

Aus dem Institut für Molekularbiologie von Hormonen im Herz-Kreislaufsystem  
des Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

**DISSERTATION**

Renin im Urin bei Patienten und Mäusen mit diabetischer  
Nephropathie  
Urinary Renin in Patients and Mice with Diabetic Nephropathy

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jeannette Nhi Tang

aus Neuburg a.d. Donau

Datum der Promotion: 17.09.2021

## INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRACTS.....	3
1. Abstract auf Deutsch.....	3
2. Abstract auf Englisch.....	5
MANTELTEXT .....	6
1. Einleitung .....	6
2. Vertiefte Darstellung der Methodik.....	9
3. Wesentliche Ergebnisse .....	16
4. Klinische Anwendung, mögliche Limitationen und weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen .....	20
5. Referenzen.....	23
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	27
AUSFÜHRLICHE ANTEILSERKLÄRUNG AN DER ERFOLGTEN PUBLIKATION .....	28
AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST (ISI Web of KnowledgeSM).....	31
DRUCKEXEMPLAR DER PUBLIKATION .....	32
LEBENS LAUF .....	45
PUBLIKATIONS LISTE .....	47
DANKSAGUNG.....	48

## ABSTRACTS

### 1. Abstract auf Deutsch

**Hintergrund:** Das Renin-Angiotensin-System (RAS) spielt eine kritische Rolle bei der Entwicklung und Progression von diabetischer Nephropathie und ist das Hauptziel der Therapie. Bisher gibt jedoch nur wenige Informationen über die renale Verarbeitung des Renins im Urin bei diabetischer Nephropathie.

**Methoden:** Wir untersuchten Renin im Urin von Patienten mit lange bestehendem Diabetes mellitus Typ 1 und von Mäusen mit Streptozotocin-induziertem Diabetes. Wir nutzen dazu Infusionsexperimente mit humanem rekombinantem Renin (hrRenin) und Lysin, einem Blocker der Proteinreabsorption im proximalen Tubulus, um zirkulatorisches Renin zu verfolgen und die Rolle der proximal tubulären Reabsorption zu untersuchen. Um herauszufinden, ob die Verteilung von Reninlinienzellen bei chronischem Diabetes verändert ist, generierten wir ein Renin-Reporter-Mausmodell (Ren1d-Cre;mT/mG), bei dem Diabetes durch Streptozotocin induziert wurde.

**Ergebnisse:** Im Urin von Patienten mit Diabetes und diabetischer Nephropathie (n=36) war aktives Renin im Vergleich zu Patienten mit Diabetes ohne Nephropathie (n=38) erhöht (3,2 vs. 1,3 pg/mg Kr;  $p < 0,001$ ). Bei diabetischen Mäusen war Renin im Urin im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrollen erhöht. In der Immunhistochemie zeigte sich in den Nieren von Mäusen mit Diabetes eine verminderte Renin-Anfärbung im juxtaglomerulären Apparat und im proximalen Tubulus, während sie in den Sammeltubuli verstärkt war. Die kombinierte Injektion von hrRenin und Lysin führte zu einer Erhöhung von Renin im Urin, bei der kein signifikanter Unterschied mehr zwischen nicht-diabetischen und diabetischen Mäusen nachzuweisen war (1720±1151 vs. 2418±994 pg/mg;  $p = 0,368$ ). Megalin mRNA war im Nierenkortex von diabetischen Mäusen verringert (0,70±0,09 vs. 1,01±0,04 in Kontrollen;  $p = 0,01$ ). Bei Ren1d-Cre;mT/mG Mäusen mit Diabetes ist die Verteilung von Reninlinienzellen ähnlich den nicht-diabetischen Reportermäusen, sowohl im arteriellen Gefäßbaum (einschließlich der juxtaglomerulären Zellen) als auch in den proximalen und Sammeltubuli. Es zeigte sich also kein Hinweis auf Migration von Reninlinienzellen bei diesem diabetischen Mausmodell. Renin mRNA in mikrodissidierten Sammeltubuli wies zudem keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und diabetischen Mäusen auf.

**Fazit:** In Patienten mit diabetischer Nephropathie und Mäusen mit Streptozotocin-induziertem Diabetes ist Renin im Urin erhöht. Der Ursprung dieser Erhöhung ist weder auf die Migration von Reninlinienzellen in die Nierentubuli noch auf die vermehrte Synthese von Renin aus tubulären Strukturen zurückzuführen. Die Erhöhung von Renin im Urin bei diabetischer Nephropathie ist am besten durch die veränderte glomeruläre Filtration und gestörte Resorption gefilterten Renins im proximalen Tubulus zu erklären.

## 2. Abstract auf Englisch

**Background:** The renin-angiotensin-system (RAS) plays a critical role in the development and progression of diabetic kidney disease (DKD) and is the main target for therapy. As of now there is little information on the handling of urinary renin in DKD.

**Methods:** We sought to study urinary renin in patients with longstanding type 1 diabetes and mice with streptozotocin-induced diabetes. We used infusion experiments with human recombinant renin (hrRenin) and/or lysine, a blocker of proximal tubular reabsorption, to trace circulatory renin and evaluate the role of proximal tubular reabsorption. We also generated a renin reporter mouse model (Ren1d-Cre;mT/mG) with streptozotocin-induced diabetes to examine whether the distribution of cells of the renin lineage was altered in a diabetic setting.

**Results:** In urines from people with type 1 diabetes and DKD (n=36), active renin was increased compared to those without DKD (n=38) (3.2 vs. 1.3 pg/mg Cr;  $p<0.001$ ). In diabetic mice, urinary renin was increased compared to non-diabetic controls. By immunohistochemistry, in diabetic mice, juxtaglomerular apparatus and proximal tubular renin staining were decreased while collecting duct staining was increased. Injection of hrRenin together with lysine increased urinary renin such that it was no longer significantly different between control and diabetic mice ( $1720\pm1151$  vs.  $2418\pm994$  pg/mg Cr,  $p=0.368$ ). Megalin mRNA was reduced in the kidney cortex of diabetic mice ( $0.70\pm0.09$  vs.  $1.01\pm0.04$  in controls,  $p=0.01$ ) consistent with impaired tubular reabsorption. In diabetic Ren1d-Cre;mT/mG mice, the distribution of renin lineage cells was similar to non-diabetic reporter mice in the arterial tree (including juxtaglomerular cells) and proximal and collecting tubules. Thus, no evidence for migration of renin lineage cells in diabetic mice could be found in this model. Renin mRNA in microdissected collecting tubules was not significantly different between control and diabetic mice.

**Conclusions:** In humans with DKD and mice with streptozotocin-induced diabetes, urinary renin is increased. The source of this increase cannot be attributed to migration of cells of the renin lineage to the renal tubules or excessive secretion of renin by tubular structures. The increase of urinary renin found in DKD is best attributed to altered glomerular filtration and impaired proximal tubular reabsorption of filtered renin.

# MANTELTEXT

## 1. Einleitung

### Forschungsstand

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist einer der bedeutsamsten physiologischen Prozesse für die Regulierung des Blutdrucks, des Salz- und Elektrolythaushalts und ist Hauptziel der medikamentösen Therapie bei kardiovaskulären Erkrankungen [1]. Die erstmals vor über 50 Jahren beschriebene Aspartatprotease Renin ist das Schlüsselenzym des Renin-Angiotensin-Systems [2, 3]. In diesem System wird zirkulierendes Angiotensinogen mithilfe von Renin in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt unter Spaltung von 10 Aminosäuren des N-Terminus zu Angiotensin I hydrolysiert [3]. Aus Angiotensin I wird schließlich Angiotensin II synthetisiert, welches den Blutdruck durch eine Vielzahl von Mechanismen wie Vasokonstriktion, der Aktivierung des sympathischen Nervensystems, der Synthese von Aldosteron und antinatriuretische Effekte moduliert [3]. Die meisten physiologischen Effekte des Renin-Angiotensin-Systems werden über dem Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 vermittelt. Die Freisetzung von Renin wird hauptsächlich durch den Nierenperfusiondruck, dem Macula-Densa-Mechanismus und sympathischen Nierenerven via beta-adrenergen Rezeptoren reguliert [3, 4]. Durch die Wirkung von Angiotensin II kommt es zu Blutdruckveränderungen in den glomerulären Arteriolen und Veränderungen am Natriumchlorid-Gleichgewicht an der Macula densa, die dadurch indirekt die Freisetzung von Renin hemmt [5]. Neben der Lokalisation in der Niere wurden lokale Renin-Angiotensin-Systeme auch im Gehirn, Herz, Gefäßen und den Nebennieren gefunden [1, 6, 7]. Renin wird zunächst in Form von Prä-Prorenin synthetisiert und nach Abspaltung der C-terminalen Signal-Sequenz zu Prorenin. Schließlich wird durch die Abspaltung des N-terminalen Pro-Segments aktives Renin produziert [3].

Patienten mit Diabetes mellitus weisen besondere Merkmale hinsichtlich des Renin-Angiotensin-Systems auf: Im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes haben Patienten mit Diabetes eine erniedrigte Plasmakonzentration von Renin, eine verstärkte Antwort auf RAS-Inhibitoren und eine erhöhte Konzentration von Renin im Urin [8, 9, 10]. Es wird angenommen, dass das Renin-Angiotensin-System bei diabetischer Nephropathie hochreguliert und überaktiv ist und wesentlich zur Pathologie beiträgt [11, 12, 13]. Es wird vermutet, dass diese erhöhte Aktivierung des Renin-Angiotensin-System durch eine Erhöhung unterschiedlicher RAS-Komponenten im Urin widerspiegelt wird, insbesondere durch Renin im Urin [10, 14].

Die paradoxe Erniedrigung der Plasma-Renin-Aktivität bei gleichzeitig überaktivem Renin-Angiotensin-System bei Patienten mit Diabetes wird auch als Renin-Paradox bezeichnet [8]. Die Hochregulierung des intrarenalen Renin-Angiotensin-Systems erklärt dabei die hohe Wirksamkeit von RAS-Inhibitoren bei der Verlangsamung des Fortschreitens von Niereninsuffizienz bei Patienten mit Diabetes trotz niedriger Plasma-Renin-Aktivität [8]. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es jedoch nur wenige Informationen über die Rolle von im Urin gemessenem Renin bei Patienten mit Diabetes mellitus. Van den Heuvel et al. [10] zeigten eindrücklich eine Erhöhung von Renin im Urin von Patienten mit Diabetes mellitus überwiegend vom Typ 2. Aktuell liegen jedoch kaum Informationen zur Rolle von Renin im Urin bei Patienten mit Diabetes vom Typ 1 vor. Insbesondere der Aspekt von langjähriger Krankheit mit und ohne renale Komplikationen wurde bisher noch nicht in dem Zusammenhang beleuchtet.

Es stellt sich nun die Frage, warum die Konzentration von zirkulierendem Renin im Plasma trotz hoher Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems verringert ist. Renin wird unter physiologischen Bedingungen primär in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates synthetisiert [15]. Bei diesen Zellen handelt es sich um kubische, epithelartige Zellen, die sich in der Mediaschicht der afferenten Arteriolen am Eingang des glomerulären Kapillarnetzes befinden [16]. Bereits im Jahre 1982 wurde Renin auch im proximalen Tubulus und Sammelrohr beschrieben [17]. Es ist zudem bekannt, dass die Konzentration von Prorenin im Plasma von Patienten mit Diabetes erhöht ist [18]. Kang et al. zeigen, dass zumindest in-vitro die Synthese von Prorenin in den Hauptzellen des Sammelrohrs eine Rolle spielen könnte [11]. Anders als die Synthese von Renin im juxtaglomerulären Apparat, das durch Angiotensin II inhibiert wird, wird die Synthese in den Hauptzellen des Sammelrohres durch Angiotensin II stimuliert [11]. Vor einigen Jahren wurde schließlich der (Pro)renin-Rezeptor entdeckt, ein multifunktionelles Protein, das in verschiedenen Organen exprimiert wird [19]. In der Niere ist der (Pro)renin-Rezeptor im Sammelrohr am stärksten exprimiert, sowohl in den Hauptzellen als auch den Schaltzellen [20]. Der (Pro)renin-Rezeptor weist eine Bindungsspezifität mit Renin und Prorenin auf und ermöglicht dem normalerweise inaktivem Prorenin ohne proteolytische Spaltung durch einen Konformationswechsel aktiv zu werden und Angiotensinogen zu spalten [19]. Seitdem wurden weitere Effekte einer Prorenin-(Pro)renin-Rezeptor-Interaktion postuliert, unter anderem am Glucose- und Lipidstoffwechsel, an der Wasser- und Natriumresorption und Fibrose [20]. Diese Erkenntnisse legen somit zwei Dinge nahe: dass die erhöhte Plasma-Prorenin-Konzentration bei Diabetes-Patienten aus der Synthese im Sammelrohr stammen könnte und dass Prorenin auch funktionell von Bedeutung sein kann [11].

Bei weiterer Betrachtung kommen bei diesem Konzept jedoch einige Probleme und unbeantwortete Fragen auf: Zunächst einmal ist normalerweise die Konzentration von Prorenin im Urin verschwindend gering [10]. Dies, zusammen mit der niedrigen Bindungsaffinität von Prorenin an den Prorenin-Rezeptor, scheint dessen tatsächliche Bedeutung in vivo zu relativieren [21].

Zweitens wird die Rolle der Filtration von Renin durch den Glomerulus und dessen Resorption im proximalen Tubulus komplett außer Acht gelassen: Renin ist mit einem Molekulargewicht von 48 kDa klein genug um die glomeruläre Filtrationsbarriere zu passieren und wird anschließend im proximalen Tubulus in hohem Maße (>95%) resorbiert [22]. Diese Erkenntnisse sind vereinbar mit einer Studie aus den 80er Jahren, die zeigt, dass die Konzentration von Renin im Urin stark ansteigt, wenn die Resorption im proximalen Tubulus durch die basische Aminosäure Lysin inhibiert wird [23]. Seitdem wurde der Resorptionsmechanismus im proximalen Tubulus näher erforscht und ein Megalin-abhängiger endozytotischer Prozess demonstriert [24]. Bei Megalin handelt es sich um ein Protein der Low-Density Lipoprotein (LDL) Rezeptorfamilie, das in Epithelzellen einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird und als Scavenger-Rezeptor fungiert [25]. Als solcher ist Megalin maßgeblich an der tubulären Resorption von einer Vielzahl von gefilterten Liganden verantwortlich.

Um das Renin-Paradox in besserem Umfang zu verstehen, müssen drei Punkte in einem Diabetes-Kontext näher beleuchtet werden: die Rolle der glomerulären Filtrationsbarriere, die Rolle der Resorption von filtriertem Renin und die lokale Synthese und Sekretion von (Pro)renin aus Tubuluszellen. Zu letzterem Punkt ist eine nähere Betrachtung von Renin-produzierenden Zellen in der Niere notwendig: Im Laufe der Nephrogenese findet die Synthese von Renin zunächst in den größeren intrarenalen Arterien statt und beschränkt im Laufe der Entwicklung zunehmend auf kleinere Arteriolen bis sie schließlich im Erwachsenenalter ausschließlich in den juxtaglomerulären Zellen lokalisiert ist [16]. Die einst Renin-produzierenden Zellen differenzieren sich im Laufe der Entwicklung in andere Zelltypen wie glatte Muskel- und Mesangialzellen mit der sie die Expression von Renin verlieren [16]. Interessanterweise können Zellen, die die Expression von Renin ausgeschaltet haben, diese in Situationen, in denen temporär mehr Renin erforderlich ist, wieder reaktivieren [26]. Zellen, die die Fähigkeit zur Reninbildung besitzen oder in einer früheren Entwicklungsstufe besaßen, stammen aus der Reninlinie und werden im Folgenden als Reninlinienzellen bezeichnet. Es stellt sich nun die Frage, welchen Einfluss Diabetes auf Reninlinienzellen ausüben und ob es bei Diabetes zu einer vermehrten Rekrutierung von Reninlinienzellen entlang des Nephrons kommt, die für die erhöhten Reninwerte im Harn verantwortlich sein könnten.

## **Fragestellung**

Das Ziel dieser Forschungsarbeit war es, den Ursprung des im Urin nachgewiesenen Renins bei Patienten mit Typ 1 Diabetes mellitus mit und ohne diabetische Nephropathie sowie im Mausmodell mit Streptozotocin-induziertem Diabetes zu ermitteln. Unsere Hypothese war, dass Renin im Urin bei diabetischer Nephropathie durch einen oder mehrere der folgenden Faktoren erhöht ist: Vermehrte Filtration aufgrund einer geschädigten Filtrationsbarriere, verminderte Resorption im proximalen Tubulus oder erhöhte Produktion und Sekretion von Renin durch tubuläre Segmente, wobei besonders die Sammelrohre von Interesse sind. Die Rolle der Resorption im proximalen Tubulus und die tubuläre Synthese wurden anhand von Injektionsexperimenten mit rekombinantem humanem Renin und Lysin, einem Hemmer der Reabsorption im proximalen Tubulus, erforscht. Außerdem generierten wir ein Renin-Reporter-Mausmodell (Ren1d-Cre;mT/mG), bei dem Diabetes induziert wurde, um die Verteilung von Reninlinienzellen in einem diabetischen Setting zu beleuchten.

## **2. Vertiefte Darstellung der Methodik**

### **Patientenkohorte**

Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1, die im Diabetes-Zentrum der Universität von Washington in Behandlung waren, wurden nach Aufklärung und Einwilligung in das Kidney Research Institute Diabetic Kidney Disease Repository der Universität von Washington eingeschrieben. Diabetische Nephropathie wurde hierbei wie folgt definiert: Entweder lag A) ein Albumin-Kreatinin-Quotient von  $\geq 300$  mg/g im Urin vor, ungeachtet der glomerulären Filtrationsrate, oder B) es lag ein Albumin-Kreatinin-Quotient von  $\geq 30$  mg/g vor mit einer geschätzten glomerulären Filtrationsrate (eGFR) von  $< 60$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> [27]. Um eine gute Abgrenzung zu erreichen, wurden Patienten mit lang bestehendem Diabetes ohne Nephropathie als jene mit einer Erkrankungsdauer von  $\geq 25$  Jahren, eGFR  $\geq 90$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> und Albumin-Kreatinin-Quotient  $< 30$  mg/g definiert [27]. Demografische und klinische Daten (Alter, Ethnizität, Geschlecht, Diabetes-Erkrankungsdauer, HbA1c-Wert und RAS-Inhibitoreinnahme) wurden aus der elektronischen Datendokumentation erfasst. Dabei wurde der HbA1c-Wert verwendet, der dem Zeitpunkt der Urinprobensammlung am nächsten war. Die glomeruläre Filtrationsrate wurde anhand des Serumkreatinins mit der CKD-EPI-Formel berechnet. Mittelstrahlurin wurde gesammelt und bei 4°C aufbewahrt. Die Nutzung von menschlichen Urinproben und Daten wurde von dem Institutional Review Board der

Universität von Washington bewilligt. Für unsere Studien wurden die Urinproben bei 4700G für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Die mittlere Zeit von Probensammlung bis zur Aufbewahrung bei -80°C betrug 5,7 Stunden (Standardabweichung 2,0 Stunden) [27].

### **Quantitative Proteinmessung von Patientenurinproben**

Albumin und Kreatinin wurden mittels einem immunturbidimetrischen Assay und modifizierter Jaffé-Reaktion mit einem DXC 600 Clinical Chemistry Analyzer (Beckman Coulter, Indianapolis, USA) gemessen. Aktives Renin wurde mittels quantitativem Festphasen-Sandwich-ELISA der Firma DRG Instruments (Marburg) mit einer minimalen Nachweisgrenze von 0,8 pg/ml und 0,69% Kreuzreaktivität mit Prorenin gemessen. Vor der Messung von aktivem Renin, wurde jede Probe mit Spin-X 5 kD Zentrifugatoren 6-fach konzentriert. Die Koeffizienten für Intra- und Interassay-Varianz betragen jeweils 4,9% und 12,7% für aktives Renin in menschlichen Urinproben [27]. Es wurden interne Kontrollen verwendet (jeweils für hohe und niedrige Reninwerte), um eine konstante Interassay-Leistung gewährleisten zu können. Zusätzlich wurden ELISA-Daten für aktives Renin im Urin mit Daten aus der Literatur verglichen. Das geometrische Mittel (Quartilsabstand in Klammern angegeben) für alle getesteten Urinproben mit nachweisbarem aktiven Renin betrug 1,64 (0,14-17,2) pg/ml (n=65) in unserer Studie [27]. Dies entsprach den Werten, die in der Literatur mit einem anderen Verfahren (Enzymkinetik-Assay: EKA) bei 43 Urinproben von Patienten, die hauptsächlich Diabetes mellitus Typ 2 hatten, berichtet wurden (1,46 (0,13-157) pg/ml) [10].

Zusätzlich wurde gesamtes Renin mittels quantitativem Festphasen-Sandwich-Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) der Firma R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA) mit einer Sensitivität von 14,8 pg/ml gemessen. Nach Herstellerangaben erkennt dieses Assay humanes rekombinantes Prorenin und Renin. Das Kit für gesamtes Renin wurde vom Hersteller spezifisch für menschliche Urinproben getestet.

Wir versuchten außerdem Prorenin im Urin mittels quantitativem Festphasen-Sandwich-ELISA der Firma Molecular Innovations (Novi, Michigan, USA) mit einer minimalen Nachweisgrenze von 0,016 ng/ml zu messen. Dieses Assay war laut Herstellerangaben spezifisch für Prorenin ohne nachweisbare Kreuzreaktivität mit humanem, Maus- oder Ratten-Renin. Da in unseren Proben die Messwerte schlecht reproduzierbar waren (Interassay-Varianz = 69,5%, n=47), stellen wir die Ergebnisse des humanen Prorenin Assays im Folgenden nicht dar, da wir sie als fragwürdig betrachteten [27].

## **Versuchstiere**

Für die Urinproteinmessungen, Immunhistochemie, RT-PCR-Analysen und Mikrodissektionen der Nieren, sowie Injektionsexperimente mit Renin und Lysin wurden weibliche FVB-Mäuse genutzt. Die FVB-Mäuse wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. Für die Immunfluoreszenzstudien wurden weibliche und männliche Ren1d-Cre;mT/mG Mäuse genutzt. Das Ren1d-Cre;mT/mG ist ein zweifach transgenes Reportermausmodell, das Cre-Rekombinase aus dem endogenen Renin-Locus (Ren1d) und die mT/mG-Kassette aus dem Rosa26-Locus exprimiert [26]. Mithilfe der beiden Reportergene Membrane-Targeted Fluorescent Tomato Protein (mT, rot) und Membrane-Directed Enhanced Green Fluorescent Protein (GFP; mG) wurden Zellen der Reninlinie in den Nieren von diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen verfolgt. Während mT vor Rekombination exprimiert wird, wird mG nur nach Cre-Expression und Rekombination exprimiert. Da die Genexpression aus dem Rosa26-Locus ubiquitär ist und der Genschalter stabil in die Nachkommenszellen weitergegeben wird, sind nur Reninlinienzellen grün (mG-positiv), während alle nicht-Reninlinienzellen mT-positiv verbleiben (rot). Dieses Reportermausmodell wurde wie zuvor beschrieben entwickelt [28, 29]. In unserer Studie wurde dieses Mausmodell mit Streptozotocin behandelt und 11-12 Wochen nach der letzten Injektion untersucht [27]. Die Tiere waren im Center for Comparative Medicine der Northwestern Universität, Feinberg School of Medicine untergebracht. Die Versorgung der Tiere und Prozeduren wurden vom Institutional Animal Care and Use Committee der Northwestern Universität bewilligt, entsprechend der National Institute of Health (NIH) Leitlinien für die Pflege und Nutzung von Labortieren, sowie den institutionellen, staatlichen und föderalen Leitlinien. Die Gesamtzahl der in die Studien aufgenommenen Versuchstiere betrug 126 [27].

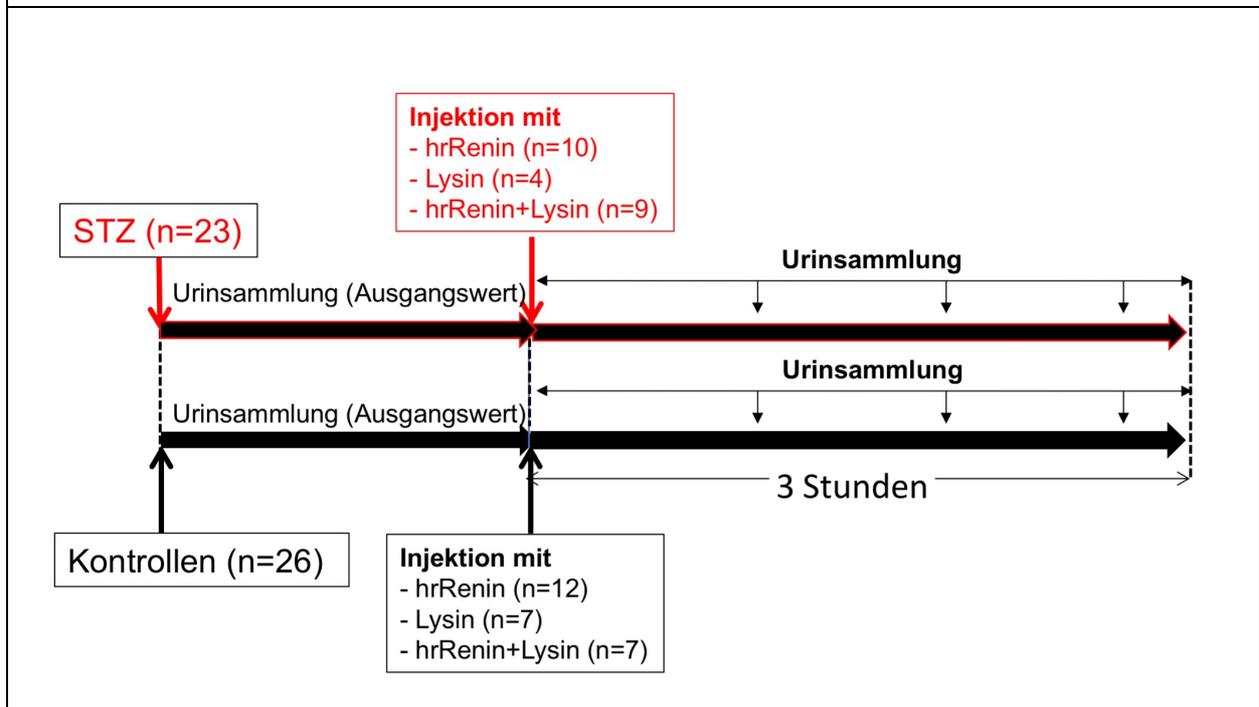
## **Induktion von Diabetes mit Streptozotocin**

Streptozotocin (STZ, 150 mg/kg, Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA) wurde in einer Natriumcitrat-Pufferlösung mit pH 4,5 gelöst und einer Mausgruppe verabreicht. Die andere Mausgruppe (nicht-diabetische Kontrollen) erhielt die alleinige Natriumcitrat-Pufferlösung mit pH 4,5 (Vehikel). Die Verabreichung erfolgte an weiblichen FVB-Mäusen sowie an weiblichen und männlichen Ren1d-Cre;mT/mG-Mäusen mittels zwei intraperitonealen Injektionen [27]. Spontanurin von FVB-Mäusen wurde 8 sowie 20 Wochen nach der zweiten Streptozotocin- bzw. Vehikel-Injektion gesammelt und bei -80°C gelagert [27].

## Injektionen mit humanem rekombinatem Renin und Lysin

Humanes rekombinantes Renin (hrRenin, Molecular Innovations, Novi, Michigan, USA) wurde in einer Dosis von 0,5 µg/g Körpergewicht als einmaliger intravenöser Bolus weiblichen FVB-Mäusen injiziert [27]. Um die Rolle der Reninabsorption in den proximalen Tubuli zu untersuchen, wurde Lysin, ein Hemmer der Resorption im proximalen Tubulus [30], in einer Dosierung von 0,4 mg/g Körpergewicht in Kombination mit und ohne humanem Renin injiziert. Urin wurde unmittelbar vor Injektion (Ausgangswert) und innerhalb der ersten 3 Stunden nach Injektion gesammelt. Die zeitliche Abfolge der Experimente gestaltete sich wie folgt: die Mäuse wurden zunächst gewogen; dann wurde der Ausgangswert-Urin gesammelt; 5-10 Minuten nach Urinabgang wurde den Mäusen humanes Renin, Lysin oder beides anhand einer einzelnen intravenösen Injektion (0,2 ml) verabreicht; unmittelbar nach Injektion wurden die Mäuse zur Urinsammlung für 3 Stunden in Urinsammelkäfige mit Zugang zu Wasser und Nahrung platziert (Abbildung 1) [27].

**Abbildung 1.** Studiendesign der Injektionsexperimente von diabetischen und nicht-diabetischen FVB-Mäusen mit humanem rekombinatem Renin, Lysin oder beidem. STZ: Streptozotocin, hrRenin: humanes rekombinantes Renin.



## Quantitative Proteinmessung von Mäuseurinproben

Angiotensin I und Angiotensin II wurden durch Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS), wie zuvor beschrieben, extrahiert und gemessen

[31]. Aktives humanes Renin wurde mittels quantitativem Festphasen-Sandwich-ELISA der Firma DRG Instruments (Marburg) gemessen. Gesamtes Mausrenin wurde mittels quantitativem Festphasen-Sandwich-ELISA der Firma RayBiotech (Norcross, Georgia, USA) mit einer unteren Nachweisgrenze von 6 pg/ml gemessen. Albumin wurde durch quantitatives Festphasen-Sandwich-ELISA (Albuwell M, Exocell, Philadelphia, Pennsylvania, USA) bestimmt. Kreatinin wurde mit der Jaffé-Methode bestimmt (Creatinine Companion, Exocell, Philadelphia, Pennsylvania, USA) [27].

### **Immunhistochemie**

Paraffinblöcke wurden in 4 µm dicke Schnitte geschnitten, mit Xylol entparaffiniert und mit einer Alkoholverdünnungsreihe rehydriert. Die Antigenbergung erfolgte durch Kochen in Demaskierungslösung (DAKO) bei 120°C im Schnellkochtopf. Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde mit 3%igem Wasserstoffperoxid gehemmt. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit einem polyklonalen Kaninchen anti-Maus Renin-Antikörper (1:500) inkubiert, gewaschen und anschließend mit einem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (DAKO) inkubiert. Nach der Inkubation mit dem 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Chromogen, wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt, dehydriert, mit Permount-Eindeckmedium eingedeckt (Fisher Scientific) und Deckgläser aufgebracht. Die Objektträger wurden unter einem Zeiss-Mikroskop betrachtet. Zur Evaluierung der Renin-Proteinexpression in den Nieren von Streptozotocin-behandelten Mäusen und Vehikel-Kontrollmäusen (n=9 in jeder Gruppe) wurde eine semiquantitative Analyse der Immunoperoxidase-gefärbten Nierenschnitte durchgeführt [27]. Zwei geblindete Beobachter evaluierten die Reninfärbung im juxtaglomerulären Apparat (JGA) und Sammelrohren, drei geblindete Beobachter die in den proximalen Tubuli. Der prozentuale Anteil der JGA mit sichtbarer Reninfärbung, die Anzahl der Sammelrohre mit Reninfärbung und die Intensität der Reninfärbung in den proximalen Tubuli wurden in zufälligen Sichtfeldern (5 Sichtfelder pro Nierenschnitt) evaluiert. Der prozentuale Anteil von Renin-positiven JGA (JGA-Index) wurde wie folgt berechnet: Zahl der Renin-positiven JGA in allen Schnitten x 100 / (Gesamtzahl der beobachteten Glomeruli) [32]. Alle Schnitte wurden Beobachter-geblindet in 20-facher Vergrößerung untersucht und nur JGA mit einer klassischen runden Form wurden in die Evaluation herangezogen [27].

### **Immunfluoreszenz**

Kryostatschnitte von 7 µm wurden aus gefrorenen Blöcken von Ren1d-Cre;mT/mG Mäusenieren geschnitten und anschließend einer Immunfärbung für Renin und Aquaporin 2 (AQP2) ausgesetzt

(1:200, Santa Cruz Biotechnology). Die Nierenschnitte von Kontroll- und diabetischen Mäusen (n=5 in jeder Gruppe) wurden auf das Vorliegen von GFP in den Epithelzellen der Sammelrohre mithilfe der Kolokalisation mit AQP2-Immunfluoreszenz geprüft. Die Nierenschnitte wurden für exemplarische Ausschnitte mit einem Weitfeldmikroskop (Nikon) und für die Großbildanalyse mit einem Konfokal-Lasermikroskop (Nikon) dargestellt. Zur Quantifizierung und Analyse der Kolokalisation zwischen GFP und AQP2 wurde mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms Fiji (ImageJ) der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. Desweiteren wurde mithilfe von Fiji anhand von Großbildern die Berechnung der Kolokalisierungsfläche von GFP und AQP2 pro Gesamtfläche des Nierenschnitts durchgeführt. Zusätzlich wurden die Nierenschnitte mittels semiquantitativer Analyse durch zwei geblindete Beobachter auf das Vorhandensein von GFP+ Zellen im Bereich der parietalen Epithelzellen sowie im Kapillarnetz des Glomerulus in Kontroll- und diabetischen Ren1d-Cre;mT/mG untersucht und prozentuell dargestellt [27].

### **Mikrodissektion von Tubulussegmenten**

Die Streptozotocin-behandelten Mäuse und Kontrollen wurden mit einer Überdosis an Euthasol (390 mg Pentobarbitol-Na und 50 mg Phenytoin-Na pro ml) euthanasiert. Beide Nieren wurden rasch entfernt und in eine eisgekühlte HEPES-Lösung gelegt. Nach der Entfernung von Nierenkapsel und -becken, wurden die Nieren in 1-2 mm dicke Längsschnitte geschnitten. Drei bis vier Schnitte konnten dadurch aus jeder Niere gewonnen werden. Für die Präparierung der Tubuli, wurden 1-2 mm dicke Schnitte der entsprechenden Region unter einem Stereomikroskop freigelegt und in eine vorgewärmte Verdauungslösung gelegt. Kortikales und äußeres medulläres Gewebe wurde anschließend in einer Verdauungslösung aus 4 ml MEM (GibcoBRL), 5mM Glycin, 6 mg/ml Trypsininhibitor Typ II-S (Sigma T-9128) und 250 g/ml Kollagenase (Sigma C-9891), bei pH 7,4 und 37°C in einem Wasserbad für 25 Minuten inkubiert. Wenn das Medium bei leichtem Schütteln trüb wurde, wurde die Verdauung gestoppt, indem die Tubuli auf Eis verlegt, der Überstand entfernt und mit 4 ml eisgekühlter 1% BSA-HEPES-Lösung ersetzt wurde. Die BSA-HEPES-Lösung wurde nach 10 Minuten anschließend durch eine eisgekühlte HEPES-Lösung ersetzt und die Tubuli wurden bis zur Nutzung auf Eis gelagert. Nachdem 0,5 ml der Tubulus-Suspension mit 10 ml eisgekühlter HEPES-Lösung verdünnt wurde, wurden die isolierten Tubuli bei 4°C unter einem Stereomikroskop selektiert. Die einzelnen Tubulussegmente wurden anhand ihres Aussehens und Topologie identifiziert. Für die proximalen Tubulussegmente wurde S1 als proximaler Tubulus, das direkt vom Glomerulus abgeht, S2 als gerader Teil im medullären Strahl und S3 als proximaler Tubulus in der äußeren Medulla identifiziert. Die kortikalen Sammelrohre wurden aus den medullären Strahlen des Kortex disseziert. Ungefähr 100

proximale Tubulussegmente und 30 kortikale Sammelrohrsegmente wurden aus jeder Mausnieren disseziert [27].

### **Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**

Die gesamte RNA aus Nierenkortexgewebe wurde mit dem Trizol-Reagenz (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gewonnen. Konstante Mengen von 1 µg extrahierter Nierenkortex-RNA als auch die gesamte RNA, die aus den mikrodisssezierten Tubuli gewonnen wurde (mit dem Arcuturus PicoPure RNA Kit von Applied Biosystems) wurden mit Reverse-Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt. Die Synthese von cDNA wurde mit dem Reverse-Transkriptions-Kit auf einem GenAmp PCR-System 9700 (beides von Thermo Fischer Scientific) mit Standardzyklusparametern durchgeführt. Die quantitative PCR-Analyse erfolgte auf einer 96-Wellplatte mit einem Step One Plus PCR System (Thermo Fischer Scientific). GAPDH wurde als interne Kontrolle für die Normalisierung verwendet. Jede Reaktion erfolgte in Duplikaten. Es wurden Primer-Sequenzen für Megalin, Mannose-6-Phosphat und Renin verwendet [27].

### **Statistische Analyse**

Die Normalitätsprüfung erfolgte mit dem Shapiro-Wilk-Test. Normalverteilte Daten wurden als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler beschrieben. Nicht-normalverteilte Daten wurden als Median und Quartilsabstand beschrieben. Differenzen zwischen zwei Gruppen wurden bei normaler Verteilung mit einem zweiseitigen T-Test, und bei nicht-normaler Verteilung mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test berechnet. Um die Korrelation zweier Variablen zu analysieren, wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient für normalverteilte Daten und der Spearman-Korrelationskoeffizient für nicht-normalverteilte Daten berechnet. Die Analyse von Kontingenztafeln erfolgte anhand des exakten Fisher-Tests (Chi-Quadrat-Test). Das Zusammenspiel zwischen zwei unabhängigen Variablen wurde mit einer zweifachen ANOVA bestimmt. Die statistische Signifikanzgrenze wurde als p-Wert  $<0,05$  gesetzt. IBM SPSS (Version 25) und GraphPad Prism (Version 8) wurden als statistische Analysesoftware herangezogen [27].

### 3. Wesentliche Ergebnisse

Um Konzentrationsabweichungen zwischen Urinproben zu normalisieren, wurden alle Urinwerte in Relation zu den jeweilig gemessenen Kreatininwerten gesetzt.

#### **Renin im Urin bei Patienten mit und ohne diabetische Nephropathie**

Zunächst wurden die Reninwerte im Urin von Patienten mit und ohne diabetische Nephropathie gemessen. Die Konzentrationen von aktivem Renin im Urin waren bei Patienten mit diabetischer Nephropathie (n=36) signifikant höher als bei Patienten mit lang bestehendem Diabetes ohne Nephropathie (n=38) (3,2 (2,1; 9,5) vs. 1,3 (0,5; 2,8) pg/mg Kreatinin;  $p < 0,001$ ) [27].

#### **Endogenes Renin im Urin und Plasma von Streptozotocin-behandelten Mäusen**

Als nächstes wurde Renin im Urin und Plasma von Versuchsmäusen mit und ohne Streptozotocin-induziertem Diabetes gemessen. Es zeigte sich 8 Wochen nach der letzten Streptozotocin-Injektion eine signifikante Erhöhung für Renin im Urin von Streptozotocin-behandelten Mäusen (n=15) im Vergleich zu Kontrollmäusen (n=8) ( $455 \pm 106$  vs.  $113 \pm 27$  pg/ mg Kreatinin;  $p = 0,005$ ) [27]. Diese Erhöhung war mit fortschreitender Krankheitsdauer umso stärker (20 Wochen post-Streptozotocin:  $549 \pm 15$  vs.  $157 \pm 6$  mg/dl;  $p < 0,01$ ) [27].

Aufgrund einer ungenügenden Menge an vorhandenem Blutplasma wurde beschlossen, die Plasma-Renin-Aktivität auf indirektem Wege zu bestimmen, anhand eines Verfahrens, was von Domenig et al. beschrieben wurde [33]. Bei diesem Verfahren dient die Summe von durch LC-MS/MS gemessenes Angiotensin I und II als Surrogatmarker für die Plasma-Renin-Aktivität. Die errechnete Plasma-Renin-Aktivität aus der Summe von Plasma-Angiotensin I und II war bei Streptozotocin-injizierten Mäusen niedriger als in Kontrollmäusen, jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant ( $83 \pm 52$  vs.  $267 \pm 179$  pg/ml;  $p = 0,230$ ) [27].

#### **Die Wirkung von Lysin-Injektionen auf endogenes Renin im Urin**

##### Nicht-diabetische Mäuse:

Renin im Urin war bei Mäusen, die mit Lysin injiziert wurden (n=7) mehr als 100-fach erhöht im Vergleich zu Mäusen, die nicht mit Lysin injiziert wurden (n=8) ( $8950 \pm 2337$  vs.  $64 \pm 19$  pg/mg Kreatinin;  $p = 0,001$ ) [27]. Diese Daten zeigen, dass Lysin durch die Blockade der proximalen tubulären Resorption, zu einer massiven Erhöhung der Reninausscheidung im Urin führt.

### Diabetische Mäuse:

Renin im Urin von Lysin-injizierten Mäusen (n=8) war im Vergleich zu nicht-injizierten Mäusen (n=15) ca. 10-fach erhöht (11372±4126 vs. 1093±319 pg/mg Kreatinin; p<0,001) [27]. Der relative Anstieg von Renin ist nach Lysin-Injektion bei nicht-diabetischen Mäusen höher als bei diabetischen Mäusen (≈100-facher vs. ≈10-facher Anstieg). Dies deutet auf eine reduzierte Resorption von Renin bei diabetischen Mäusen hin, was durch folgende Betrachtung nochmals veranschaulicht wird:

Vergleicht man Renin im Urin von diabetischen mit nicht-diabetischen Mäusen ohne jegliche Resorptionsblockade durch Lysin, so ist Renin bei diabetischen Mäusen signifikant höher als bei nicht-diabetischen Mäusen (1093±319 vs. 64±19 pg/mg Kreatinin; p<0,001), während bei Lysin-injizierten Mäusen der Anstieg von Renin im Urin von diabetischen Mäusen im Vergleich zu nicht-diabetischen Mäusen keinen statistisch signifikanten Unterschied mehr aufweist (11372±4126 vs. 8950±2337 pg/mg/ Kreatinin; p= 0,908) [27].

### **Exogenes Renin im Urin nach Injektion mit rekombinantem humanem Renin und Lysin**

Um diesen Zusammenhang ohne den potentiellen Störfaktor einer tubulären Reninsynthese zu erörtern, wurde rekombinantes humanes Renin diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen verabreicht. Das hierbei im Urin gemessene humane Renin liefert einen Schätzwert für das renal verarbeitete exogen-applizierte Renin und schließt die tubuläre Synthese von endogenem Renin als Quelle aus.

Humanes Renin war im Urin von diabetischen Mäusen um ein ca. 25-faches höher als bei nicht-diabetischen Mäusen (779±625 vs. 30±11 pg/mg Kreatinin; p=0,032) [27]. Es steht also fest, dass humanes Renin gefiltert werden kann, aber nicht, in welchem Ausmaß die Resorption eine Rolle spielt. Um diesen Faktor zu erörtern, wurde Lysin zusammen mit humanem Renin injiziert. Bei nicht-diabetischen Mäusen stieg humanes Renin mit Lysin im Vergleich zu ohne Lysin um das ca. 60-fache an (1720±1151 vs. 30±11 pg/mg Kreatinin; p=0,001), während bei diabetischen Mäusen humanes Renin nur um ca. das 3-fache anstieg und keine statistische Signifikanz erreichte (2418±994 vs. 779±625 pg/mg Kreatinin; p=0,05) [27]. Zudem zeigte sich bei Lysin-Injektion zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen kein statistisch signifikanter Unterschied im humanen Renin (2318±994 vs. 1720±1151 pg/mg Kreatinin; p=0,368) [27], die Werte sind also vergleichbar hoch. Diese Daten belegen eine gestörte Resorption von Renin im proximalen Tubulus bei diabetischen Mäusen.

### **Renin-Immunfärbung von Mäusenieren**

Zur Darstellung der genauen Lokalisation des Renin-Proteins innerhalb des Nephrons wurden mithilfe von immunhistochemischen Färbungen die Nieren von diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen untersucht. Übereinstimmend mit den Befunden von Kang et al. [11] fanden wir, verglichen mit nicht-diabetischen Mäusen, in den Nieren von diabetischen Mäusen eine schwächere Reninfärbung im juxtaglomerulären Apparat und eine stärkere Färbung in den Sammelrohrzellen [27]. Zusätzlich beobachteten wir eine Anfärbung entlang des Bürstensaums der proximalen Tubuli, die bei diabetischen Mäusen signifikant weniger ausgeprägt war als bei nicht-diabetischen Mäusen ( $0,59 \pm 0,08$  vs.  $1,09 \pm 0,09$  mittlere Intensität/Fläche;  $p=0,0012$ ) [27]. Die geringere Anfärbung der proximalen Tubuli bei diabetischen Mäusen ist konform mit einer dortigen Resorptionsstörung.

### **Megalin-mRNA im Kortex von Mäusenieren**

Als nächstes wurde Megalin als wichtiger Rezeptor für Resorptionsvorgänge im proximalen Tubulus untersucht. Hierzu wurde die mRNA von Megalin mittels Reverse-Transkriptase-Real-Time-PCR in den Nierenkortexen von diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen gemessen. Megalin-mRNA wurde dabei bei diabetischen Mäusen zu signifikant geringeren Werten als bei nicht-diabetischen Mäusen gemessen ( $0,70 \pm 0,09$  vs.  $1,01 \pm 0,04$ ;  $p=0,01$ ) [27]. Diese Daten ergänzen sich gut zu der nachgewiesenen Resorptionsstörung im proximalen Tubulus bei Diabetes mellitus und könnten als dessen molekularbiologische Grundlage dienen.

### **Renin-mRNA im Nierenkortex und in mikrodisezierten Tubuli von Mäusen**

Die bei diabetischen Mäusen verminderte Reninfärbung in den proximalen Tubuli und verstärkte Färbung in den Sammelrohren könnten neben Resorptionsvarianzen auch Ausdruck einer unterschiedlichen Genexpression an den jeweiligen Tubulusabschnitten sein. Daher analysierten wir die Renin-mRNA-Expression in mikrodisezierten proximalen Tubuli und Sammelrohren von diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen. Es konnten hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen festgestellt werden, was folglich gegen eine Reninsynthese und für ein Resorptionsgeschehen spricht [27]. Desweiteren untersuchten wir die Renin-mRNA im Nierenkortex der Mäuse, welche hauptsächlich die juxtaglomerulären Apparate widerspiegelt: Sie war in diabetischen ( $n=12$ ) im Vergleich zu nicht-diabetischen Mäusen ( $n=11$ ) signifikant niedriger ( $0,78 \pm 0,1$  vs.  $1,39 \pm 0,3$ ;  $p=0,04$ ) [27].

## **Verteilung von Reninlinienzellen in Renin-Reporter-Mäusen (Ren1d-Cre;mT/mG) mit Streptozotocin-induziertem Diabetes**

Zur weiteren Erforschung einer möglichen tubulären Reninsynthese, wurde ein zweifach transgenes Mausmodell (Ren1d-Cre;mT/mG) genutzt, bei dem Zellen der Reninlinie (mG-positiv) von anderen Zellen unterschieden werden können, was eine Verfolgung dieser Zellen ermöglicht [28]. Aquaporin 2 wurde als Marker für die Hauptzellen der Sammelrohre genutzt. Mittels Konfokal-Lasermikroskopie wurde die Überlagerung von mG-positiven und Aquaporin 2-positiven Sammelrohrzellen analysiert. Es wurde kein Unterschied zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen festgestellt (Pearson Korrelationskoeffizient:  $0,34 \pm 0,04$  vs.  $0,31 \pm 0,04$ ;  $p=0,632$ ) [27]. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit dem obig beschriebenen Befund der Renin-mRNA-Expression in mikrodisssezierten Sammelrohren.

Als nächstes untersuchten wir die Verteilung der Reninlinienzellen in den Glomeruli von diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen. Bei beiden fanden sich mG-positive Zellen innerhalb der Bowman-Kapsel des Glomerulus und in geringerem Maße intraglomerulär in den Mesangialzellen, wobei keine Unterschiede zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen gefunden wurden [27].

Um festzustellen, welche Reninlinienzellen mit dem Renin-Protein assoziiert sind, wurde an den Nierenschnitten der Reportermause eine Proteinmarkierung für Renin durchgeführt. Neben einer positiven Kolo-kalisation zwischen Renin-Protein und Reninlinienzellen nahe dem vaskulären Pol der Glomeruli, dem physiologischen Ort der Reninsynthese und daher zu erwarten war, fanden wir nur sehr wenige tubuläre epitheliale Strukturen, die eine Kolo-kalisation mit Reninlinienzellen aufwiesen [27]. Zusammenfassend liefern die Daten der Renin-Reportermause keine Hinweise auf eine Migration von Zellen der Reninlinie bei diabetischen Mäusen in die Sammelrohre oder tubulären epithelialen Strukturen.

## **Schlussfolgerungen**

Insgesamt betrachtet, zeigen unsere Daten sowohl bei Patienten mit diabetischer Nephropathie bei Typ 1 Diabetes, als auch bei Mäusen mit Streptozotocin-induzierter diabetischer Nephropathie, erhöhtes Renin im Urin. Die gestörte proximale tubuläre Resorption von filtriertem Renin bei diabetischer Nephropathie trägt zu dieser Erhöhung bei, wahrscheinlich aufgrund einer verminderten Expression des Megalin-Rezeptors. Die Versuche mit diabetischen Renin-Reportermausen, zeigten weiterhin keine Hinweise auf eine Migration von Zellen der Reninlinie zu den Sammelrohren oder in epitheliale tubuläre Strukturen, die für eine Reninsynthese verantwortlich sein könnten. Unsere Daten bestätigen die Präsenz von vermehrtem (Pro)renin in

den Sammelrohren diabetischer Mäuse [11], aber verdeutlichen nun, dass anders als bisher vermutet, nicht die lokale Synthese in tubulären Strukturen, sondern wahrscheinlich die Resorption dafür verantwortlich ist.

#### **4. Klinische Anwendung, mögliche Limitationen und weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen**

Als Schlüsselenzym des Renin-Angiotensin-Systems spielt Renin eine essentielle Rolle in der Regulierung des Salzhaushaltes, des Blutdrucks und der glomerulären Hämodynamik. Dabei spielt die Konzentration des im Blutkreislauf zirkulierenden Renins, welches im juxtaglomerulären Apparat synthetisiert wird, eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems [16]. Es ist daher möglich, dass eine Erhöhung des Reningehalts im Urin, möglicherweise durch eine verstärkte lokale Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems, pathophysiologische Konsequenzen hat. Dabei ist besonders die Interaktion von Renin mit dem (Pro)renin-Rezeptor von Interesse: Die Bindung von Renin mit dem (Pro)renin-Rezeptor vervierfacht die katalytische Effektivität von Renin und aktiviert Angiotensin II-unabhängig profibrotische intrazelluläre Signalwege [19, 34].

Unsere Arbeit eröffnet zudem neue Blickwinkel auf das Renin-Paradox: Eine Überaktivierung des Renin-Angiotensin-System bei Diabetes mellitus führt auf indirektem Wege zu einer Hemmung der Reninsynthese in den juxtaglomerulären Zellen [3, 5]. Das im Plasma zirkulierende Renin wird dadurch erniedrigt. Dies ist mit unseren Daten vereinbar, die zeigen, dass bei Diabetes-Mäusen sowohl Reninfärbung im juxtaglomerulären Apparat als auch die mRNA-Werte im Nierenkortex vermindert sind. Das im Urin ausgeschiedene Renin ist aufgrund der Resorptionsstörung jedoch hoch, weil gefiltertes Renin physiologisch zu >95% tubulär resorbiert wird [22] und daher bereits geringe Veränderungen in der Expression von Megalin große Auswirkungen auf den Reningehalt im Urin haben, was die Diskrepanz zwischen Plasma-Renin und Urin-Renin erklärt.

Als mögliche Limitationen unserer Arbeit können folgende Punkte diskutiert werden: Wir haben neben dem Assay, das humanes aktives Renin im Urin misst, auch ein Assay benutzt, welches Gesamtrenin, also aktives Renin und Prorenin, messen sollte (im Abschnitt zu Methoden näher geschildert). Unsere Messergebnisse mit dem Assay für Gesamtrenin zeigten jedoch Werte, die um ein Vielfaches höher war als zu erwarten und nicht plausibel waren. Auch Roksnoer et al. [35]

demonstrierten künstlich überhöhte Gesamteninwerte bei diesem Assay. Es stellt sich also das Problem heraus, dass unterschiedliche Assays unterschiedliche Standards für die Messungen verwenden und absolute Zahlenwerte untereinander nicht vergleichbar sind. Weiterhin können wir in unseren Studien nicht ausschließen, dass das erhöhte Renin, das wir im Urin von diabetischen Mäusen finden, teilweise durch eine Umwandlung von Prorenin zu Renin in den Sammelrohren entstammt. Es ist auch zu erwähnen, dass das genutzte Mausmodell für diabetische Nephropathie trotz der weit verbreiteten Nutzung und allgemeinen Akzeptanz keine absolute Darstellung der diabetischen Nephropathie im Menschen ist. Eine weitere mögliche Limitation ist der Umstand, dass in unserer Patientenkohorte diabetische Nephropathie nicht anhand einer Nierenbiopsie bestätigt wurde. Der Einschluss von Patientin mit nicht-diabetischer Niereninsuffizienz ist durch unsere strengen Aus- und Einschlusskriterien zwar sehr unwahrscheinlich, aber dennoch möglich.

Aus dieser Arbeit ergeben sich neue Fragestellungen, die in zukünftigen Studien erforscht werden sollten: Die Bedeutung einer beeinträchtigten Resorption bei der diabetischen Nephropathie wurde in dieser Arbeit verdeutlicht. Dabei wirft besonders Megalin viele unbeantwortete Fragen auf, die von großem Interesse sind: Es ist noch unklar, was sich intrazellulär nach der Megalin-abhängigen Endozytose von Renin in den Zellen des proximalen Tubulus abspielt. Denkbar wären neben dem intrazellulären Abbau beispielsweise die Sekretion von Renin in das renale Interstitium. Es stellt sich zudem die Frage, wie die Expression von Megalin reguliert wird. Es gibt hierzu Daten, die Angiotensin II als möglichen Suppressor für die Megalin-Expression im proximalen Tubulus ins Licht rücken [36]. Welche Bedeutung hätte Megalin dabei als Marker für die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems? Und könnte Urin-Renin als Marker für die Expression von Megalin und damit für die Aktivität des renalen Renin-Angiotensin-Systems fungieren? Weiterhin bleibt die Frage offen, wie genau im diabetischen Setting die Resorption von Renin oder Prorenin im Sammelrohr abläuft, welche Rezeptoren involviert sind, welche funktionelle Rolle das resorbierte Renin oder Prorenin spielt. Der (Pro)renin-Rezeptor könnte eine Möglichkeit darstellen, jedoch muss aufgrund der geringen Bindungsaffinität für Renin und Prorenin nach alternativen Möglichkeiten der Renin oder Proreninaufnahme in Sammelrohrzellen geforscht werden. Schließlich wiesen wir im Mausmodell für diabetische Nephropathie eine verminderte Reninfärbung im juxtaglomerulären Apparat und eine verminderte Expression von Renin mRNA nach. Zukünftige Studien sollten untersuchen, wie sich dies bei Patienten mit diabetischer Nephropathie verhält und ob sich die Erkenntnisse aus dem Mausmodell extrapolieren lassen. Es ist nicht abschließend geklärt ob das erhöhte Renin im Urin, das im Rahmen von diabetischer Nephropathie auftritt, eine vermehrte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems

mit klinischen Auswirkungen repräsentiert. Es wäre sinnvoll die klinischen Parameter der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems, wie Angiotensin II- und Blutdruckveränderungen im Zusammenhang mit Urin-Renin, zu untersuchen. So könnte die Reninausscheidung im Urin als potentieller Biomarker für die erhöhte Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems genutzt werden, was im Rahmen von Diabetes von großem Interesse wäre.

## 5. Referenzen

1. Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010;50:439-65. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105610.
2. Brown JJ, Davies DL, Lever AF, Lloyd AM, Robertson JI, Tree M. A renin-like enzyme in normal human urine. *Lancet.* 1964 Oct 3;2(7362):709-11. doi: 10.1016/s0140-6736(64)92538-3.
3. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotso M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol.* 2014 Jul;4(3):1201-28. doi: 10.1002/cphy.c130040.
4. Bock HA, Hermle M, Brunner FP, Thiel G. Pressure dependent modulation of renin release in isolated perfused glomeruli. *Kidney Int.* 1992 Feb;41(2):275-80. doi: 10.1038/ki.1992.39.
5. Bader M. Of Mice and Renin. *Hypertension.* 2017 Jul;70(1):35-37. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09379.
6. Navar LG, Imig JD, Zou L, Wang CT. Intrarenal production of angiotensin II. *Semin Nephrol.* 1997 Sep;17(5):412-22.
7. Kobori H, Kamiyama M, Harrison-Bernard LM, Navar LG. Cardinal role of the intrarenal renin-angiotensin system in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Investig Med.* 2013 Feb;61(2):256-64. doi: 10.2310/JIM.0b013e31827c28bb.
8. Price DA, Porter LE, Gordon M, Fisher ND, De'Oliveira JM, Laffel LM, Passan DR, Williams GH, Hollenberg NK. The paradox of the low-renin state in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Nov;10(11):2382-91.
9. Lansang MC, Price DA, Laffel LM, Osei SY, Fisher ND, Erani D, Hollenberg NK. Renal vascular responses to captopril and to candesartan in patients with type 1 diabetes mellitus. *Kidney Int.* 2001 Apr;59(4):1432-8. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.0590041432.x.
10. van den Heuvel M, Batenburg WW, Jainandunsing S, Garrelds IM, van Gool JM, Feelders RA, van den Meiracker AH, Danser AH. Urinary renin, but not angiotensinogen or aldosterone, reflects the renal renin-angiotensin-aldosterone system activity and the efficacy of renin-angiotensin-aldosterone system blockade in the kidney. *J Hypertens.* 2011 Nov;29(11):2147-55. doi: 10.1097/HJH.0b013e32834bbcbf.

11. Kang JJ, Toma I, Sipos A, Meer EJ, Vargas SL, Peti-Peterdi J. The collecting duct is the major source of prorenin in diabetes. *Hypertension*. 2008 Jun;51(6):1597-604. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107268.
12. Wysocki J, Goodling A, Burgaya M, Whitlock K, Ruzinski J, Battle D, Afkarian M. Urine RAS components in mice and people with type 1 diabetes and chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017 Aug 1;313(2):F487-F494. doi: 10.1152/ajprenal.00074.2017.
13. Schlueter W, Keilani T, Battle DC. Tissue renin angiotensin systems: theoretical implications for the development of hyperkalemia using angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Am J Med Sci*. 1994 Feb;307 Suppl 1:S81-6.
14. Alge JL, Karakala N, Neely BA, Janech MG, Tumlin JA, Chawla LS, Shaw AD, Arthur JM; SAKInet Investigators. Association of elevated urinary concentration of renin-angiotensin system components and severe AKI. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013 Dec;8(12):2043-52. doi: 10.2215/CJN.03510413.
15. Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev*. 1990 Oct;70(4):1067-116. doi: 10.1152/physrev.1990.70.4.1067.
16. Castrop H, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev*. 2010 Apr;90(2):607-73. doi: 10.1152/physrev.00011.2009.
17. Taugner R, Hackenthal E, Inagami T, Nobiling R, Poulsen K. Vascular and tubular renin in the kidneys of mice. *Histochemistry*. 1982;75(4):473-84. doi: 10.1007/BF00640599.
18. Luetscher JA, Kraemer FB, Wilson DM, Schwartz HC, Bryer-Ash M. Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications. *N Engl J Med*. 1985 May 30;312(22):1412-7. doi: 10.1056/NEJM198505303122202.
19. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest*. 2002 Jun;109(11):1417-27. doi: 10.1172/JCI14276.
20. Ramkumar N, Kohan DE. The (pro)renin receptor: an emerging player in hypertension and metabolic syndrome. *Kidney Int*. 2019 May;95(5):1041-1052. doi: 10.1016/j.kint.2018.10.042.
21. Batenburg WW, Lu X, Leijten F, Maschke U, Müller DN, Danser AH. Renin- and prorenin-induced effects in rat vascular smooth muscle cells overexpressing the human (pro)renin receptor: does (pro)renin-(pro)renin receptor interaction actually occur?

- Hypertension. 2011 Dec;58(6):1111-9. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.180737.
22. Roksnoer LC, Heijnen BF, Nakano D, Peti-Peterdi J, Walsh SB, Garrelds IM, van Gool JM, Zietse R, Struijker-Boudier HA, Hoorn EJ, Danser AH. On the Origin of Urinary Renin: A Translational Approach. *Hypertension*. 2016 May;67(5):927-33. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.07012.
  23. Mazanti I, Hermann KL, Nielsen AH, Poulsen K. Ultrafiltration of renin in the mouse kidney studied by inhibition of tubular protein reabsorption with lysine. *Clin Sci (Lond)*. 1988 Sep;75(3):331-6. doi: 10.1042/cs0750331.
  24. Pohl M, Kaminski H, Castrop H, Bader M, Himmerkus N, Bleich M, Bachmann S, Theilig F. Intrarenal renin angiotensin system revisited: role of megalin-dependent endocytosis along the proximal nephron. *J Biol Chem*. 2010 Dec 31;285(53):41935-46. doi: 10.1074/jbc.M110.150284.
  25. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Apr;3(4):256-66. doi: 10.1038/nrm778. PMID: 11994745.
  26. Sequeira López ML, Pentz ES, Nomasa T, Smithies O, Gomez RA. Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Dev Cell*. 2004 May;6(5):719-28. doi: 10.1016/s1534-5807(04)00134-0.
  27. Tang J, Wysocki J, Ye M, Vallés PG, Rein J, Shirazi M, Bader M, Gomez RA, Sequeira-Lopez MS, Afkarian M, Batlle D. Urinary Renin in Patients and Mice With Diabetic Kidney Disease. *Hypertension*. 2019 Jul;74(1):83-94. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12873.
  28. Starke C, Betz H, Hickmann L, Lachmann P, Neubauer B, Kopp JB, Sequeira-Lopez ML, Gomez RA, Hohenstein B, Todorov VT, Hugo CP. Renin lineage cells repopulate the glomerular mesangium after injury. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Jan;26(1):48-54. doi: 10.1681/ASN.2014030265.
  29. Eng DG, Kaverina NV, Schneider RRS, Freedman BS, Gross KW, Miner JH, Pippin JW, Shankland SJ. Detection of renin lineage cell transdifferentiation to podocytes in the kidney glomerulus with dual lineage tracing. *Kidney Int*. 2018 May;93(5):1240-1246. doi: 10.1016/j.kint.2018.01.014.
  30. Thelle K, Christensen EI, Vorum H, Ørskov H, Birn H. Characterization of proteinuria and tubular protein uptake in a new model of oral L-lysine administration in rats. *Kidney Int*. 2006 Apr;69(8):1333-40. doi: 10.1038/sj.ki.5000272.

31. Ye M, Wysocki J, Gonzalez-Pacheco FR, Salem M, Evora K, Garcia-Halpin L, Poglitsch M, Schuster M, Batlle D. Murine recombinant angiotensin-converting enzyme 2: effect on angiotensin II-dependent hypertension and distinctive angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor characteristics on rodent and human angiotensin-converting enzyme 2. *Hypertension*. 2012 Sep;60(3):730-40. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.198622.
32. Castellanos Rivera RM, Monteagudo MC, Pentz ES, Glenn ST, Gross KW, Carretero O, Sequeira-Lopez ML, Gomez RA. Transcriptional regulator RBP-J regulates the number and plasticity of renin cells. *Physiol Genomics*. 2011 Sep 8;43(17):1021-8. doi: 10.1152/physiolgenomics.00061.2011.
33. Domenig O, Schwager C, van Oyen D, Leitner M, Ziegelmayr C, Fabsich C, Poglitsch M. Abstract p424: Assessment of the raas-status using triple-a-testing: Combining molecular profiling of hypertension with advanced screening for primary aldosteronism in a single blood test. *Hypertension*. 2017;70:AP424–AP424
34. Gonzalez AA, Zamora L, Reyes-Martinez C, Salinas-Parra N, Roldan N, Cuevas CA, Figueroa S, Gonzalez-Vergara A, Prieto MC. (Pro)renin receptor activation increases profibrotic markers and fibroblast-like phenotype through MAPK-dependent ROS formation in mouse renal collecting duct cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017 Nov;44(11):1134-1144. doi: 10.1111/1440-1681.12813.
35. Roksnoer LC, Verdonk K, Garrelds IM, van Gool JM, Zietse R, Hoorn EJ, Danser AH. Methodologic issues in the measurement of urinary renin. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014 Jul;9(7):1163-7. doi: 10.2215/CJN.12661213.
36. Hosojima M, Sato H, Yamamoto K, Kaseda R, Soma T, Kobayashi A, Suzuki A, Kabasawa H, Takeyama A, Ikuyama K, Iino N, Nishiyama A, Thekkumkara TJ, Takeda T, Suzuki Y, Gejyo F, Saito A. Regulation of megalin expression in cultured proximal tubule cells by angiotensin II type 1A receptor- and insulin-mediated signaling cross talk. *Endocrinology*. 2009 Feb;150(2):871-8. doi: 10.1210/en.2008-0886.

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Jeannette Nhi Tang, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Renin im Urin bei Patienten und Mäusen mit diabetischer Nephropathie" / "Urinary Renin in Patients and Mice with Diabetic Nephropathy" 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 kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Berlin, den 17.09.2021

---

Unterschrift (*Jeannette Tang*)

# AUSFÜHRLICHE ANTEILSERKLÄRUNG AN DER ERFOLGTEN PUBLIKATION

Frau *Jeannette Nhi Tang*, geboren in Neuburg a.d. Donau, hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

**Publikation:** Tang J, Wysocki J, Ye M, Vallés PG, Rein J, Shirazi M, Bader M, Gomez RA, Sequeira-Lopez MS, Afkarian M, Batlle D. Urinary Renin in Patients and Mice With Diabetic Kidney Disease. *Hypertension*. 2019 Jul;74(1):83-94. Epub 2019 May 13.  
doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12873.

## **Beitrag im Einzelnen:**

Jeannette Tang hat zusammen mit Dr. Daniel Batlle das Konzept der vorliegenden Publikation entwickelt. Dr. Batlle ist für den Erwerb der finanziellen Mittel verantwortlich. Dr. Batlle und Dr. Afkarian sind für den Erwerb der Patientenproben und -daten aus dem Kidney Research Institute Diabetic Kidney Disease Repository der Universität von Washington verantwortlich.

## Methoden

Jeannette Tang wurde durch Dr. Wysocki an die Methoden des ELISA, Western Blot, RT-PCR, alle Tierversuche und statistische Analysen herangeführt. Jeannette Tang wurde durch Dr. Minghao Ye an die Methoden der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz herangeführt. Jeannette Tang ist komplett verantwortlich für die Konzeptualisierung und Entwicklung der Methode für die Quantifizierung der Kolo-kalisation der Immunfluoreszenz und deren Durchführung und Auswertung.

Dr. Ariel Gomez und Dr. Maria-Luisa Sequeira-Lopez entwickelten in ihrem Labor an der University of Virginia das Ren1d-Cre:mT/mG Mausmodell. Dr. Batlle ist für die Konzeptualisierung des Mausmodells im Rahmen von Diabetes verantwortlich. Jeannette Tang ist für das Experimentdesign, Durchführung und Auswertung der Experimente verantwortlich, die im Folgenden näher beschrieben werden.

## Durchführung und Auswertung der Experimente

Jeannette Tang zeichnet sich komplett verantwortlich für Design, Durchführung und Auswertung

der Experimente, die den Abbildungen Suppl. 2A+B, Suppl. 3A+B, sowie den Tabellen Suppl. 1 und Suppl. 2 zugrunde liegen. Diese werden daher nicht näher präzisiert.

Jeannette Tang zeichnet sich hauptverantwortlich für die Durchführung und Auswertung der Experimente, die den Abbildungen 3A+B, 4C, 5A-C und Suppl. 4A+B zugrunde liegen. Im Folgenden werden diese Experimente präzisiert:

- Abbildung 3A+B: Jeannette Tang ist verantwortlich für die Pflege der Versuchstiere, Durchführung der STZ-Injektionen, hrRenin-/Lysin-Injektionen, Urinsammlungen, Proteinmessungen und statistische Auswertung. Dr. Wysocki und Mina Shirazi leisteten Unterstützung bei den STZ-Injektionen, hrRenin-/Lysin-Injektionen.
- Abbildung 4C: Jeannette Tang, Dr. Wysocki und Dr. Ye führten die geblindete, semiquantitative Beobachtung der immunhistologischen Nierenschnitte durch. Jeannette Tang führte die Auswertung und statistische Analyse durch.
- Abbildung 5A-C: Jeannette Tang ist für die Pflege der Versuchstiere, Durchführung der STZ-Injektionen, Euthanasie und Gewinnung und Verarbeitung der Nieren bis zur Aufbewahrung verantwortlich. Dr. Wysocki leistete bei den STZ-Injektionen und Euthanasie Unterstützung. Dr. Ye ist für die Weiterverarbeitung der Mäusenieren bis zum Kryostatschnitt verantwortlich. Jeannette Tang und Dr. Ye führten die Bildaufnahmen unter dem Mikroskop durch. Jeannette Tang ist für die Entwicklung und Durchführung der Quantifizierungsmethode für die Kolo-kalisation, sowie die Auswertung verantwortlich.
- Abbildung Suppl. 4A+B: Jeannette Tang ist für die Pflege der Versuchstiere, Durchführung der STZ-Injektionen, Euthanasie und Gewinnung und Verarbeitung der Nieren bis zur Aufbewahrung verantwortlich. Dr. Wysocki leistete Unterstützung bei den STZ-Injektionen und Euthanasie. Dr. Ye ist für die Weiterverarbeitung der Mäusenieren bis zum Kryostatschnitt verantwortlich. Dr. Ye und Dr. Patricia Vallés sind für die geblindete, semiquantitative Analyse zuständig. Jeannette Tang ist für die Auswertung und statistische Berechnung verantwortlich.

Jeannette Tang zeichnet sich teilweise verantwortlich für die Durchführung und Auswertung der Experimente, die den Abbildungen 6A+B zugrunde liegen. Im Folgenden wird dies präzisiert:

Jeannette Tang ist für die Pflege der Versuchstiere, Durchführung der STZ-Injektionen, Euthanasie und Gewinnung und Verarbeitung der Nieren bis zur Aufbewahrung verantwortlich. Dr. Wysocki leistete Unterstützung bei den STZ-Injektionen und Euthanasie. Dr. Ye ist für die Weiterverarbeitung der Mäusenieren bis zum Kryostatschnitt, die Bildaufnahmen und die Auswertung verantwortlich.

Dr. Wysocki ist verantwortlich für die Durchführung und Auswertung der Experimente, die der Abbildung 1A+B zugrunde liegen.

Dr. Wysocki und Johannes Rein zeichnen sich verantwortlich für die Durchführung und Auswertung der Experimente, die den Abbildungen 2A+B und 4A+B zugrunde liegen.

Dr. Ye führte die immunhistologische Verarbeitung für Abbildung 4A-C durch.

Dr. Vallés ist für die Entwicklung, Durchführung und Auswertung der Methode der Mikrodissektion von Tubulussegmenten verantwortlich (Tabelle Suppl. 3).

Dr. Afkarian zeichnet sich verantwortlich für die Durchführung und Auswertung der Experimente, die der Abbildung Suppl. 1 zugrunde liegen.

#### Verfassen des Papers

Jeannette Tang, Dr. Wysocki und Dr. Batlle zeichnen sich verantwortlich für das Schreiben und Erstellen der originalen Manuskript-Version der Publikation. Die strukturelle Gliederung und inhaltliche Formulierung des Papers erfolgte maßgeblich durch Jeannette Tang. Insbesondere die Punkte “Abstract”, “Introduction”, “Methods”, “Results” und “Discussion” wurden maßgeblich durch Jeannette Tang verfasst. An der Erstellung des Punktes “Perspectives” war die Promovendin zu einem großen Teil beteiligt.

Jeannette Tang, Dr. Wysocki, Mina Shirazi, Dr. Gomez, Dr. Sequeira-Lopez, Dr. Vallés, Dr. Afkarian, Prof. Dr. Michael Bader und Dr. Batlle zeichnen sich verantwortlich für die Überprüfung und Überarbeitung des originalen Manuskripts. Jeannette Tang führte zusammen mit Dr. Wysocki und Dr. Batlle die inhaltlichen Korrekturen im Revisionsprozess durch.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers (*Prof. Dr. Michael Bader*, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin)

---

Unterschrift der Doktorandin (*Jeannette Tang*)

## AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST (ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"PERIPHERAL VASCULAR DISEASE"** Selected Category  
 Scheme: WoS

**Gesamtanzahl: 65 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	CIRCULATION	167,719	18.880	0.223630
2	CIRCULATION RESEARCH	52,753	15.211	0.082820
3	HYPERTENSION	36,908	6.823	0.049510
4	STROKE	65,854	6.239	0.088520
5	ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY	34,074	6.086	0.044820
6	THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS	16,701	4.952	0.025770
7	JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS	17,663	4.899	0.034380
8	Journal of Stroke	694	4.750	0.002880
9	ATHEROSCLEROSIS	23,013	4.467	0.039120
10	ANGIOGENESIS	2,712	4.351	0.004860
11	JOURNAL OF HYPERTENSION	16,916	4.092	0.025250
12	EUROPEAN JOURNAL OF VASCULAR AND ENDOVASCULAR SURGERY	8,352	3.877	0.012910
13	International Journal of Stroke	3,825	3.859	0.014880
14	CURRENT OPINION IN LIPIDOLOGY	3,849	3.853	0.006100
15	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY	28,039	3.569	0.027570
16	HYPERTENSION RESEARCH	5,064	3.439	0.006250
17	CURRENT OPINION IN NEPHROLOGY AND HYPERTENSION	3,324	3.370	0.006500
18	SEMINARS IN THROMBOSIS AND HEMOSTASIS	3,876	3.345	0.006270
19	Diabetes & Vascular Disease Research	1,253	3.340	0.003320
20	JOURNAL OF VASCULAR SURGERY	24,792	3.294	0.030300
21	CURRENT HYPERTENSION REPORTS	2,564	3.234	0.006250

## **DRUCKEXEMPLAR DER PUBLIKATION**

Tang J, Wysocki J, Ye M, Vallés PG, Rein J, Shirazi M, Bader M, Gomez RA, Sequeira-Lopez MS, Afkarian M, Batlle D. Urinary Renin in Patients and Mice With Diabetic Kidney Disease. Hypertension. 2019 Jul;74(1):83-94.

DOI: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12873>

























## **LEBENS LAUF**

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



## PUBLIKATIONSLISTE

**Tang J**, Wysocki J, Ye M, Vallés PG, Rein J, Shirazi M, Bader M, Gomez RA, Sequeira-Lopez MS, Afkarian M, Batlle D. Urinary Renin in Patients and Mice With Diabetic Kidney Disease. Hypertension. 2019 Jul;74(1):83-94. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12873.  
Impact Factor: 6,823

**Tang J**, Shirazi M, Ye M, Wysocki J, Vallés PG, Sequeira-Lopez MS, Gomez A, Batlle D. Renin Producing Cells in the Diabetic Kidney. American Society of Nephrology, Kidney Week 2018, San Diego, CA.

**Tang J**, Wysocki J, Rein J, Ye M, Afkarian M, Batlle D. On the Significance of Urinary Renin in Diabetic Kidney Disease: A Critical Role of Impaired Tubular Reabsorption. American Heart Association, Joint Hypertension Scientific Sessions 2017, San Francisco, CA.

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen tiefe Dankbarkeit aussprechen, deren Mitwirkung für diese Arbeit unverzichtbar war.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Daniel Battle, der mir durch den gesamten Prozess bis zum Ende des Projekts unermüdliche Unterstützung, Förderung und Richtung gewährte und durch seine persönliche Betreuung maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beitrug.

Herrn Prof. Dr. Michael Bader danke ich für seine bereitwillige Betreuung des Projekts von Berlin aus. Mein Forschungsaufenthalt an der Northwestern University wäre ohne seine Unterstützung und Wegweisung nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jan Wysocki, der als mein ständiger Ansprechpartner im Labor mich geduldig und gewissenhaft an die Methodik heranführte und mir mit unendlicher Hilfsbereitschaft an guten und schlechten Tagen stets Unterstützung gab. Seine Anwesenheit trug nicht nur maßgeblich zum Erfolg des Projekts bei, sondern gab mir auch ein neues Verständnis für die Welt der Wissenschaft, die mich bis in die Zukunft begleiten wird.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Minghao Ye und Frau Dr. Patricia Vallés für ihre Unterstützung und den stets angeregten Austausch.

Meinen Laborpartnern Tilman Müller und Sheeba Habeeb Ba Aqeel danke für die spaßige und ereignisreiche gemeinsame Zeit in Chicago, die mir immer in guter Erinnerung verbleiben wird.

Zum großen Dank bin ich auch unseren Kollaborationspartnern und Koautoren für die erfolgreiche Zusammenarbeit verpflichtet.

Außerdem danke ich dem Biomedical Exchange Program (BMEP), der es zahllosen Studenten wie mir ermöglicht hat, Forschungserfahrung in den USA zu sammeln.

Schließlich mich gilt mein persönlicher Dank meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinen guten Freunden Anne Wisgalla und Bill Ren, die mir über den gesamten Prozess bis zur Fertigstellung der Arbeit Rückhalt, moralische Unterstützung und willkommene Ablenkungen gaben.