyadeh 1999 noch davon aus, dass Pathologien der Mesangialzellen ursächlich für die diabetische Nephropathie (DN) wären [4], doch hielten sie 2007 eine Podozytenschädigung für hauptverantwortlich für die mit DN einhergehende Albuminurie [5]. Eid *et al.* zeigten 2010, dass Glukose die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) inaktiviert und eine erhöhte Apoptoserate bei Mauspodozyten hervorruft [6].

Metformin reduziert den Blutzuckerspiegel sowie das Körpergewicht und wird auf Grund seiner Wirksamkeit, prognostischen Bedeutung und geringen Hypoglykämierate als Erstlinientherapie bei Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt [7, 8, 9]. Aus klinischen Studien ist bekannt, dass Metformin eine bestehende Albuminurie zu reduzieren vermag [10]. Zudem wird die antiproliferative Wirkung von Metformin, die möglicherweise durch Interaktion mit dem *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR) vermittelt wird, in der Krebsforschung untersucht [11, 12]. Ziel der Studie 1 [13] war es daher, die intrazellulären Wirkungen von Metformin in hPC unter NG und HG näher zu untersuchen und ihren Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der hPC zu dokumentieren.

AngII bedingt durch Blutgefäßkontraktion einem erhöhten Blutdruck, welcher systemisch zur Entstehung einer Nephrosklerose beitragen kann [14]. Allerdings entwickeln Ratten mit erhöhtem AngII-Spiegel auch bei medikamentös normalisiertem Blutdruck eine schwere Albuminurie [15]. Durch Behandlung mit dem Catecholamin-O-Methyltransferase-Hemmstoff Entacapone werden die AngII abhängigen Nierenschäden blutdruckunabhängig reduziert [16]. Das membranständige Glykoprotein Podoplanin (PDPN) ist mit der Integrität der Fußfortsätze der Podozyten assoziiert [17]. Eine Reduktion der Pdpn-Expression geht im Tiermodell zudem mit der Entstehung einer Albuminurie einher [18, 19]. Ein potenzieller Weg, wie AngII die PDPN-Expression in den hPC beeinflussen kann, stellen micro-(mi)RNA-vermittelte Prozesse dar. Zusammen mit alternativem Spleißen tragen sie zur Steuerung der Expression verschiedener Proteine auf posttranskriptioneller Ebene bei [20] und werden auch als neuartige potentielle Therapieansatzpunkte in der Nephrologie diskutiert [21]. So wurde festgestellt, dass

miRNA-29b, welche sich vermehrt im Zellkern anreichert, Nierenfibrose vermindert und das Überleben verschiedener Zelltypen reduziert, weswegen Tumorerkrankungen mit herabregulierter miRNA-29b eine schlechtere Prognose aufwiesen [22]. Wegen der nephroprotektiven Effekte und der Beeinflussung der Zellviabilität erschien miRNA-29b als ein geeigneter Kandidat für die Fragestellung der Studie 2 [23], ob und über welchen Signalweg AngII Einfluss auf die PDPN-Expression und die Zellviabilität hat.

Testosteron erhöht bei salzsensitiven Dahl-Ratten den Blutdruck und die intrarenale Angiotensinogen-Konzentration [24]. Zudem ist bekannt, dass männliche Patienten eine raschere Progression bei bekanntem Nierenschaden nicht-diabetischer Genese aufweisen [25]. Einen sexuellen Dimorphismus bei der Entwicklung der Albuminurie weisen auch Munich-Wistar-Frömter (MWF)-Ratten auf [69]. Studie 3 [26] hat daher die Zielstellung, die Auswirkungen von Orchiectomie (Ox), Testosteron (T) und dem Androgen-Rezeptor-Antagonisten Flutamid (F) auf die Entwicklung einer Albuminurie bei der MWF-Ratte zu verifizieren.

## **Methodik**

Die ausführliche Methodik findet sich in den Publikationen [13, 23, 26] erklärt.

### **Studien 1 und 2**

#### Zellkulturen

Immortalisierte undifferenzierte hPC (von Dr. Moin Saleem, Academic and Children's Renal University of Bristol, Bristol, UK, zur Verfügung gestellt) wurden in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-Medium, mit 10% fetalem Rinderserum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin und mit einer Einheit (1x) Insulin-Transferrin-Selen, in einem Inkubator bei 95% Luftfeuchte, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 33°C kultiviert. Die Differenzierung der Zellen zu reifen hPC erfolgte durch Inkubation der Zellen für 14 Tage bei einer Temperatur von 37°C. Die Ausdifferenzierung der Zellen zu reifen hPC wurde vorab über eine Expressionsanalyse typischer Markerproteine, wie Podocin und Synaptopodin bestätigt [27].

Vor der Durchführung der Stimulationsversuche wurden die Zellen für 24 h in FBS-freiem Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) unter Zugabe von 5,5 mM Glukose und 1% Penicillin/Streptomycin vorinkubiert. Für die Experimente in Studie 1 wurden die Zellen anschließend für 1 h mit Metformin (2 µM, 15 µM oder 1000 µM) vorbehandelt

bzw. direkt mit 30 mM Glukose (Hochglukose-Bedingung, HG) oder 24,5 mM Mannose und 5,5 mM Glukose (Normalglukose-Bedingung, NG, als Kontrolle bei gleicher Osmolarität) inkubiert. Die Analyse der Proteinphosphorylierung wurde nach 2 h durchgeführt. Funktionelle Untersuchungen zur Zellapoptose und Zellviabilität sowie die Charakterisierung der Expression auf Protein- und mRNA-Ebene erfolgten nach 24 h. Für die Versuche in Studie 2 wurde zunächst eine optimale Konzentration für die Stimulation der hPC mit Angiotensin II (AngII) bestimmt. Von den getesteten Konzentrationen (0 pM, 10 pM, 100 pM, 10 nM, 1 µM) führte 1 µM AngII zu optimalen Ergebnissen und diente daher für die weiteren Experimente als Versuchskonzentration. Die Inkubationszeit betrug 24 h oder 48 h. Die Zellen wurden jeweils mit 200 nM small interfering RNA (siRNA) transfiziert. Dabei kamen PDPN-spezifische siRNAs (siPDPN) oder Nonsens-siRNA zur Kontrolle (siControl) bzw. 200 nM miRNA-Mimics für hsa-miR-29b (miR-29b) und hsa-miR-497 (miR-497) und Kontroll-nonsens-miRNAs (miRControl) zum Einsatz. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofectamine®2000. Die Transfektionseffizienz in hPC betrug 25%.

### Western Blot-Analysen

Für die Analyse der Proteinexpression wurden die Zellproben mit Radioimmunopräzipitations-Puffer (mit 1% Protease-Inhibitor und 1% Phosphatase-Inhibitor) versetzt und anschließend homogenisiert. Jeweils 25 µg Protein wurden anschließend mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und auf eine Polyvinylidene Difluoride-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Die Bestimmung der Proteinexpression erfolgte unter Verwendung entsprechender Antikörper gegen PDPN, AMPK, AKT, mTOR, Nephren und GAPDH sowie mittels geeigneter Horseradischperoxidase-konjugierter Sekundärantikörper. Die Chemilumineszenzmessung erfolgte in der Fusion FX7 Analysekamera, die Quantifizierung im Vergleich zur GAPDH-Expression via Gel-Pro Analyzer Software, Version 4.0.00.001.

### **Studie 3 Der Einfluss Testosterons auf die Nierenschädigung bei MWF-Ratten**

Die Rattenstämme Munich Wistar Frömter (MWF/Rkb) und Wistar sind in der AG Prof. Dr. Reinhold Kreutz an der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité-Universitätsmedizin Berlin etabliert und werden gemäß den Vorschriften des



Tierschutzgesetzes und nach Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin für tierexperimentelle Arbeiten verwendet.

Die männlichen Tiere der beiden Stämme wurden im Alter von 10 Wochen entweder scheinoperiert (Sham-Gruppe), orchiektomiert (Ox-Gruppe), orchiektomiert und intraperitoneal mittels Pelletimplantation testosteronsubstituiert (OxT-Gruppe) oder orchiektomiert und intraperitoneal testosteronsubstituiert sowie mit dem Androgenrezeptorantagonisten Flutamid mittels subkutaner Injektion behandelt (OxTF-Gruppe). Anschließend wurden in der 12., 14., 16. und 18. Woche das Testosteronlevel im Blut und die Albuminausscheidung im Urin ( $U_{Alb}$ ) gemessen.

Abschließend wurden die Tiere in Narkose getötet, die Nieren präpariert und der renale Glomeruloskleroseindex (GSI) und Tubulointerstitielle Schädigungsindex (TDI) histologisch ermittelt. Die molekularen Marker für Tubulusschäden Kidney Injury Molecule 1 (Kim1) [28] und Renal Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (Ngal) sowie die Albuminurie-assoziierte Monoacylglycerol O-Acyltransferase 1 (Mogat1) wurden bestimmt, ebenso die Superoxid-Anion Produktion in der Niere.

## **Ergebnisse**

### **Studie 1 Die protektiven Effekte Metformins auf humane Podozyten**

Zur Aufnahme des hydrophilen Metformins in humane Zellen ist der Organic Cation Transporter 1 (Oct1) hauptverantwortlich [29]. In den hPC konnte die Expression von Oct1 auf mRNA- und auf Proteinebene unter NG- und HG-Bedingungen nachgewiesen werden. Die Oct1-Expression wurde durch die Stimulation der Zellen mit 30 mM D-Glukose nicht signifikant verändert.

Die Behandlung der hPC für 2 h mit 30 mM D-Glukose reduzierte die Phosphorylierung von AMPK signifikant im Vergleich zu Zellen der Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ). Eine Vorbehandlung der Zellen mit 15  $\mu$ M und 1000  $\mu$ M Metformin führte zu einer signifikanten Erhöhung der AMPK-Phosphorylierung unter normalen wie auch unter HG-Bedingungen ( $p < 0,01$ ).

Unter HG-Bedingungen stieg der Phosphorylierungsgrad von mTOR gegenüber der Kontrollgruppe signifikant an ( $p < 0,0001$ ). Eine Vorbehandlung mit Metformin senkte abhängig von der Metforminkonzentration die mTOR-Phosphorylierung unter beiden Glukosekonzentrationen signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die beschriebenen Effekte wurden nach 2 h gemessen und nachgewiesen. Die reduzierte mTOR-Phosphorylierung konnte nach 24 h nur bei höchster Metformindosis und HG-Bedingungen weiterhin nachgewiesen werden ( $p < 0,01$ ).

Unter NG hatte die Behandlung mit Metformin keinen Einfluss auf Zelloptose oder die Zellviabilität. Unter HG lag nach 24 h eine erhöhte Apoptoserate und eine verminderte Zellviabilität vor. Die erhöhte Apoptoserate war bei Vorbehandlung mit Metformin (2  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$ ) signifikant und dosisabhängig reduziert ( $p < 0,05$  und  $p < 0,0001$ ), jedoch immer noch gesteigert gegenüber der Apoptoserate bei NG. Die verminderte Zellviabilität blieb bei Vorbehandlung mit 2  $\mu\text{M}$  Metformin unverändert, stieg bei 1000  $\mu\text{M}$  jedoch so weit an, dass kein signifikanter Unterschied zwischen NG versus HG + 1000  $\mu\text{M}$  Metformin festgestellt wurde.

Die Proteinexpression von AMPK, mTOR und Akt unter NG blieb von den untersuchten Metforminkonzentrationen (2  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$ ) unbeeinflusst.

Unter HG bewirkten jedoch die Metforminkonzentrationen 15  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  einen signifikanten und dosisabhängigen Anstieg der Expression von AMPK ( $p < 0,0001$  bei 1000  $\mu\text{M}$ ) und Akt ( $p < 0,0001$  bei 1000  $\mu\text{M}$ ). Die mTOR-Expression nahm unter HG bei 15  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  signifikant ab ( $p < 0,01$ ).

Die Nephrexpression in den hPC war bei HG-Bedingungen signifikant vermindert ( $p < 0,01$ ). Diese Verminderung blieb von der Vorbehandlung mit Metformin (2  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$ ) unbeeinflusst.

## **Studie 2 Der Einfluss Angiotensins auf humane Podozyten**

Die Stimulation von hPC mit 1  $\mu\text{M}$  AngII führte zu einem signifikanten Anstieg der miR-29b-Expression nach 48 h ( $p < 0,01$ ). In Bezug auf miR-497 bildete sich lediglich ein Anstiegstrend ab. Die mRNA-Expression von PDPN war nach AngII-Inkubation signifikant gesenkt ( $p < 0,001$ ), ebenso die PDPN-Proteinexpression ( $p < 0,05$ ).

Die mRNA-Expression von Podocin, Synaptopodin und PDPN sowie die Proteinexpression des AT1-Rezeptors (als Interaktionsort für AngII) konnte in den hPC nachgewiesen werden. Abhängig von der Höhe der AngII-Konzentration fand eine Erhöhung der miR-29b-Expression ( $p < 0,05$  bei 100 pM AngII) sowie eine signifikante

Reduktion der PDPN-mRNA-Expression bei Konzentrationen ab 10 nM AngII statt ( $p < 0,01$ ).

Die Inkubation hPCs mit AngII führte zu einer Verschiebung des Cytochrom C-Gleichgewichts zwischen Zytosol und Mitochondrien zu Gunsten des Zytosols. Dieser proapoptotische Effekt [30] fiel signifikant stärker aus, wenn die hPC zudem mit siRNA gegen PDPN behandelt wurden. Als Kontrolle dienten funktionslose Nonsense-siRNAs. Analog dazu verhielt sich die Caspase3-Aktivierung. Die Behandlung mit siPDPN ohne AngII blieb ohne Auswirkungen auf proapoptotische Effekte.

Die Zellviabilität verhielt sich gegensätzlich zu den proapoptotischen Effekten. In AngII-stimulierten hPC reduzierte die Behandlung mit siPDPN die Zellviabilität signifikant ( $p < 0,05$ , Nachweis durch Calceinecetoxyethyl-Färbung), ebenso verminderte siPDPN die Akt-Phosphorylierung signifikant ( $p < 0,01$ ).

Um die posttranskriptionale Steuerung von PDPN näher zu untersuchen, wurden zunächst *in silico*-Analysen durchgeführt. Dabei wurden miR-29b und miR-497 aufgrund perfekter Basenpaarung in der sogenannten „seed region“ gegenüber der PDPN-mRNA als Kandidaten-miRNAs identifiziert, welche potentiell die PDPN-Expression posttranskriptionell steuern können. Zudem weist miR-29b eine zentrale Aufwölbung auf, die ebenfalls eine Voraussetzung für eine adäquate miRNA-mRNA-Interaktion darstellt [31]. Die Inkubation der hPC mit miR-29b ließ die PDPN-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene signifikant absinken ( $p < 0,01$  bei 10 nM AngII). Im Gegensatz dazu hatte die Inkubation mit miR-497 keinen signifikanten Effekt auf die PDPN-Bildung.

### **Studie 3 Der Einfluss Testosterons auf die Nierenschädigung von MWF-Ratten**

MWF-Männchen hatten ein signifikant geringeres Körpergewicht als Wistar-Männchen ( $p < 0,0005$ ). Dieser durchschnittliche Gewichtsunterschied blieb von sämtlichen Eingriffen unbeeinflusst. Ein vergrößertes Linksherzgewicht zu Körpergewicht-Verhältnis als Anzeichen einer chronischen Linksherzbelastung konnte bei MWF-Männchen im Vergleich zu Wistar-Männchen signifikant nachgewiesen werden ( $p < 0,03$ ).

Während zwischen den behandelten MWF und Wistar-Männchen kein signifikanter Unterschied im Testosteronlevel festgestellt werden konnte, wiesen MWF-Sham-Tiere eine signifikant höhere  $U_{A1b}$  als Wistar-Sham-Tiere ( $p < 0,04$ ) auf. Bei beiden Stämmen sanken der Testosteronspiegel im Blut als auch die  $U_{A1b}$  signifikant durch Orchiektomie ( $p < 0,0001$  und  $p < 0,04$ ).

Die Behandlung mit OxTF ließ bei beiden Stämmen das Testosteronlevel signifikant gegenüber der Sham-Kontrollgruppe ansteigen (Wistar:  $p < 0,05$  und MWF:  $p < 0,02$ ). Die  $U_{Alb}$  der OxTF Wistar-Gruppe blieb unverändert, die  $U_{Alb}$  der OxTF MWF-Gruppe war im Vergleich zur MWF-Sham ( $p < 0,04$ ) und MWF-Ox-Gruppe ( $p < 0,04$ ) signifikant reduziert, blieb jedoch gegenüber der Wistar-OxTF-Gruppe signifikant erhöht ( $p < 0,0001$ ).

## **Diskussion**

### **Studie 1 Die protektiven Effekte Metformins auf humane Podozyten**

Podozyten stellen ein relevantes Bindeglied zwischen Hypertonie, Diabetes mellitus und Nierenfunktionsstörungen wie Albuminurie dar. Der Strukturverlust ihrer Fußfortsätze geht der Entwicklung der Albuminurie im Tiermodell voran [32].

Die Podozytopathie im diabetischen Stoffwechsellumfeld wird unter anderem durch einen hohen Glukosespiegel und die erhöhte Konzentration von AngII hervorgerufen [33]. Damit das Biguanid Metformin einen direkten protektiven Effekt in hPC induzieren kann, muss es über Transportproteine, beispielsweise Oct1 aufgenommen werden [34]. In der vorliegenden Dissertation konnte erstmals die Expression von Oct1 in hPC nachgewiesen werden. Bisher wurde die Bildung zwar in der humanen Niere [35], nicht aber spezifisch in definierten renalen Zelltypen beschrieben.

Piwkowska *et al.* demonstrierten *in vitro*, dass Metformin die NAD(P)H-Oxidase hemmt und somit die Bildung freier Sauerstoffradikale in Podozyten der Maus vermindert. Sie zeigten zudem eine mögliche Verbindung von gehemmter NAD(P)H-Oxidase und AMPK-Phosphorylierung auf [36]. Kim *et al.* konnten durch Metformingabe an spontan-diabetischen Torii-Ratten die Progression der DN in Bezug auf Albuminurie und Glomerulosklerose vermindern [37]. Da die Gabe von Metformin aber auch den Blutzuckerspiegel signifikant senkte, kann von dieser Studie kein Rückschluss auf eine direkte Interaktion zwischen Metformin und spezifischen Nierenzellen geschlossen werden. In dieser Dissertation konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Metformin einer reduzierten AMPK-Phosphorylierung in hPC konzentrationsabhängig sowohl unter HG als auch unter NG entgegenwirkt.

Die Gesamtmenge von mTOR ist bei gesunden und insulinresistenten Mäusen konstant, während der Phosphorylierungsgrad variiert. Katta *et al.* demonstrierten, dass sich der Phosphorylierungsgrad in Muskelzellen durch körperliche Aktivität erhöhen lässt [38] und damit das Zellüberleben positiv beeinflusst. Die Phosphorylierung von mTOR durch

Metformin schützt Tubuluszellen vor hypoxischen Schäden [39]. Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass die mTOR-Deaktivierung durch Phosphorylierung unter HG-Bedingungen auch in hPC stattfindet und durch Metformin signifikant reduziert wird.

HG kann über den Transkriptionsfaktor für Kappa-Leichtketten (NF- $\kappa$ B) Apoptose in Podozyten hervorrufen [40]. Die vorliegende Dissertation belegt, dass der Glukose-induzierte Apoptosevorgang in hPC durch Metformin dosisabhängig vermindert werden kann. Eine dosisabhängige Wirkung des Metformins beschrieben auch schon Yeh *et al.* *in vitro* in Kardiomyozyten der Maus [41]. Eine Erhöhung der Apoptose geht mit reduzierter Zellviabilität einher. Eine erhöhte Zellviabilität kann durch Aktivierung von Proteinkinase B (Akt1) und AMPK erreicht werden [42]. Die Studie zeigt, dass die vermehrte Expression von Akt1, die verstärkte Phosphorylierung der AMPK und die verringerte Phosphorylierung von mTOR in hPC in Abhängigkeit von der Metformindosis signifikant beeinflusst wird.

*In vivo* wurde an insulinresistenten Mäusen ein erhöhtes Podozytenüberleben unter Metformingabe festgestellt [37]. Die nachgewiesene erhöhte Expression von AMPK und Akt1 auf Proteinebene stellt eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung dar.

Eine reduzierte Nephrinexpression, wie sie unter HG-Bedingungen auftritt [43], ist mit Podozytenverlust und Albuminurie assoziiert [32, 44]. Die durchgeführten Experimente demonstrierten, dass HG zu einer signifikanten Verringerung der Nephrinexpression in hPC führte. Dies wurde durch ähnliche Versuche einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt, die belegten, dass dieser Effekt von HG auf die Bildung von Nephrin ebenso in Mauspodozyten zu beobachten ist [44]. Tzeng *et al.* konnten *in vivo* in Glomeruli der Ratte nachweisen, dass Metformin diesen Effekt signifikant abschwächen kann [45]. *In vitro* konnte dieser Effekt für hPC nicht bestätigt werden. Dies könnte am Versuchsaufbau oder an den untersuchten Spezies liegen. Es kann aber auch sein, dass Metformin die Nephrinproduktion nicht durch direkte Mechanismen in den Podozyten erhöht, sondern die systemische Reduktion des Blutzuckerspiegels unter Metformingabe hierfür ursächlich ist.

Wie weit die nachgewiesene antiapoptotische Wirkung von Metformin auf hPC und damit auf die Erhaltung der Nierenfunktion bei Diabetes mellitus relevant ist, ließe sich in weiterführenden Versuchen *in vivo* oder durch die Auswertung entsprechender Patientendaten eruieren.

## Studie 2 Der Einfluss Angiotensins auf humane Podozyten

Die Auswirkungen von AngII auf die Nierenfunktion werden zumeist mit der Vasokonstriktion der postglomerulären Arteriolen [46] und der damit einhergehenden gesteigerten Ultrafiltration erklärt [47]. Zudem kann AngII die zytosolische Kalziumkonzentration in hPC steigern [48]. Die Stimulierung von hPC mit AngII vermindert *in vitro* die Expression von PDPN auf mRNA- und Proteinebene. Die Herabregulation dieses Membranproteins, welches für die Integrität der Fußfortsätze relevant ist, erfolgte unabhängig vom Blutfluss [49]. Ein solcher Integritätsverlust könnte in der Folge *in vivo* zur Ausbildung einer zu Albuminurie führen, welche (Früh-)Symptom und Ursache chronischer Nierenerkrankungen sein kann [16, 49, 50, 51, 52]. Aus der Literatur geht hervor, dass AngII in einem engen Zusammenhang mit weiteren pathophysiologischen Prozessen chronischer Nierenerkrankungen steht. Über den Transforming Growth Factor  $\beta$  und NF- $\kappa$ B beeinflusst es die Proteinurie [53], Entzündungsvorgänge [54] und das Zellüberleben [55] im Mausmodell.

Während AngII die immunmodellierende [20, 56] miRNA-29b induziert, bleibt die Expression von miR-497 von AngII unbeeinflusst. Andere Studien bestätigen die Fähigkeit von AngII, spezifische miRNAs wie miR-224, miR-129-3p, miR-132, und miR-212 [57] zu induzieren. Dabei blieben andere, ebenfalls in fibrotische Prozesse involvierte miRNAs wie miR-21 unbeeinflusst [58]. Für diese Selektivität scheint der AT1-Rezeptor relevant zu sein [57]. Die spezifischen Auswirkungen von AngII auf die miRNA- und damit Gen- und Protein-Expression in spezialisierten Zellen könnte eine Erklärung für Pathomechanismen sein. So konnte Breiteneders These [49], dass der Verlust der Integrität der Fußfortsätze der Podozyten auf die reduzierte PDPN-Expression zurückgeht, bestätigt werden, da AngII diesen Vorgang induzierte. Dieser Zellstrukturverlust wiederum kann beschriebenermaßen zu Albuminurie, Podozytenverlust und Nierenversagen führen [50].

Die durchgeführten Experimente zeigten erstmals, dass die Reduktion der PDPN-Expression mit einem Anstieg der Apoptose und einem Abfall der Zellviabilität einhergeht, wenn hPC erhöhten Konzentrationen von AngII ausgesetzt sind. Diese erhöhte Anfälligkeit für Stressoren bei reduzierter PDPN-Expression ist aus der Tumorforschung bereits bekannt [59].

Eine reduzierte PDPN-Expression korreliert mit reduzierter Akt-Phosphorylierung. Ein derartiger Zusammenhang ist aus der Tumorforschung bekannt [60], in der PDPN zuweilen als Marker für das Patientenüberleben verwendet wird, da auch Tumorzellen

abhängig von der Akt-Phosphorylierung ein erhöhtes Zellüberleben aufzeigen. Die erhöhte Cytochrom C-Konzentration im Zytosol und die Caspase3-Aktivierung, welche nach der Herabregulation von PDPN mittels siPDPN zu beobachten war, repräsentieren die antiapoptotische Wirkung von PDPN. Die Verbindung von PDPN mit der Motilität verschiedener menschlicher Zellen wurde bereits mehrfach demonstriert [61, 62, 63]. Nachdem erstmals die Verbindung von AngII und PDPN in hPC nachgewiesen wurde, wären weitergehende *in vivo*-Versuche mit AngII-Infusion anzustreben.

Die Verbindung von miRNA und Nierenschäden ist in jüngster Zeit vermehrt untersucht worden [64, 65, 66]. Gerade die Krebsforschung versucht, durch eine mögliche Reduktion der PDPN-Expression [67, 68] das Ansprechen auf Chemotherapeutika [59] zu erhöhen. Die Ergebnisse zur miR-29b könnten zukünftig im Rahmen eines potentiellen therapeutischen Ansatzes dazu beitragen, bestimmte Nierenschädigungen des humanen Patienten besser zu therapieren.

### **Studie 3 Der Einfluss Testosterons auf die Nierenschädigung von MWF-Ratten**

2008 beschrieben Schulz *et al.* [69] die geschlechtsabhängige Ausbildung der Albuminurie bei MWF-Ratten in der Arbeitsgruppe Prof. R. Kreutz. Die hier vorliegende Studie zeigt auf, dass die Albuminurie der männlichen MWF-Ratten durch Testosteron induziert wird und durch Orchiectomie signifikant reduziert werden kann. Durch zusätzliche Flutamidgabe reduzierte sich die Albuminurie gegenüber der bloßen Orchiectomie weiter. Eine Erklärung hierfür bietet das extragonadal in den Nebennieren [70] produzierte Testosteron, dessen Produktion von der Orchiectomie unbeeinflusst blieb.

Zwischen MWF- und Wistar-Tieren ließ sich kein signifikanter Unterschied der gleichbehandelten Gruppen in Bezug auf GSI und TDI nachweisen. Die leichten Glomerulosklerose- und Tubulusschäden der MWF-Männchen sind vermutlich, wie bei Wistar-Männchen [71], albuminurieunabhängig und am ehesten altersbedingt zu interpretieren. Interessant ist, dass die OxTF dennoch zu einem Abfall der Werte bei beiden Stämmen führte. Dies könnte auf eine albuminurieunabhängige Verbindung zwischen Androgenen und Schädigungen der Glomeruli und Tubuli hinweisen, beispielsweise über testosteroninduzierte Ang II-Ausschüttung, wie von Pingili *et al.* bei orchiectomierten Mäusen vorgeführt [72].

Der gegenüber den Wistar-Tieren signifikant ( $p < 0,04$ ) erhöhte oxidative Stress in den Nieren sämtlicher MWF-Gruppen blieb von den verschiedenen Interventionen

unbeeinflusst. Vermutlich gibt es in MWF-Ratten weitere Pathomechanismen, die unabhängig von Testosteron die Bildung von Superoxidanionen hervorrufen. Dies ist im Einklang mit der vermuteten polygenetischen und multifaktoriellen Pathogenese der Albuminurie bei MWF [73, 74, 75]. In der vorliegenden Arbeit konnte Testosteron als eine Ursache der geschlechtsabhängigen Albuminurie bestätigt werden. In weiterführenden Studien könnte der Zusammenhang des Einflusses von Testosteron auf die Albuminurie-Entwicklung weiter analysiert und zugrundeliegende genetische Faktoren und Mechanismen ermittelt werden.



## Literaturverzeichnis

- 1 Frei U, Schober-Halstenberg HJ. Nierenersatztherapie in Deutschland. Bundesverband Niere, Jahresberichte 1995 bis 2005/2006, Berlin 2006, Deutschland. [http://www.bundesverband-niere.de/fileadmin/user\\_upload/QuaSi-Niere-Bericht\\_2005-2006.pdf](http://www.bundesverband-niere.de/fileadmin/user_upload/QuaSi-Niere-Bericht_2005-2006.pdf). (abgerufen am 22.12.2016)
- 2 Braun F, Becker JU, Brinkkoetter PT. Live or Let Die: Is There any Cell Death in Podocytes? *Semin Nephrol* 2016;36:208-219.
- 3 Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, Xing CY, Ni L, Mathieson PW, Mundel P. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:630-638.
- 4 Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 1999;56:393-405.
- 5 Wolf G, Ziyadeh FN. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol* 2007;106:26-31.
- 6 Eid AA, Ford BM, Block K, Kasinath BS, Gorin Y, Ghosh-Choudhury G, Barnes JL, Abboud HE. AMP-activated protein kinase (AMPK) negatively regulates Nox4-dependent activation of p53 and epithelial cell apoptosis in diabetes. *J Biol Chem* 2010;285:37503–37512.
- 7 Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Langfassung, 1. Auflage. Version 4. 2013, zuletzt geändert: November 2014. [www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de](http://www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de). (abgerufen am 22.12.2016); DOI: 10.6101/AZQ/000213
- 8 King P, Peacock I, and Donnelly R. The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48: 643–648.
- 9 Hung SC, Chang YK, Liu JS, Kuo KL, Chen YH, Hsu CC, Tarn DC. Metformin use and mortality in patients with advanced chronic kidney disease: national, retrospective, observational, cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015;3:605-614.
- 10 Amador-Licona N, Guízar-Mendoza J, Vargas E, Sánchez-Camargo G, Zamora-Mata L. The short-term effect of a switch from glibenclamide to metformin on blood pressure and microalbuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 2000;31:571-575.
- 11 Ling S, Song L, Fan N, Feng T, Liu L, Yang X, Wang M, Li Y, Tian Y, Zhao F, Liu Y, Huang Q, Hou Z, Xu F, Shi L, Li Y. Combination of metformin and sorafenib suppresses proliferation and induces autophagy of hepatocellular carcinoma via targeting the mTOR pathway. *Int J Oncol*. 2017;50:297-309.
- 12 Thent ZC, Zaidun NH, Azmi F, Senin MI, Haslan H, Salehuddin AR. Is metformin a therapeutic paradigm for colorectal cancer: Insight into the molecular pathway? *Curr Drug Targets* 2016 Dec 5. [Epub ahead of print]

- 13 Langer S, Kreutz R, Eisenreich A. Metformin modulates apoptosis and cell signaling of human podocytes under high glucose conditions. *J Nephrol* 2016;29:765-773.
- 14 Wenzel UO, Bode M, Köhl J, Ehmke H. A pathogenic role of complement in arterial hypertension and hypertensive end organ damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2017;312:349-354.
- 15 Mervaala E, Müller DN, Schmidt F, Park JK, Gross V, Bader M, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC. Blood pressure-independent effects in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 2000;35:587-594.
- 16 Helkamaa T, Finckenberg P, Louhelainen M, Merasto S, Rauhala P, Lapatto R, Cheng ZJ, Reenilä I, Männistö P, Müller DN, Luft FC, Mervaala EM. Entacapone protects from angiotensin II-induced inflammation and renal injury. *J Hypertens* 2003;21:2353-2363.
- 17 Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 1997;151:1141-1152.
- 18 Ijpeelaar DH, Schulz A, Koop K, Schlesener M, Bruijn JA, Kerjaschki D, Kreutz R, de Heer E. Glomerular hypertrophy precedes albuminuria and segmental loss of podoplanin in podocytes in Munich-Wistar-Frömter rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:758-767.
- 19 Koop K, Eikmans M, Wehland M, Baelde H, Ijpeelaar D, Kreutz R, Kawachi H, Kerjaschki D, de Heer E, Bruijn JA. Selective loss of podoplanin protein expression accompanies proteinuria and precedes alterations in podocyte morphology in a spontaneous proteinuric rat model. *Am J Pathol* 2008;173:315-326.
- 20 Eisenreich A. Regulation of Vascular Function on Posttranscriptional Level. *Thrombosis* 2013;2013:948765.
- 21 Schena FP, Sallustio F, Serino G. microRNAs in glomerular diseases from pathophysiology to potential treatment target. *Clin Sci (Lond)* 2015;128:775-788.
- 22 Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics* 2012;44:237-244.
- 23 Eisenreich A, Langer S, Herlan L, Kreutz R. Regulation of podoplanin expression by microRNA-29b associates with its anti-apoptotic effect in angiotensin II-induced injury of human podocytes. *J Hypertens* 2016; 34:323-331.
- 24 Yanes LL, Sartori-Valinotti JC, Iliescu R, Romero DG, Racusen LC, Zhang H, Reckelhoff JF. Testosterone-dependent hypertension and upregulation of intrarenal angiotensinogen in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:771-779.
- 25 Neugarten J, Acharya A, Silbiger SR. Effect of gender on the progression of nondiabetic renal disease: a meta-analysis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:319-329.

- 26 Herlan L, Unland J, Langer S, Schulte L, Schütten S, García-Prieto CF, Kossmehl P, Fernández-Alfonso MS, Schulz A, Kreutz R. Development of progressive albuminuria in male Munich Wistar Frömter rats is androgen dependent. *Physiol Genomics* 2015;47:281-289.
- 27 Ni L, Saleem M, Mathieson PW. Podocyte culture: tricks of the trade. *Nephrology (Carlton)* 2012;17:525-531
- 28 Kramer AB, van Timmeren MM, Schuurs TA, Vaidya VS, Bonventre JV, van Goor H, Navis G. Reduction of proteinuria in adriamycin-induced nephropathy is associated with reduction of renal kidney injury molecule (Kim-1) over time. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:1136-1145
- 29 David J. Wagner, Tao Hu, Joanne Wang. Polyspecific organic cation transporters and their impact on drug intracellular levels and pharmacodynamics. *Pharmacol Res* 2016;111:237-246.
- 30 Boltzen U, Eisenreich A, Antoniak S, Weithaeuser A, Fechner H, Poller W, Schultheiss HP, Mackman N, Rauch U. Alternatively spliced tissue factor and full-length tissue factor protect cardiomyocytes against TNF-alpha-induced apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52:1056–1065.
- 31 Eisenreich A, Leppert U. The impact of microRNAs on the regulation of tissue factor biology. *Trends Cardiovasc Med* 2014;24:128-132
- 32 Ijpelaar DH, Schulz A, Koop K, Schlesener M, Bruijn JA, Kerjaschki D, Kreutz R, de Heer E. Glomerular hypertrophy precedes albuminuria and segmental loss of podoplanin in podocytes in Munich-Wistar-Frömler rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:758-767.
- 33 Wolf G, Ziyadeh FN: Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol* 2007;106:26-31.
- 34 Chien HC, Zhang Y, Morrissey KM, Liu J, Ostrem J, Younger NS, Kurhanewicz J, Shokat KM, Ashrafi K, Giacomini KM. OCT1 is a high-capacity thiamine transporter that regulates hepatic steatosis and is a target of metformin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:9983-9988
- 35 Tzvetkov MV, Vormfelde SV, Balen D, Meineke I, Schmidt T, Sehr D, Sabolic I, Koepsell H, Brockmoller J. The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clin Pharmacol Ther* 2009;86:299–306
- 36 Piwkowska A, Rogacka D, Jankowski M, Dominiczak MH, Stepinski JK, Angielski S. Metformin induces suppression of NAD(P)H oxidase activity in podocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;393:268–273
- 37 Kim J, Shon E, Kim CS, Kim JS. Renal podocyte injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:210821
- 38 Katta A, Kakarla S, Wu M, Paturi S, Gadde MK, Arvapalli R, Kolli M, Rice KM, Blough ER. Altered regulation of contraction-induced Akt/mTOR/p70S6k pathway signaling in skeletal muscle of the obese Zucker rat. *Exp Diabetes Res* 2009;2009:384683.

- 39 Mariappan MM. Signaling mechanisms in the regulation of renal matrix metabolism in diabetes. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:749812.
- 40 Wei M, Li Z, Yang Z. Crosstalk between protective autophagy and NF-kappaB signal in high glucose-induced podocytes. *Mol Cell Biochem* 2014;394:261–273
- 41 Yeh CH, Chen TP, Wang YC, Lin YM, Fang SW. AMP-activated protein kinase activation during cardioplegia-induced hypoxia/reoxygenation injury attenuates cardiomyocytic apoptosis via reduction of endoplasmic reticulum stress. *Mediators Inflamm* 2010;2010:130636
- 42 Xu X, Lu Z, Fassett J, Zhang P, Hu X, Liu X, Kwak D, Li J, Zhu G, Tao Y, Hou M, Wang H, Guo H, Viollet B, McFalls EO, Bache RJ, Chen Y. Metformin protects against systolic overload-induced heart failure independent of AMP-activated protein kinase alpha2. *Hypertension* 2014;63:723–728
- 43 Wu D, Wen W, Qi CL, Zhao RX, Lu JH, Zhong CY, Chen YY. Ameliorative effect of berberine on renal damage in rats with diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Phytomedicine* 2012;19:712–718
- 44 Lin CL, Lee PH, Hsu YC, Lei CC, Ko JY, Chuang PC, Huang YT, Wang SY, Wu SL, Chen YS, Chiang WC, Reiser J, Wang FS. MicroRNA-29a promotion of nephrin acetylation ameliorates hyperglycemia-induced podocyte dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2014;25:1698–1709
- 45 Tzeng TF, Liou SS, Chang CJ, Liu IM. The ethanol extract of zingiber zerumbet attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Evid Based Complement Altern Med* 2013:340645
- 46 Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2005;99:57-65
- 47 Schießl IM, Castrop H. Angiotensin II AT2 receptor activation attenuates AT1 receptor-induced increases in the glomerular filtration of albumin: a multiphoton microscopy study. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013;305:1189-1200
- 48 Liebau MC, Lang D, Böhm J, Endlich N, Bek MJ, Witherden I, Mathieson PW, Saleem MA, Pavenstädt H, Fischer KG. Functional expression of the renin-angiotensin system in human podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:710-719
- 49 Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 1997;151:1141-1152.
- 50 Matsui K, Breiteneder-Geleff S, Kerjaschki D. Epitope-specific antibodies to the 43-kD glomerular membrane protein podoplanin cause proteinuria and rapid flattening of podocytes. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:2013–2026.
- 51 van Es N, Schulz A, Ijpelaar D, van der Wal A, Kuhn K, Schütten S, Kossmehl P, Nyengaard JR, de Heer E, Kreutz R. Elimination of severe albuminuria in aging hypertensive rats by exchange of 2 chromosomes in double-consomic rats. *Hypertension* 2011;58:219–224.

- 52 Koop K, Eikmans M, Wehland M, Baelde H, Ijpelaar D, Kreutz R, Kawachi H, Kerjaschki D, de Heer E, Bruijn JA. Selective loss of podoplanin protein expression accompanies proteinuria and precedes alterations in podocyte morphology in a spontaneous proteinuric rat model. *Am J Pathol* 2008;173:315–326.
- 53 Liu GX, Li YQ, Huang XR, Wei LH, Zhang Y, Feng M, Meng XM, Chen HY, Shi YJ, Lan HY. Smad7 inhibits AngII-mediated hypertensive nephropathy in a mouse model of hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2014;127:195–208.
- 54 Helkamaa T, Finckenberg P, Louhelainen M, Merasto S, Rauhala P, Lapatto R, Cheng ZJ, Reenilä I, Männistö P, Müller DN, Luft FC, Mervaala EM. Entacapone protects from angiotensin II-induced inflammation and renal injury. *J Hypertens* 2003;21:2353–2363.
- 55 Iekushi K, Taniyama Y, Azuma J, Sanada F, Kusunoki H, Yokoi T, Koibuchi N, Okayama K, Rakugi H, Morishita R. Hepatocyte growth factor attenuates renal fibrosis through TGF-beta1 suppression by apoptosis of myofibroblasts. *J Hypertens* 2010;28:2454–2461.
- 56 Schmitt MJ, Margue C, Behrmann I, Kreis S. MiRNA-29: a microRNA family with tumor-suppressing and immune-modulating properties. *Curr Mol Med* 2013;13:572-585.
- 57 Jeppesen PL, Christensen GL, Schneider M, Nossent AY, Jensen HB, Andersen DC, Eskildsen T, Gammeltoft S, Hansen JL, Sheikh SP. Angiotensin II type 1 receptor signalling regulates microRNA differentially in cardiac fibroblasts and myocytes. *Br J Pharmacol* 2011;164:394–404.
- 58 Ning Q, Jiang X. Angiotensin II upregulated the expression of micro-RNA-224 but not microRNA-21 in adult rat cardiac fibroblasts. *Biomed Rep* 2013;1:776–780.
- 59 Rahadiani N, Ikeda J, Makino T, Tian T, Qiu Y, Mamat S, Wang Y, Doki Y, Aozasa K, Morii E. Tumorigenic role of podoplanin in esophageal squamous-cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1311–1323.
- 60 Birner P, Pusch S, Christov C, Mihaylova S, Toumangelova-Uzeir K, Natchev S, Schoppmann SF, Tchorbanov A, Streubel B, Tuettenberg J, Guentchev M. Mutant IDH1 inhibits PI3K/Akt signaling in human glioma. *Cancer* 2014;120:2440–2447.
- 61 Krishnan H, Ochoa-Alvarez JA, Shen Y, Nevel E, Lakshminarayanan M, Williams MC, Ramirez MI, Miller WT, Goldberg GS. Serines in the intracellular tail of podoplanin (PDPN) regulate cell motility. *J Biol Chem* 2013;288:12215–12221.
- 62 Peterziel H, Müller J, Danner A, Barbus S, Liu HK, Radlwimmer B, Pietsch T, Lichter P, Schütz G, Hess J, Angel P. Expression of podoplanin in human astrocytic brain tumors is controlled by the PI3K-AKT-AP-1 signaling pathway and promoter methylation. *Neuro Oncol* 2012;14:426–439.
- 63 Yamaki E, Yajima T, Kosaka T, Mogi A, Tanaka S, Kuwano H. Podoplanin overexpression in human mesothelioma cell lines enhances the tumorigenic phenotype. *Oncol Rep* 2013;29:932–940.
- 64 Kriegel AJ, Mladinov D, Liang M. Translational study of microRNAs and its application in kidney disease and hypertension research. *Clin Sci (Lond)* 2012;122:439–447.

- 65 Schena FP, Sallustio F, Serino G. microRNAs in glomerular diseases from pathophysiology to potential treatment target. *Clin Sci (Lond)* 2015;128:775–788.
- 66 Chung AC, Lan HY. MicroRNAs in renal fibrosis. *Front Physiol* 2015;6:50.
- 67 Sun Q, Zhang J, Cao W, Wang X, Xu Q, Yan M, Wu X, Chen W. Dysregulated miR-363 affects head and neck cancer invasion and metastasis by targeting podoplanin. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45:513–520.
- 68 Cortez MA, Nicoloso MS, Shimizu M, Rossi S, Gopisetty G, Molina JR, Carlotti C Jr, Tirapelli D, Neder L, Brassesco MS, Scrideli CA, Tone LG, Georgescu MM, Zhang W, Pudevalli V, Calin GA. miR-29b and miR-125a regulate podoplanin and suppress invasion in glioblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:981–990.
- 69 Schulz A, Schlesener M, Weiss J, Hänsch J, Wendt N, Kossmehl P, Grimm D, Vetter R, Kreutz R. Protective effect of female gender on the development of albuminuria in a polygenetic rat model is enhanced further by replacement of a major autosomal QTL. *Clin Sci (Lond)* 2008;114:305–311.
- 70 Labri F. Adrenal androgens and intracrinology. *Semin Reprod Med* 2004;22:299-309.
- 71 Gray JE, van Zwieten MJ, Hollander CF. Early light microscopic changes in chronic progressive nephrosis in several strains of aging laboratory rats. *J Gerontol* 1982;37:142–150.
- 72 Pingili AK, Thirunavukkarasu S, Kara M, Brand DD, Katsurada A, Majid DS, Navar LG, Gonzalez FJ, Malik KU. 6 $\beta$ -Hydroxytestosterone, a Cytochrome P450 1B1-Testosterone-Metabolite, Mediates Angiotensin II-Induced Renal Dysfunction in Male Mice. *Hypertension* 2016;67:916-926
- 73 Schulz A, Kreutz R. Mapping genetic determinants of kidney damage in rat models. *Hypertens Res* 2012;35:675–694.
- 74 Schulz A, Litfin A, Kossmehl P, Kreutz R. Genetic dissection of increased urinary albumin excretion in the munich wistar frömter rat. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2706-2714.
- 75 Schulz A, Standke D, Kovacevic L, Mostler M, Kossmehl P, Stoll M, Kreutz R. A major gene locus links early onset albuminuria with renal interstitial fibrosis in the MWF rat with polygenetic albuminuria. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:3081-3089.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sebastian Langer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss endogener und exogener Faktoren auf Podozyten und Nierenfunktion“ 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](http://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 Betreuer, 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

## **Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen**

Sebastian Langer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

### **Publikation 1:**

Sebastian Langer\*, Reinhold Kreutz, Andreas Eisenreich  
Metformin modulates apoptosis and cell signaling of human podocytes under high glucose conditions

Journal of Nephrology, 2016

Impact Factor: 2,6

Von Sebastian Langer durchgeführte Teilleistungen:

Pflege der Zellkultur (Inkubation der Zellen, Kryokonservierung,

Medikamentenapplikation, Gewinnung von Gewebeproben aus der Kultur)

Laborarbeiten: Proteinextraktion aus Gewebeproben, eigenständiges Durchführen der Mehrzahl der Western Blots und Auswertung

Literaturrecherche

Verfassen des Manuskripts

### **Publikation 2:**

Andreas Eisenreich\*, Sebastian Langer, Laura Herlan, Reinhold Kreutz

Regulation of podoplanin expression by microRNA-29b associates with its anti-apoptotic effect in angiotensin II-induced injury of human podocytes

Journal of Hypertension, 2016

Impact Factor: 5,1

Von Sebastian Langer durchgeführte Teilleistungen:

Pflege der Zellkultur (Inkubation der Zellen, Kryokonservierung,

Medikamentenapplikation, Gewinnung von Gewebeproben aus der Kultur)

Laborarbeiten: Proteinextraktion aus Gewebeproben, Mitarbeit an Western Blots und Auswertung  
Verfassen des Manuskripts

### **Publikation 3:**

Laura Herlan\*, Johannes Unland\*, Sebastian Langer, Leonard Schulte, Sabrina Schütten, Concha García-Prieto, Peter Kossmehl, Maria Soledad Fernández-Alfonso, Angela Schulz, Reinhold Kreutz

Development of progressive albuminuria in male Munich Wistar Frömter rats is androgen dependent

Physiological Genomics, 2015

Impact Factor: 2,4

Von Sebastian Langer durchgeführte Teilleistungen:

Literaturrecherche

Verfassen des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---



## Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

### **Publikation 1:**

Sebastian Langer, Reinhold Kreutz, Andreas Eisenreich.  
Metformin modulates apoptosis and cell signaling of human podocytes under high glucose conditions.  
Journal of Nephrology. 2016; 29:765-773.  
<https://dx.doi.org/10.1007/s40620-015-0258-1>

### **Publikation 2:**

Andreas Eisenreich, Sebastian Langer, Laura Herlan, Reinhold Kreutz.  
Regulation of podoplanin expression by microRNA-29b associates with its anti-apoptotic effect in angiotensin II-induced injury of human podocytes.  
Journal of Hypertension. 2016; 34:323-331.  
<http://dx.doi.org/10.1097/HJH.0000000000000799>

### **Publikation 3:**

Laura Herlan, Johannes Unland, Sebastian Langer, Leonard Schulte, Sabrina Schütten, Concha García-Prieto, Peter Kossmehl, Maria Soledad Fernández-Alfonso, Angela Schulz, Reinhold Kreutz.  
Development of progressive albuminuria in male Munich Wistar Frömter rats is androgen dependent.  
Physiological Genomics. 2015; 47:281-289.  
<http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00008.2015>

## **Lebenslauf**

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

# Komplette Publikationsliste

## Publikationen

Herlan L, Unland J, **Langer S**, Schulte L, Schütten S, García-Prieto CF, Kossmehl P, Fernández-Alfonso MS, Schulz A, Kreutz R. Development of progressive albuminuria in male Munich Wistar Frömter rats is androgen dependent. *Physiol Genomics* 2015;47:281-289.

Impact Factor 2016: 2,615

Eisenreich A, **Langer S**, Herlan L, Kreutz R. Regulation of podoplanin expression by microRNA-29b associates with its anti-apoptotic effect in angiotensin II-induced injury of human podocytes. *J Hypertens* 2016;34:323-331.

Impact Factor 2016: 5,062

**Langer S**, Kreutz R, Eisenreich A. Metformin modulates apoptosis and cell signaling of human podocytes under high glucose conditions. *J Nephrol* 2016;29:765-773.

Impact Factor 2016: 1,352

## Poster-Präsentationen

**S. Langer**, R. Kreutz, A. Eisenreich. Metformin modulates intracellular signaling and glucose-induced apoptosis of human podocytes. 38. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie und Prävention 2014“ der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutsche Hypertonie Gesellschaft.  
<http://hypertonie2014.de/wp-content/uploads/sites/3/2014/12/Abstractband.pdf>

## Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Reinhold Kreutz für die Möglichkeit, bei ihm zu promovieren und die außerordentliche Betreuung danken. Seine Ideen, Anregungen und Hilfestellungen haben mir viel bedeutet und mich persönlich und fachlich vorangebracht.

Im täglichen Geschehen war mir die Betreuung durch Frau Dr. Angela Schulz und Herrn Dr. Andreas Eisenreich eine großartige Hilfe. Sie standen mir immer als geduldige und wissende Ansprechpartner zur Verfügung. Es ehrt mich, dass die Beiden neben ihrer arbeitsintensiven Forschung immer Zeit für mich fanden, wenn ich Rat suchte.

Die Arbeit im Labor wäre nicht möglich gewesen ohne die Einarbeitung durch Sabine Wunderlich, Claudia Plum und Karen Böhme. Ihre jahrelange Erfahrung und ihr präzises Arbeiten waren Motivation und Vorbild zugleich. Gerade mein Arbeitsbeginn wurde mir durch Sabine Wunderlich erleichtert. Leider ist Sabine viel zu früh verstorben. Ihre Freundlichkeit, ihre Fröhlichkeit und die Energie, die sie ausstrahlte, bleiben unvergessen.

Ich möchte auch den Tierpflegerinnen Bettina Bublath und Christiane Pribsch danken. Zusammen mit Laura Herlan, die im September 2016 promovierte, haben sie mir gezeigt, wie sich Forschung und Tierschutz vereinbaren lassen.

Es war mir eine große Freude und ein riesiges Glück, am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie promovieren zu können. Die gute Atmosphäre, das gemeinsame Kaffeetrinken und Mittagessen sowie die vielen Begegnungen nach Feierabend haben mir viel bedeutet.

Vielen Dank!