

Aus dem Department für Biomedizinische Wissenschaften  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik  
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Reinhold G. Erben)

**Modulation renaler Fibrose durch WNK-Inhibitoren**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Stephanie Wyrwoll

Wien, im Juni 2020

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Reinhold G. Erben

Begutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Herbert Weissenböck Dipl.ECPHM

## INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	MATERIAL UND METHODEN.....	4
	II.1 Versuchstiere.....	4
	II.2 Die 5/6-Nephrektomie.....	4
	II.3 WNK463 Verabreichung.....	5
	II.4 Herstellung von Paraffinblöcken.....	5
	II.5 Anfertigung von Organschnitten.....	5
	II.6 Picro-Sirius-Red Färbung.....	6
	II.7 Quantifizierung des Fibrosegrades.....	6
	II.8 Statistische Auswertung.....	6
III.	ERGEBNISSE.....	8
IV.	DISKUSSION.....	12
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	14
VI.	SUMMARY.....	15
VII.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	16
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	18
IX.	ABBILDUNGS-/ TABELLENVERZEICHNIS.....	22

## I. EINLEITUNG

Chronische Nierenerkrankungen (CKD) sind ein globales Problem der öffentlichen Gesundheit, von dem mehr als 10% der Weltbevölkerung und mehr als die Hälfte der Erwachsenen über 70 Jahre betroffen sind. Die Erkrankung ist mit einer Reihe schwerer Komplikationen verbunden, darunter eine erhöhte Inzidenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Anämien und metabolischen Knochenerkrankungen (Levey et al. 2015). CKD ist ein allgemeiner Begriff für heterogene Störungen, die die Struktur und Funktion der Niere beeinträchtigen. Die Richtlinien für die Definition und Klassifizierung dieser Krankheit aus dem Jahr 2002 stellten einen wichtigen Schritt in Richtung Anerkennung dieser Krankheit dar, die in ihren frühen Stadien von allgemeinen Internisten behandelt werden sollten. Die Krankheit wird nach dem Schweregrad der Erkrankung klassifiziert, der anhand der glomerulären Filtrationsrate (GFR), der Albuminurie sowie der klinischen Diagnose beurteilt wird. Chronische Nierenerkrankungen können mit Routinelaboruntersuchungen erkannt werden - einige Behandlungen können die Entwicklung verhindern und das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen (Levey und Coresh 2012). Der weitergehende Verlust der Nierenfunktion bei einer CKD ist die Folge einer fortschreitenden Schädigung des Nephrons. Histologisch betrachtet folgt der Verlust des Nephrons in den meisten Fällen chronischer Niereninsuffizienz einem Muster, das als fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) bezeichnet wird und mit tubulärer Degeneration sowie interstitieller Fibrose einhergeht (Kriz et al. 1998).

Ein gängiges Verfahren zur Induktion einer CKD ist die 5/6 Nephrektomie (5/6 Nx). Das Nierenablationsmodell der Ratte wurde erstmals 1932 beschrieben. Die Entfernung eines großen Teils der Nierenmasse führt zu einer allmählichen Zunahme der Proteinurie und fortschreitender Hyperperfusion, Hyperfiltration und Hypertrophie. Bis Woche vier tritt eine frühe Glomerulosklerose auf, die bis Woche acht mit einer segmentalen Sklerose bei etwa 20% der Glomeruli und einer frühen tubulointerstitiellen Fibrose einhergeht. In Woche zwölf findet man dann eine weit verbreitete Glomerulosklerose und tubulointerstitielle Fibrose vor, bis die Tiere typischerweise ab Woche zwölf bis 16 an Urämie sterben (Fogo 2003). Im Laufe der Jahre konzentrierte sich die Wissenschaft jedoch auf die Verwendung von Mausmodellen, da durch die Züchtung von genetisch veränderten Mäusen einfachere und schnellere Möglichkeiten geboten waren, die Pathogenese der CKD zu erforschen (Hewitson et al. 2009, Leelahavanichkul et al. 2010).

Im Laufe des letzten Jahrzehnts wesentliche Belege für die Rolle hoher zirkulierender Werte des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 23 (FGF23) als Prädiktor für einen unerwünschten Ausgang der

Krankheit bei Patienten mit CKD in allen Stadien gesammelt (Kovesdy und Quarles 2013, Wolf 2012, Zoccali et al. 2013). FGF23 ist ein Phosphat-regulierendes Hormon, das von Osteoblasten und Osteozyten sezerniert wird und die Phosphatrückresorption aus dem Urin durch Herabregulierung von Natriumphosphat-Co-Transportern in den proximalen Tubuli der Niere reduziert (Andrukhova et al. 2012, Shimada et al. 2005). Darüber hinaus reguliert FGF23 die renale  $1\alpha$ -Hydroxylase-Expression herunter, wodurch die Produktion des biologisch aktiven Vitamin D-Hormons  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> unterdrückt wird (Shimada et al. 2005). Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz steigen die FGF23-Konzentrationen im Serum mit abnehmender GFR an und können bei fortschreitender Krankheit das 1000-fache des Normwerts erreichen (Gutiérrez 2010, Weber et al. 2003).

Der Grund, warum FGF23 ansteigt, ist nicht ganz klar. Beim Menschen wurde gezeigt, dass der Anstieg des zirkulierenden intakten FGF23 unabhängig von einer Hyperphosphatämie und einem Anstieg des Parathormons (PTH) in frühen CKD-Stadien auftritt (Isakova, Wahl et al. 2011). Daher könnten andere Faktoren wie eine verringerte renale Eliminierung von FGF23 (Mace et al. 2015) oder eine erhöhte Sekretion von Substanzen, die FGF23 stimulieren, an der Hochregulierung der Konzentration von intaktem FGF23 im Blut bei CKD-Patienten beteiligt sein (David et al. 2016, Erben 2016, Kovesdy und Quarles 2013, Zhang et al. 2016). Prospektive Studien an CKD-Patienten haben gezeigt, dass erhöhte FGF23-Spiegel ein unabhängiger Prädiktor von CKD-Fortschritt, linksventrikulärer Hypertrophie (LVH), kardiovaskulärem Risiko sind und Gesamtmortalität sind (Chonchol et al. 2016, Faul et al. 2011, Isakova, Xie et al. 2011). In typischen FGF23-Zielgeweben wie der Niere werden die biologischen Wirkungen von FGF23 durch einen Rezeptorkomplex vermittelt, der aus FGF-Rezeptoren (FGFR) und dem Co-Rezeptor  $\alpha$ Klotho (Klotho) besteht (Chen et al. 2018, Kurosu et al. 2006).

Allerdings ist FGF23 nicht nur ein Phosphat-, sondern auch ein Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )- und Natrium ( $\text{Na}^{+}$ )-regulierendes Hormon. FGF23 erhöht über eine direkte Signalkaskade die apikale Membranhäufigkeit des „Transient receptor potential vanilloid-5“ (TRPV5) und des Natriumchlorid-Co-Transporters (NCC) in den distalen Nierentubuli. An diesen Mechanismen sind der FGFR1c/Klotho-Rezeptorkomplex, die „Extracellular-signal regulated kinase“ (ERK), die „Serum/glucocorticoid-regulated kinase-1“ (SGK1) und die „With-no-lysin-kinase-4“ (Wnk4) beteiligt - somit wird die renale Calciumreabsorption durch FGF23 reguliert (Andrukhova, Slavic et al. 2014, Andrukhova, Smorodchenko et al. 2014).

Zusätzlich zu seiner Rolle bei der Mineralhomöostase ist FGF23 als entzündungsförderndes Molekül aufgetaucht. Es wird nicht nur von Knochenzellen sezerniert, sondern es wurde entdeckt, dass FGF23-mRNA auch im Maus-Thymus exprimiert wird, was darauf hindeutet, dass das Immunsystem beteiligt

ist. Dabei wurden aktivierte dendritische Zellen und Makrophagen identifiziert, die zu erhöhten Serum-FGF23-Spiegeln führten (Masuda et al. 2015), ebenso wie durch Verletzung induzierte Fibroblasten, ein unabhängiger Effekt von  $\alpha$ Klotho (Smith et al. 2017).

Wie in den letzten Jahren deutlich wurde, spielen Kinasen in der Signalübertragung auf Transporter in der Niere eine wichtige Rolle. Unter diesen stechen die WNKs besonders hervor. WNKs regulieren drei Natriumtransporter: den Natriumkaliumchlorid-Co-Transporter Typ 2 (NKCC2), den Natrium-Chlorid-Co-Transporter (NCC) und den epithelialen Natriumkanal (ENaC). Darüber hinaus regulieren WNKs den Aldosteron-regulierten „Renal outer medullary potassium channel“ (ROMK). Da das distale Nephron gegenüber mehreren homöostatischen Hormonen empfindlich ist, können WNKs als molekulare Schalter angesehen werden, die die Transporteraktivität in Abhängigkeit von physiologischen Anforderungen verändern (Hoorn und Ellison 2012). Sie wirken dabei als Komplex von WNK1, 3 und 4 (McCormick et al. 2008). Patienten mit WNK4-Mutationen, die zu einer übermäßigen NCC-Expression in den distalen Tubuli führen, leiden unter Volumenexpansion und Hypertonie (Kahle et al. 2003, Wilson et al. 2001).

Yamada fand 2016 heraus, dass WNK463 ein hochspezifischer pan-WNK-Kinase-Inhibitor ist, der die einzigartigen Strukturmerkmale, die ungewöhnliche Platzierung des katalytischen Lysins, nutzt. WNK463 wurde als erster oral bioverfügbarer pan-WNK-Inhibitor vorgestellt und verbesserte in Nagermodellen sowohl Bluthochdruck als auch die Homöostase von Körperflüssigkeit und Elektrolyten. Jedoch wurde die weitere Entwicklung des Arzneimittels aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen bei höheren Dosierungen gestoppt (Yamada et al. 2016).

Es ist derzeit nicht bekannt, ob die entzündungsfördernden Wirkungen von FGF23 eine Rolle in der Pathophysiologie von CKD spielen. Es ist jedoch anzunehmen, dass FGF23 ein Teil eines Teufelskreises bei der CKD ist, in dem systemische chronische Entzündungsprozesse die Sekretion von FGF23 aus den Knochenzellen vorantreiben, was wiederum die entzündlichen Prozesse und somit auch die Fibrosierung in der Niere weiter fördern. Aufgrund der Tatsachen, dass FGF23 den WNK-Pathway in der Niere aktiviert und dass WNK463 als Inhibitor des WNK-Pathways kürzlich beschrieben wurde, kann man nun die Hypothese aufstellen, ob mit Inhibition durch WNK463 die entzündlichen Prozesse in der Niere bei CKD verbessert werden können.

In der vorliegenden Studie wird nun der Ansatz verfolgt, ob WNK463 in angepasster Dosierung als Inhibitor des WNK-Pathways die Fibrosierung in der Niere bei einer experimentell induzierten CKD verringert.

## **II. MATERIAL UND METHODEN**

### **II.1 Versuchstiere**

Der Tierversuch dieser Studie wurde von der Ethikkommission der Veterinärmedizinischen Universität Wien und vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung genehmigt. Es wurden die geltenden Richtlinien für die Tierversuche strikt eingehalten. Ebenso wurden alle Anstrengungen unternommen, um das Leid der Tiere zu minimieren. Die Tierversuchsnummer lautet: BMWF 68.205/0054-II/3b/2013

Alle Experimente dieses Versuchs wurden an drei Monate alten männlichen C57BL/6-Mäusen durchgeführt. Die Mäuse wurden bei 24 °C mit einem 12 Stunden Hell/12 Stunden Dunkel-Zyklus gehalten und hatten freien Zugang zu einer sogenannten „Rescue diet“ und Leitungswasser. Die Calcium- und Phosphat-angereicherte Rescue diet (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) mit 2,0% Kalzium, 1,25% Phosphor, 20% Laktose und 600 IE Vitamin D/kg wurde ab einem Alter von 16 Tagen gefüttert.

### **II.2 Die 5/6-Nephrektomie**

Die 5/6 Nephrektomie wurde in zwei Schritten (Leelahavanichkul et al. 2010) unter Isoflurananästhesie durchgeführt. Auftretende Schmerzen wurden durch s.c. Injektionen von Buprenorphin, Metamizol und Meloxicam gelindert. Zusätzlich wurde den Tieren für drei Tage nach der Operation das Analgetikum Piritramid über das Trinkwasser verabreicht, beginnend sechs Stunden postoperativ. Im ersten Schritt (Woche 1) wurde die linke Niere entkapselt, um eine Schädigung des Harnleiters und der Nebennieren zu vermeiden, und der obere und untere Pol wurden teilweise über eine Inzision in der linken Flanke reseziert. Die Blutung wurde durch mikrofibrilläre Kollagenhämostase (Gelaspon, Chauvin Ankerpharm) kontrolliert. Der obere und untere Pol wurde gewogen, um eine ausreichende Resektion zu gewährleisten. Eine Woche später wurde als zweiter Schritt die rechte Niere vollständig über einen Schnitt in der rechten Flanke entfernt und gewogen. Bei den Mäusen der Kontrollgruppe mit Scheinoperation (Sham) wurde im ersten Schritt ein Schnitt in der linken Flanke durchgeführt, beide Pole der Niere wurden identifiziert, dann wurde der Flankenschnitt geschlossen. Ein nachfolgender Schnitt in der rechten Flanke wurde im zweiten Schritt durchgeführt. Die rechte Nierenarterie wurde identifiziert, dann wurde der Flankenschnitt geschlossen. Nach jedem Flankenschnitt wurden Muskeln und Haut korrekt neu positioniert und vernäht.

### **II.3 WNK463 Verabreichung**

C57BL/6 5/6 Nx-Mäusen wurde WNK463 in Dosen von 1 und 3 mg/kg Körpergewicht (KG) über eine orale Sonde mit 5 µl/g KG einmal täglich über acht Wochen nach der Nephrektomie verabreicht. Scheinoperierte C57BL/6 -Mäuse (Sham) dienten als Kontrollgruppe und erhielten nur das Lösungsmittel (Vehikel). Als Vehikel wurde eine wässrige Suspension aus 0,5% Pluronic F68 (Fisher Scientific), 0,5% Hydroxypropylcellulose (M.W. 100.000, Sigma-Aldrich) und 99% Wasser (w/w/w) verwendet. WNK463 wurde in 100% Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und dem Vehikel zugegeben, so dass die Endkonzentration von DMSO in allen Dosierlösungen 2% betrug.

### **II.4 Herstellung von Paraffinblöcken**

Acht Wochen nach der Operation wurden alle Tiere durch Euthanasie getötet und die Nieren entnommen. Die zur histologischen Untersuchung verwendeten Nieren lagen über Nacht in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert vor. Zur Vorbereitung der Paraffinblockherstellung mussten die Nieren in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Isopropanol: 20%, 40%, 60%, 80%, 100%) entwässert werden, Xylol diente als Intermediärmedium. Anschließend wurden die Organe vorsichtig mit einer Rasierklinge längs in der Mitte vom Kortex bis zum Hilus der Niere gespalten und die beiden Hälften paarig angeordnet in heißem Paraffin eingebettet. Die entstandenen Paraffinblöcke wurden jeweils mit den Tiernummern zu den zugehörigen Nieren beschriftet.

### **II.5 Anfertigung von Organschnitten**

Für die Herstellung eines aussagekräftigen, repräsentativen Organschnittes mussten die einzelnen Paraffinblöcke dann mit dem Mikrotom HM 355 S-2 (Microm GmbH, Seriennummer 36110) soweit getrimmt werden, bis ein kompletter Längsschnitt durch die Nierenhälften mit allen Bestandteilen gut zu erkennen war. Anschließend wurden Schnitte mit einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt und dann zunächst in ein Bad mit entsalztem kaltem Wasser verbracht. Um eine maximale Ausdehnung des Schnittes im Wachs zu erreichen, wurden die Schnitte noch in einem Wasserbad bei ca. 40 Grad zur Entspannung gebracht, um von dort direkt auf Aminopropyltriethoxysilane (APES)-vorbehandelte Objektträger übertragen zu werden, an denen sie haften bleiben. Anschließend werden die Schnitte im Wärmeschrank bei 40 Grad mindestens 48 Stunden getrocknet, damit sämtliches Wasser verdunstet, bevor man mit der Färbung beginnt.

## **II.6 Picro-Sirius-Red Färbung**

Zur Vorbereitung einer jeden Färbung von Paraffinschnitten müssen diese zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert werden. Dazu werden die Objektträger zunächst 2x15 Minuten in Xylol, jeweils 5 Minuten in Isopropanol, 70% Ethanol, 40% Ethanol und dann 2x2,5 Minuten in destilliertes Wasser getaucht. Die Picro-Sirius-Red-Färbung dient der Sichtbarmachung und Darstellung von Kollagen im Gewebe. Dazu mussten die entparaffinierten Nierenschnitte vollständig getrocknet werden und in eine Edelstahlbox verbracht werden. Dort werden sie mit der Picro-Sirius-Red Solution (Sirius Red F3B 0,5g + Pikrinsäure-Solution 1,3% 500 ml) mittels Pipettierens vollständig bedeckt und unter Lichtschutz 90 Minuten inkubiert. Anschließend werden zwei Waschschrte jeweils 3 Minuten mit Acidified Water (konzentrierte HCL 37% 0,83 ml + destilliertes Wasser 1000 ml) lichtgeschützt durchgeführt. Danach entfernt man das Wasser händisch so gut wie möglich und lässt die Schnitte erneut trocknen, um eine möglichst gute Färbung zu erhalten. Nach der Trocknung durchlaufen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe 2x3 Minuten Isopropanol und 2x7 Minuten Xylol, um dann vorsichtig mit DePeX-Eindeckmedium eingedeckt zu werden. Die Trocknung und Lagerung nach dem Eindecken erfolgte abermals unter Lichtschutz.

## **II.7 Quantifizierung des Fibrosegrades**

Um das Verhältnis von Kollagen, welches durch die Färbung sichtbar gemacht wurde, im Zusammenhang zur Gesamtfläche der Niere auszuwerten, mussten zunächst Bilder der Nieren angefertigt werden. Dazu wurden die angefärbten Schnitte unter dem Mikroskop Axioskop 50 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Seriennummer. 451485) betrachtet. Anschließend wurden vier repräsentative Felder im Kortex der jeweiligen vorliegenden Nieren identifiziert. Von diesen Stellen wurden mittels der Mikroskop-Kamera AxioCam 503 color (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Seriennummer 426558-0000-000) und der zugehörigen Software „ZEN“ auf dem Computer Bilder im .jpg-Format erstellt und zwischengespeichert. Anschließend wurden diese Bilder zur Auswertung ins Programm „ImageJ“ importiert. Da durch die Färbung der Schnitte Kollagen und somit die Fibrosierung rot erscheint, kann das Programm „ImageJ“ alle roten Anteile im Verhältnis zu nicht-roten Anteilen in Prozent umrechnen.

## **II.8 Statistische Auswertung**

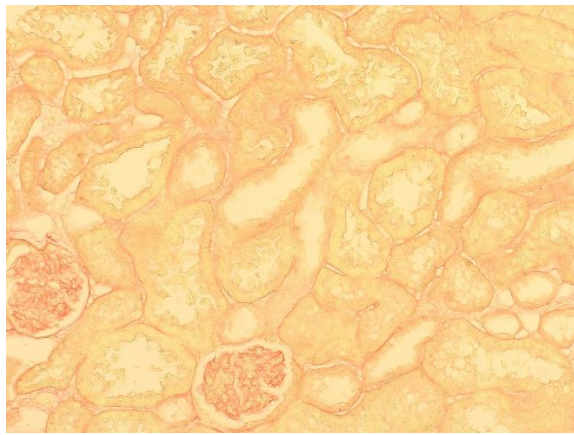
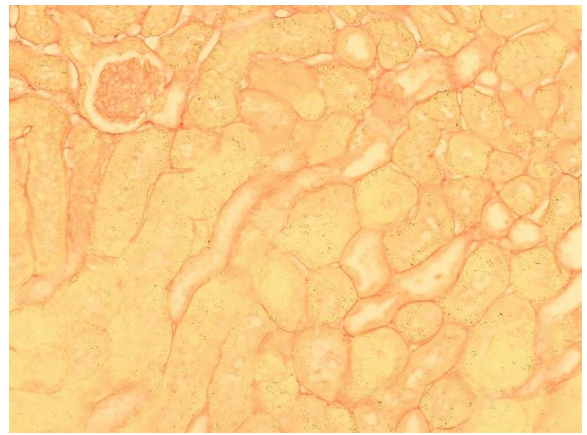
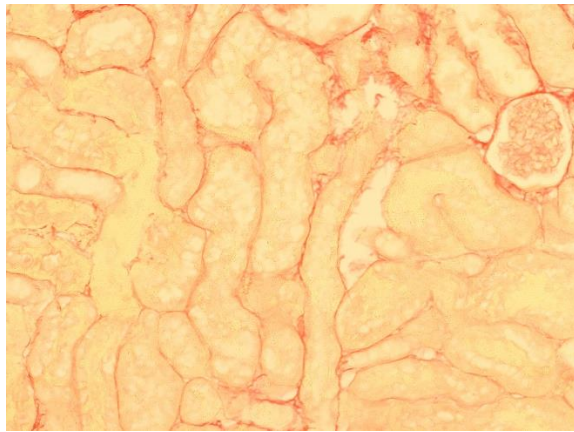
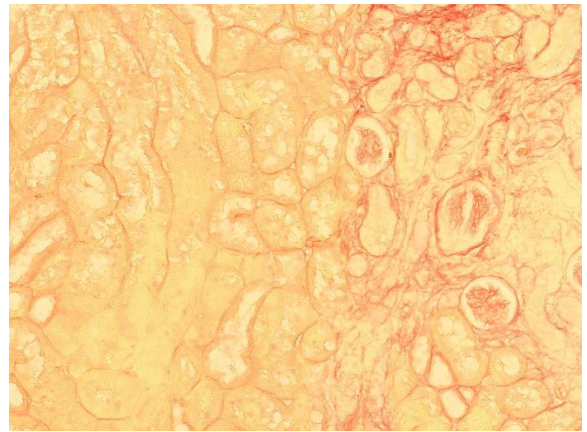
Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm „Prism“ durchgeführt. Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Varianzen wurden mit einem Bartlett's Test überprüft. Anschließend wurde zur genaueren Analyse der Daten ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, im weiteren Verlauf

Mehrfachvergleiche mit dem Dunn's Test. Für alle statistischen Analysen wurde ein p-Wert von 5% ( $p < 0,05$ ) als signifikant angenommen.

### III. ERGEBNISSE

Insgesamt wurden bei der Auswertung vier Gruppen berücksichtigt. Innerhalb dieser vier Gruppen gab es zwei Untergruppen. Zum einen ist dies die Gruppe der 5/6 Nx-Mäuse und zum anderen die Gruppe der scheinoperierten (Sham)-Mäuse. Die Sham-Gruppe bekam nur Vehikel verabreicht, die 5/6 Nx-Gruppe Vehikel oder eine Behandlung mit WNK463 in zwei verschiedenen Dosierungen, 1 und 3 mg/kg KG. Ausgewertet wurde der durch Kollagenfärbung sichtbar gemachte Fibrosegrad in der Niere, der mittels eines Programms in einen Prozentwert umgewandelt wurde. Null entspricht in diesem Fall keine Fibrose, 100 bedeutet vollständig fibrosiert. In der Auswertung entspricht also der Fibrosegrad der „Area in %“.

In der Gruppe der scheinoperierten Tiere unter Zugabe von Vehikel (Sham) wurden Fibrosierungswerte zwischen 0,04% und 0,18% festgestellt. In der Gruppe der 5/6-nephrektomierten-Mäuse, denen Vehikel verabreicht wurde (Nx/V), wurden Werte von 0,185% bis 0,863% erreicht. Bei den Tieren mit 5/6-Nx unter Zugabe von 1 mg/kg KG WNK463 waren Werte von 0,368% bis 0,565% festzustellen. Als letzte Gruppe fungierten die Mäuse mit 5/6 Nx unter Zugabe von 3 mg/kg KG WNK463, bei welchen die Werte zwischen 0,275% und 2,5% variierten. In den folgenden Abbildungen 1 sind repräsentative Fotos der vier verschiedenen Gruppen dargestellt.

**A****B****C****D**

*Abbildung 1: Repräsentative Fotos der Gruppen Sham+Vehikel (A), 5/6 Nx+Vehikel (B), 5/6 Nx+1mg/kg WNK463 (C) und 5/6 Nx+3mg/kg WNK463 (D). Originalvergrößerung x 200.*

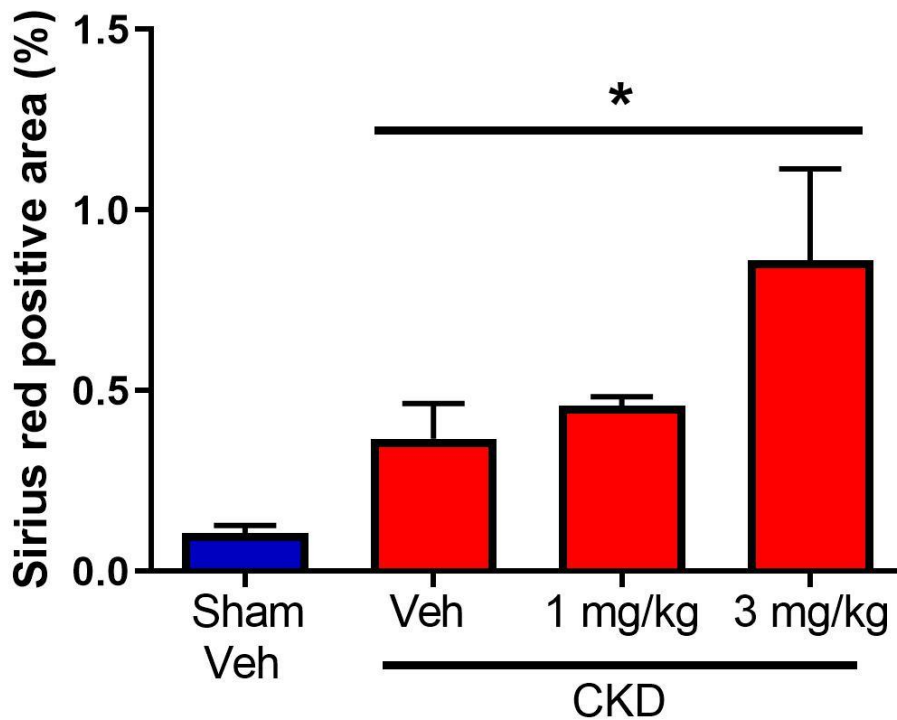


Abbildung 2: Grafische Darstellung des Fibrosegrades (Area in %) geordnet nach Behandlungsmethode

In Abbildung 2 wurde die Verteilung der Werte mittels eines Balkendiagramms geordnet nach Behandlungsmethode dargestellt. Auf der x-Achse ist die Behandlungsmethode der jeweiligen Gruppen angegeben, auf der y-Achse die Area in %.

Die Auswertung zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen erfolgte durch verschiedene statistische Tests, die im Folgenden beschrieben werden.

Zunächst wurde ein Bartlett's Test durchgeführt. Er untersucht Stichproben von normalverteilten Zufallsvariablen daraufhin, ob sie die gleiche Varianz besitzen. Der Test hat ergeben, dass sich die Varianzen zwischen den Gruppen signifikant unterscheiden.

Anschließend wurde ein nicht-parametrischer Test herangezogen, um die Daten genauer zu analysieren. Der Kruskal-Wallis Test untersucht zunächst, ob irgendwelche Gruppen zueinander unterschiedlich sind. Er kann herangezogen werden, wenn die Voraussetzungen für eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) nicht erfüllt sind (fehlende Normalverteilung und Varianzgleichheit). Der Test zeigt ebenso eine Signifikanz an.

Im weiteren Verlauf wurden noch Mehrfachvergleiche mit dem Dunn's-Test durchgeführt, um die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen genauer zu betrachten. Alle 5/6 Nx Gruppen waren hier zu Sham signifikant unterschiedlich.

#### IV. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob mit Inhibition durch WNK463 die entzündlichen Prozesse in der Niere der Maus bei einer experimentell induzierten CKD verbessert werden können. Dazu wurden Nieren von vier verschiedenen Versuchsgruppen histologisch untersucht und der Grad der Fibrose mittels Picro-Sirius-Red Färbung sichtbar gemacht und prozentual ausgewertet.

Bei der Betrachtung der Grafik und der repräsentativen Fotos ist auf den ersten Blick ersichtlich, dass die Werte der Kontrollgruppe deutlich niedriger sind als die der 5/6 Nx-Gruppe. Weiters sieht man, dass innerhalb der 5/6 Nx-Gruppe die Fibrosewerte mit zunehmender Dosierung von WNK463 höher ausfallen als bei Gabe von Vehikel. Dies lässt den Schluss zu, dass die Fibrose durch Gabe von WNK463 nicht verbessert wurde.

Die Auswertung des Bartlett's Test ergab, dass sich die Varianzen zwischen den Gruppen signifikant unterscheiden und dass die vorhandenen Daten nicht normalverteilt sind. Das bedeutet, dass man keine ANOVA zur weiteren Analyse heranziehen konnte, so wurde ein nichtparametrischer Test verwendet, um die Daten genauer zu analysieren.

Beim Kruskal-Wallis Test stellte sich anschließend heraus, dass grundsätzlich Gruppen zueinander signifikant sind. Daher wurden im weiteren Verlauf zur genaueren Betrachtung noch Mehrfachvergleiche mit dem Dunn's Test durchgeführt, die ergaben, dass alle 5/6 Nx-Gruppen zu Sham signifikant sind. Das bedeutet, dass bei allen 5/6 Nx-Gruppen die Fibrose signifikant höher war, als bei der Kontrollgruppe.

Bei der Betrachtung der Werte fällt auf, dass sie einen breiten Streubereich aufweisen. Das Modell zur Induktion der CKD durch 5/6 Nx ist ein Verfahren, das unmöglich immer genau gleich durchgeführt werden kann und somit fällt der experimentell induzierte Krankheitsverlauf unterschiedlich schwer aus bei gleicher Behandlung. Zusätzlich führen interindividuelle Unterschiede zur weiteren unterschiedlichen Ausprägung im Verlauf. Weiters wurden die für die Auswertung angefertigten Fotos durch den Menschen erstellt, der durch subjektive Wahrnehmung repräsentative Stellen im Kortex der jeweils vorliegenden Nieren identifizierte, die in der Vergrößerung den gleichen Anteil an Kollagen zur Gesamtfläche der ganzen Niere ausdrücken sollen. Dies birgt ebenso die Gefahr einer Fehlerquelle im Gegensatz zu ausschließlich computerbasierten Messmethoden.

Verschiedene Erkenntnisse haben zur Hypothese dieser Arbeit geführt. Kriz et al. fand 1998 heraus, dass histologisch bei einer fortschreitenden CKD eine interstitielle Fibrose festgestellt werden kann.

Dies konnte bei der Auswertung bestätigt werden, die Tiere der Gruppe Nx/V wiesen einen Fibrosegrad zwischen 0,185% bis 0,863% in der Niere auf und der dazugehörige statistische Test (Kruskal-Wallis Test), der die Unterschiede zwischen den Gruppen Sham und 5/6 Nx überprüft, war signifikant. Der starke Anstieg von FGF23 im Serum bei Patienten mit fortschreitender CKD (Gutiérrez 2010, Weber et al. 2003) trug dazu bei, dass viele Studien durchgeführt wurden, um die Rolle von FGF23 bei einer CKD zu untersuchen. Dabei stellte man fest, dass FGF23 pro-fibrotische Wirkungen in der Niere hat, indem es durch eine Gewebe-Schädigung induzierte Fibroblasten aktiviert (Smith et al. 2017). Weiters fand man heraus, dass FGF23 den WNK-Pathway in der Niere aktiviert (Andrukhova, Slavic et al. 2014, Andrukhova, Smorodchenko et al. 2014) und WNK463 als oral verfügbarer Inhibitor für den WNK-Pathway eingesetzt werden kann (Yamada et al. 2016). Somit ließ sich die Hypothese aufstellen, dass durch Inhibition mit WNK463 die Entzündung in der Niere zu verbessern ist.

Zusammengefasst deuten die oben beschriebenen Ergebnisse jedoch darauf hin, dass die Inhibition mit WNK463 **nicht** zu einer signifikanten Verbesserung der Fibrose in der Niere bei einer experimentell induzierten CKD führt.

Zu erwähnen wäre an dieser Stelle noch, dass die Auswertung dieses Versuchs nur ein kleiner Teil einer groß angelegten Studie ist. In dieser Studie wurden mehrere Aspekte und Parameter rund um das Thema FGF23 und WNK463 und seine Rolle bei einer experimentell induzierten CKD bei Mäusen untersucht. Dabei fand man heraus, dass FGF23 ein direkter Aktivator des entzündungsfördernden JAK-STAT-Signals im Nierenepithel ist. Die akute Hemmung des FGF23-Signals unter Verwendung eines Anti-FGF23-Antikörpers regulierte die pSTAT3-Spiegel in Nierenepithelzellen in CKD-Mäusen binnen vier Stunden nach der Injektion herunter (unpublizierte Ergebnisse). Dieser Befund könnte erklären, warum WNK463 als Inhibitor des WNK-Pathways die Nierenfibrose nicht bessern konnte.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Chronische Niereninsuffizienz (CKD) ist eine häufige Erkrankung bei Mensch und Tier und somit ein wichtiges Problem der öffentlichen Gesundheit. Das Fortschreiten der Krankheit führt zu einem progredienten Verlust der Nierenfunktion und geht mit einer zunehmenden Fibrosierung der Niere einher. Ein Standardmodell zur Induktion einer CKD ist die 5/6-Nephrektomie (5/6 Nx) bei der Maus. Aus noch ungeklärten Gründen steigen bei CKD-Patienten und auch bei experimenteller CKD die Serumspiegel des Fibroblasten-Wachstumsfaktors-23 (FGF23) stark an. Frühere Studien fanden heraus, dass FGF23 zu einer Aktivierung des With-no-lysin-Kinase (Wnk)-Pathways führt. Wnks spielen eine zentrale Rolle im intrazellulären Transport und bei der Aktivierung von Ionen-Transportern im distalen Nephron. Kürzlich wurde ein Inhibitor des Wnk-Pathways (Wnk463) beschrieben, der einer der ersten oral bioverfügbaren Wnk-Inhibitoren ist und im 5/6 Nx-Modell erste positive Wirkungen auf die Nierenfunktion zeigte. Daraus ließ sich nun die Hypothese aufstellen, ob Wnk463 auch eine positive Wirkung auf die Fibrosierung in der Niere ausübt.

Dazu wurden vier Gruppen mit jeweils fünf bis acht C57BL/6-Mäusen für den Versuch herangezogen. Innerhalb dieser vier Gruppen gab es zwei Untergruppen. Bei der einen Gruppe wurde an allen Mäusen eine 5/6 Nx durchgeführt, bei der anderen Gruppe wurde eine Scheinoperation vollzogen. Die Kontrollgruppe der scheinoperierten Mäuse bekam Vehikel verabreicht und die 5/6 Nx-Gruppe bekam eine Behandlung mit Wnk463 in zwei verschiedenen Dosen oder Vehikel verabreicht. Nach acht Wochen wurden die Tiere euthanasiert und die Nieren entnommen. Für die Auswertung wurden anschließend die Nieren in Paraffin eingebettet, Schnitte angefertigt und mittels Picro-Sirius-Red-Färbung gefärbt. Die Färbemethode sorgt dafür, dass Kollagenfasern in den Schnitten rot erscheinen. Anschließend wurde mittels Bildanalyse der Grad der Fibrose in der Niere quantifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Bartlett's Test, Kruskal-Wallis-Test und Mehrfachvergleiche inklusive Dunn-Test.

Insgesamt kam man durch die Ergebnisse zum Erkenntnis, dass die Inhibition mit Wnk463 nicht zu einer signifikanten Verbesserung der Fibrose in der Niere bei einer experimentell induzierten CKD führt.

Die Gründe, warum die Fibrose nicht verbessert werden konnte, sind mit den Ergebnissen dieses Versuchs nicht eindeutig zu erklären. Zur eindeutigen Klärung sollten weitere Versuche und Parameter an CKD-Mäusen durchgeführt werden, die Aufschluss über die Thematik geben.

## VI. SUMMARY

Chronic Kidney Disease (CKD) is a common disease in humans and animals and therefore an important public health problem. The progression of the disease leads to a progressive loss of renal function and is associated with increasing fibrosis of the kidney. A standard model for the induction of CKD is 5/6 nephrectomy (5/6 Nx) in mice. For unknown reasons, the serum levels of fibroblast-growth-factor-23 (FGF23) increase significantly in CKD patients and also in experimental CKD. Previous studies found that FGF23 is responsible for the activation of the With-No-Lysin-Kinase (WNK)-pathway. WNKs play a central role in intracellular transport and in the activation of ion transporters in the distal nephron. Recently, an inhibitor of the WNK pathway has been described, WNK463, which is one of the first orally bioavailable inhibitors and showed first positive effects on renal function in the 5/6 Nx model. Therefore, we hypothesized that WNK463 might also have positive effects on fibrosis in the kidney.

Four groups of five to eight C57BL/6 mice each were selected for the experiment. Within these four groups there were two subgroups. In one group, a 5/6 Nx was performed on all mice, the other group underwent a sham operation. The control group of sham-operated mice were given vehicle and the 5/6 Nx group received treatment with vehicle or WNK463 in two different doses. After eight weeks, the animals were euthanized and the kidneys were removed. For analysis, the kidneys were then embedded in paraffin, sections were made and stained using Picro-Sirius Red staining. The staining method ensures that collagen fibers appear red in the sections. Subsequently, the degree of fibrosis in the kidney was quantified using image analysis. Statistical analysis was carried out using Bartlett's test, Kruskal-Wallis test and multiple comparisons including Dunn test.

Overall, the results showed that inhibition with WNK463 did **not** lead to a significant improvement of fibrosis in the kidney in experimentally induced CKD.

The reasons why fibrosis could not be improved cannot be clearly explained by the results of this experimental study. For a clarification, further experiments and parameters should be carried out on CKD mice to provide additional information on the subject.

## VII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APES	Aminopropyltriethoxysilane
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CKD	Chronische Nierenerkrankung
DMSO	Dimethylsulfoxid
ENaC	epithelialer Natriumkanal
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FGF23	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23
FGFR	FGF-Rezeptoren
FSGS	fokal segmentale Glomerulosklerose
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
KG	Körpergewicht
Klotho	Co-Rezeptor $\alpha$ Klotho
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
Na <sup>+</sup>	Natrium
NCC	Natriumchlorid-Co-Transporter
NKCC2	Natriumkaliumchlorid-Co-Transporter Typ 2
PFA	Paraformaldehyd
PTH	Parathormon
SGK1	Serum/glucocorticoid-regulated kinase-1
Sham	Scheinoperiert
TRPV5	Transient receptor potential vanilloid-5
WNK	With-no-lysin-Kinase

ROMK            Renal outer medullary potassium channel

5/6 Nx            5/6 Nephrektomie

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Andrukhova O, Slavic S, Smorodchenko A, Zeitz U, Shalhoub V, Lanske B, Pohl EE, Erben RG. 2014. FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. *EMBO Molecular Medicine*, 6 (6): 744–759. DOI 10.1002/emmm.201303716.
- Andrukhova O, Smorodchenko A, Egerbacher M, Streicher C, Zeitz U, Goetz R, Shalhoub V, Mohammadi M, Pohl EE, Lanske B, Erben RG. 2014. FGF23 promotes renal calcium reabsorption through the TRPV5 channel. *The EMBO Journal*, 33 (3): 229–246. DOI 10.1002/embj.201284188.
- Andrukhova O, Zeitz U, Goetz R, Mohammadi M, Lanske B, Erben RG. 2012. FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2-SGK1 signaling pathway. *Bone*, 51 (3): 621–628. DOI 10.1016/j.bone.2012.05.015.
- Chen G, Liu Y, Goetz R, Fu L, Jayaraman S, Hu M-C, Moe OW, Liang G, Li X, Mohammadi M. 2018.  $\alpha$ -Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. *Nature*, 553 (7689): 461–466. DOI 10.1038/nature25451.
- Chonchol M, Greene T, Zhang Y, Hoofnagle AN, Cheung AK. 2016. Low vitamin D and high fibroblast growth factor 23 serum levels associate with infectious and cardiac deaths in the HEMO study. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 27 (1): 227–237. DOI 10.1681/ASN.2014101009.
- David V, Martin A, Isakova T, Spaulding C, Qi L, Ramirez V, Zumbrennen-Bullough KB, Sun CC, Lin HY, Babitt JL, Wolf M. 2016. Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney International*, 89 (1): 135–146. DOI 10.1038/ki.2015.290.
- Erben RG. 2016. Update on FGF23 and Klotho signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 432: 56–65. DOI 10.1016/j.mce.2016.05.008.
- Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu M-C, Sloan A, Isakova T, Gutiérrez OM, Aguilon-Prada R, Lincoln J, Hare JM, Mundel P, Morales A, Scialla J, Fischer M, Soliman EZ, Chen J, Go AS, Rosas SE, Nessel L, Townsend RR, Feldman HI, St John Sutton M, Ojo A, Gadegbeku C, Di Marco GS, Reuter S, Kentrup D, Tiemann K, Brand M, Hill JA, Moe OW, Kuro-O M, Kusek JW, Keane MG, Wolf M. 2011. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *The Journal of Clinical Investigation*, 121 (11): 4393–4408. DOI 10.1172/JCI46122.
- Fogo AB. 2003. Animal models of FSGS: lessons for pathogenesis and treatment. *Seminars in Nephrology*, 23 (2): 161–171. DOI 10.1053/snep.2003.50015.

Gutiérrez OM. 2010. Fibroblast growth factor 23 and disordered vitamin D metabolism in chronic kidney disease: updating the "trade-off" hypothesis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5 (9): 1710–1716. DOI 10.2215/CJN.02640310.

Hewitson TD, Ono T, Becker GJ. 2009. Small animal models of kidney disease: a review. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 466: 41–57. DOI 10.1007/978-1-59745-352-3\_4.

Hoorn EJ, Ellison DH. 2012. WNK kinases and the kidney. *Experimental Cell Research*, 318 (9): 1020–1026. DOI 10.1016/j.yexcr.2012.02.029.

Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutiérrez OM, Scialla J, Xie H, Appleby D, Nessel L, Bellovich K, Chen J, Hamm L, Gadegbeku C, Horwitz E, Townsend RR, Anderson CAM, Lash JP, Hsu C-Y, Leonard MB, Wolf M. 2011. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney International*, 79 (12): 1370–1378. DOI 10.1038/ki.2011.47.

Isakova T, Xie H, Yang W, Xie D, Anderson AH, Scialla J, Wahl P, Gutiérrez OM, Steigerwalt S, He J, Schwartz S, Lo J, Ojo A, Sondheimer J, Hsu C-y, Lash J, Leonard M, Kusek JW, Feldman HI, Wolf M. 2011. Fibroblast growth factor 23 and risks of mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease. *Journal of the American Medical Association*, 305 (23): 2432–2439. DOI 10.1001/jama.2011.826.

Kahle KT, Wilson FH, Leng Q, Lalioti MD, O'Connell AD, Dong K, Rapson AK, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC, Lifton RP. 2003. WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K<sup>+</sup> secretion. *Nature genetics*, 35 (4): 372–376. DOI 10.1038/ng1271.

Kovesdy CP, Quarles LD. 2013. Fibroblast growth factor-23: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 28 (9): 2228–2236. DOI 10.1093/ndt/gft065.

Kriz W, Hosser H, Hähnel B, Gretz N, Provoost AP. 1998. From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 13 (11): 2781–2798. DOI 10.1093/ndt/13.11.2781.

- Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu M-C, Moe OW, Kuro-O M. 2006. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (10): 6120–6123. DOI 10.1074/jbc.c500457200.
- Leelahavanichkul A, Yan Q, Hu X, Eisner C, Huang Y, Chen R, Mizel D, Zhou H, Wright EC, Kopp JB, Schnermann J, Yuen PST, Star RA. 2010. Angiotensin II overcomes strain-dependent resistance of rapid CKD progression in a new remnant kidney mouse model. *Kidney International*, 78 (11): 1136–1153. DOI 10.1038/ki.2010.287.
- Levey AS, Coresh J. 2012. Chronic kidney disease. *The Lancet*, 379 (9811): 165–180. DOI 10.1016/S0140-6736(11)60178-5.
- Levey AS, Inker LA, Coresh J. 2015. Chronic Kidney Disease in Older People. *Journal of the American Medical Association*, 314 (6): 557–558. DOI 10.1001/jama.2015.6753.
- Mace ML, Gravesen E, Hofman-Bang J, Olgaard K, Lewin E. 2015. Key role of the kidney in the regulation of fibroblast growth factor 23. *Kidney International*, 88 (6): 1304–1313. DOI 10.1038/ki.2015.231.
- Masuda Y, Ohta H, Morita Y, Nakayama Y, Miyake A, Itoh N, Konishi M. 2015. Expression of Fgf23 in activated dendritic cells and macrophages in response to immunological stimuli in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 38 (5): 687–693. DOI 10.1248/bpb.b14-00276.
- McCormick JA, Yang C-L, Ellison DH. 2008. WNK kinases and renal sodium transport in health and disease: an integrated view. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 51 (3): 588–596. DOI 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.103788.
- Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, Hasegawa H, Urakawa I, Oshima T, Ono K, Kakitani M, Tomizuka K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. 2005. Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 289 (5): F1088-95. DOI 10.1152/ajprenal.00474.2004.
- Smith ER, Tan S-J, Holt SG, Hewitson TD. 2017. FGF23 is synthesised locally by renal tubules and activates injury-primed fibroblasts. *Scientific Reports*, 7 (1): 3345. DOI 10.1038/s41598-017-02709-w.
- Weber TJ, Liu S, Indridason OS, Quarles LD. 2003. Serum FGF23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 18 (7): 1227–1234. DOI 10.1359/jbmr.2003.18.7.1227.

Wilson FH, Disse-Nicodème S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP. 2001. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science (New York, N.Y.)*, 293 (5532): 1107–1112. DOI 10.1126/science.1062844.

Wolf M. 2012. Update on fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *Kidney International*, 82 (7): 737–747. DOI 10.1038/ki.2012.176.

Yamada K, Park H-M, Rigel DF, DiPetrillo K, Whalen EJ, Anisowicz A, Beil M, Berstler J, Brocklehurst CE, Burdick DA, Caplan SL, Capparelli MP, Chen G, Chen W, Dale B, Deng L, Fu F, Hamamatsu N, Harasaki K, Herr T, Hoffmann P, Hu Q-Y, Huang W-J, Idamakanti N, Imase H, Iwaki Y, Jain M, Jeyaseelan J, Kato M, Kaushik VK, Kohls D, Kunjathoor V, LaSala D, Lee J, Liu J, Luo Y, Ma F, Mo R, Mowbray S, Mogi M, Ossola F, Pandey P, Patel SJ, Raghavan S, Salem B, Shanado YH, Trakshel GM, Turner G, Wakai H, Wang C, Weldon S, Wielicki JB, Xie X, Xu L, Yagi YI, Yasoshima K, Yin J, Yowe D, Zhang J-H, Zheng G, Monovich L. 2016. Small-molecule WNK inhibition regulates cardiovascular and renal function. *Nature Chemical Biology*, 12 (11): 896–898. DOI 10.1038/nchembio.2168.

Zhang B, Umbach AT, Chen H, Yan J, Fakhri H, Fajol A, Salker MS, Spichtig D, Daryadel A, Wagner CA, Föller M, Lang F. 2016. Up-regulation of FGF23 release by aldosterone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 470 (2): 384–390. DOI 10.1016/j.bbrc.2016.01.034.

Zoccali C, Yilmaz MI, Mallamaci F. 2013. FGF23: a mature renal and cardiovascular risk factor? *Blood Purification*, 36 (1): 52–57. DOI 10.1159/000351001.

## IX. ABBILDUNGS-/ TABELLENVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Repräsentative Fotos der Gruppen Sham+Vehikel (A), 5/6 Nx+Vehikel (B), 5/6 Nx+1 mg/kg WNK463 (C) und 5/6 Nx+3 mg/kg WNK463 (D). Originalvergrößerung x 200.
- Abbildung 2: Grafische Darstellung des Fibrosegrades (Area in %) geordnet nach Behandlungsmethode

