

Aus der Klinik für Nephrologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Lars-Christian Rump

GLEPP1 modifiziert die Kollagen Typ IV-Isoform-
Expression in der glomerulären Basalmembran

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christian Weigel

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. med. Lorenz Sellin

Zweitgutachter: Herr PD Dr. med. Simon Thelen

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Nephrotische Syndrome im Kindesalter sind häufig auf Mutationen in Proteinen des Podozyten oder der Schlitzmembran zurückzuführen (z.B.: Podocin, WT1, Nephrin) und können schon früh die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz verursachen. Das *Glomerular Epithelial Protein 1 (GLEPPI)* ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase in der Membran der Podozyten, deren Funktion und Signalweg noch nicht bekannt ist. In naher Vergangenheit wurden homozygote Mutationen im Gen für *GLEPPI (PTPRO)* beschrieben, welche zu Formen des idiopathischen nephrotischen Syndroms im Kindesalter führten. Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Funktion von *GLEPPI* und der Suche nach potentiellen Komponenten des Signalwegs. Verwendet wurde ein homozygotes *GLEPPI Knockout (KO)*-Mausmodell basierend auf einem genetischen 129/P3-Hintergrund, welches im Alter von 4, 6 und 10 Monaten untersucht wurde. Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten im Altersverlauf eine erhöhte Albuminurie im Coomassie-Gel und eine erhöhte Albumin-Creatinin-Ratio im Alter von 6 und 10 Monaten der *GLEPPI KO*-Mäuse. Die Nierenfunktion der *GLEPPI KO*-Mäuse, gemessen mithilfe des Parameters Cystatin C im heparinisiertem Mausplasma, zeigte sich im Alter von 10 Monaten verglichen mit dem Wildtyp (WT) als deutlich reduziert. Strukturelle Untersuchungen der Glomeruli erfolgten mittels Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung), Elektronenmikroskopie und *Serial block-face scanning*-Elektronenmikroskopie und zeigten isolierte, subpodozytäre Verdickungen (*Humps*) der glomerulären Basalmembran (GBM), deren Anzahl im *GLEPPI KO* im Altersverlauf stärker zunahm als im WT. Zusätzlich konnten morphologische Charakteristika eines podozytären *Foot Process Effacement* beobachtet werden. Die Zusammensetzung der GBM wurde in Bezug auf ihre Hauptkomponenten Kollagen Typ IV und Laminin mittels *Real-Time-PCR* aus glomerulärer RNA und auf Proteinebene im Westernblot aus enzymatisch-verdauten Glomeruli untersucht. Im Alter von 10 Monaten konnte im *GLEPPI KO* ein Wechsel von einer reifen Zusammensetzung von Kollagen Typ IV und Laminin (Kollagen Typ IV $\alpha3\alpha4\alpha5$, Laminin $\alpha5\beta2\gamma1$) zu einer unreifen Form (Kollagen Typ IV $\alpha1\alpha2\alpha1$, Laminin $\alpha1\beta1\gamma1$) beobachtet und in der Immunfluoreszenz eine vermehrte Expression der unreifen Kollagen Typ IV-Ketten dargestellt werden. Die Untersuchung des Signalmechanismus von *GLEPPI* erfolgte in der Zellkultur anhand von Luciferase-Assays mit transfizierten HEK293T-Zellen. NF κ B zeigte sich hier als ein potentieller Transkriptionsfaktor. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *GLEPPI* eine wichtige Rolle in der Regulation der Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran und derer Aufrechterhaltung im Altersverlauf der Versuchstiere spielt.

Abstract

Nephrotic syndromes in children are often due to mutations in proteins of the podocyte or the slit diaphragm (such as podocin, WT1, nephrin). These syndromes can thus lead to the development of chronic renal insufficiency at an early stage. Glomerular Epithelial Protein 1 (GLEPPI) is a protein tyrosine phosphatase in the podocyte membrane whose function and signalling pathway is unknown. Homozygous mutations in the gene for GLEPPI (PTPRO) have been reported recently, leading to forms of idiopathic nephrotic syndrome in children. This thesis concerns with the investigation of the function of GLEPPI and the search for potential components of the signaling pathway. A homozygous GLEPPI knockout (KO) mouse model was used based on a genetic 129/P3 background, which was then studied at the age of 4, 6 and 10 months. Preliminary investigations of the working group showed increased albuminuria in Coomassie stained gels and increased albumin creatinine ratio at the age of 6 and 10 months of GLEPPI KO mice. The renal function of the GLEPPI KO mice, measured by the parameter cystatin C in heparinized mouse plasma, was significantly reduced at the age of 10 months compared to the wild-type (WT). Structural studies of the glomeruli were performed by Periodic Acid Schiff (PAS) staining, electron microscopy, and serial block-face scanning electron microscopy, showing isolated, subpodocytic thickenings (humps) of the glomerular basement membrane (GBM), which increased more in the GLEPPI KO than in the WT across the age range. In addition, morphological characteristics of podocytic foot process effacement were observed. The composition of the GBM was examined for collagen type IV and laminin by real-time PCR using glomerular RNA and by Western blot of enzymatically digested glomeruli. At the age of 10 months a change from the mature composition of collagen type IV and laminin (collagen type IV $\alpha3\alpha4\alpha5$, laminin $\alpha5\beta2\gamma1$) into an immature composition (collagen type IV $\alpha1\alpha2\alpha1$, laminin $\alpha1\beta1\gamma1$) was observed in the GLEPPI KO. An increased expression of the immature collagen typ IV chains was also shown in immunofluorescence of GLEPPI KO glomeruli. The signaling mechanism of GLEPPI was studied in cell culture by luciferase assays with transfected HEK293T cells. NF κ B was shown here to be a potential transcription factor. In conclusion, it has been shown that GLEPPI plays an important role in the regulation of the composition of the glomerular basement membrane and its maintenance across the age range of the GLEPPI WT and KO mices.

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
Abb.	Abbildung
ACR	Albumin-Creatinin-Ratio
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
<i>Aq. dest.</i>	Destilliertes Wasser
<i>Aq. bidest.</i>	Zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
β	Beta
β -Gal	Beta-Galaktosidase
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	Komplementäre DNA
<i>CKD</i>	<i>Chronic Kidney Disease</i> (Chronische Niereninsuffizienz)
CNF	Kongenitales nephrotisches Syndrom des finnischen Typs
Col IV	Kollagen Typ IV
CysC	Cystatin C
<i>DDR1</i>	<i>Discoidin Domain Receptor Family Member 1</i>
dl	Deziliter
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ε	Epsilon
ECM	Extrazelluläre Matrix
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>ESRD</i>	<i>End-Stage Renal Disease</i> (Terminales Nierenversagen)
FCS	Fetales Kälberserum
<i>FELASA</i>	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
<i>For</i>	<i>Forward</i>
FSGS	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
γ	Gamma
g	Gramm
g	G-Zahl
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glomeruläre Basalmembran
gDNA	Genomische DNA
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
<i>GLEPPI</i>	<i>Glomerular Epithelial Protein 1</i>
h	Stunden
<i>HEK</i>	<i>Human Embryonic Kidney</i>

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
<i>HRP</i>	<i>Horseradish</i> Peroxidase
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
INS	Idiopatisches nephrotisches Syndrom
kDa	Kilodalton
<i>KDIGO</i>	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
<i>KO</i>	<i>Knockout</i>
l	Liter
ITGA3	Gen, welches für Integrin $\alpha 3$ kodiert
Lam	Laminin
LAMB2	Gen, welches für Laminin $\beta 2$ kodiert
M	Mol/l
mA	Milliampere
<i>MCD</i>	<i>Minimal Change Disease</i>
mg	Milligramm
MGN	Membranöse Glomerulonephritis
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol/l
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
n	Anzahl
NCK	Zytoplasmatische Adaptermoleküle
NEPH	Proteine der Immunglobulin-Superfamilie
NF κ B	Nukleärer Faktor Kappa B
nm	Nanometer
NPHS1	Gen, welches für Nephrin kodiert
NPHS2	Gen, welches für Podocin kodiert
ONPG	O-Nitrophenyl- β -D-Galaktosidase
PAS	Periodic acid-Schiff
PAN	Puromycin-Aminonukleosid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
<i>PCR</i>	Polymerase-Kettenreaktion
PLCE1	Gen, welches für Phospholipase C ϵ 1 kodiert
PTPase	Protein-Tyrosin- Phosphatase
PTP Φ	Protein-Tyrosin-Phosphatase Phi
<i>PTPRO</i>	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type O</i>
<i>qPCR</i>	Quantitative Echtzeit- <i>PCR</i> (<i>Real-Time-PCR</i>)
<i>Rev</i>	<i>Reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
<i>RPTP-BK</i>	<i>Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase in Brain and Kidney</i>
s	Sekunde
<i>SBSEM</i>	<i>Serial block-face scanning electron microscopy</i>

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMARCAL1	Gen, welches für das <i>SWI/SNF-Related Matrix-Associated Actin-Dependent Regulator Of Chromatin Subfamily A-Like Protein 1</i> kodiert
SRNS	Steroid-resistentes nephrotisches Syndrom
SSNS	Steroid-sensibles nephrotisches Syndrom
<i>STAT</i>	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq-Polymerase	Thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Thermis aquaticus</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
V	Volt
<i>VEGF</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHL	Von-Hippel-Lindau
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
WT1	Wilms-Tumor-Protein
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierversuche und Tierschutz

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das nephrotische Syndrom	1
1.2 Das idiopathische nephrotische Syndrom im Kindesalter	2
1.3 Aufbau und Funktion des glomerulären Filters	4
1.4 Die glomeruläre Basalmembran	7
1.5 Podozyten	9
1.6 Die Protein-Tyrosin-Phosphatase <i>GLEPP1</i>	12
1.7 Zielsetzung der Arbeit	15
2. Material	16
2.1 Geräte	16
2.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.3 Chemikalien, Enzyme, Kits	21
2.4 Gele, Puffer und Lösungen	24
2.5 Antikörper	27
2.5.1 Primäre Antikörper	27
2.5.2 Sekundäre Antikörper	28
2.6 Primer	28
2.6.1 Primer für GAPDH-Kontroll-PCR	28
2.6.2 Primer für <i>Real-time-PCR</i>	28
2.7 Nährmedium und Chemikalien für Zellkultur	30
2.8 Transformation, Mini- und Maxikulturen	30
2.9 Plasmide	31
2.10 Softwareprogramme	32
3. Methoden	33
3.1 Methoden der Versuche im Maus-Tiermodell	33
3.1.1 Versuchstiere	33
3.1.2 Perfusion der Nieren und Organentnahme	33
3.1.3 Isolierung der Glomeruli	36
3.1.4 Gesamt-Proteinbestimmung	37
3.1.5 Kollagenase-Verdau der Glomeruli	38
3.1.6 Lamininextraktion aus Glomeruli	39
3.1.7 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	39
3.1.8 Isolierung der Gesamt-RNA aus Glomeruli	41
3.1.9 Umschreibung der RNA in cDNA	43
3.1.10 GAPDH-Kontroll-PCR	44
3.1.11 Agarose-Gelelektrophorese	45
3.1.12 <i>Real-Time-PCR (qPCR)</i>	45
3.1.13 Histologische PAS-Färbung von Glomeruli	47
3.1.14 Auswertung der PAS-Färbungen mit Image J	48
3.1.15 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Glomeruli	49
3.1.16 Kryokonservierung der Nieren und Immunhistochemie	49
3.1.17 Bestimmung der Albumin-Kreatinin-Ratio im Mausurin	50
3.1.18 Bestimmung von Cystatin C im Mausplasma	51
3.2 Methoden zur DNA-Klonierung	52
3.2.1 Bakterienstämme	52
3.2.2 Transformation	52
3.2.3 Mini- und Maxikulturen	52
3.2.4 Plasmidpräparation	53
3.2.5 Diagnostischer Verdau der Plasmide	54

3.3 Methoden der Versuche in der Zellkultur	56
3.3.1 Zelllinie	56
3.3.2 Zellkultur der <i>HEK293T</i> -Zellen.....	56
3.3.3 Transfektion	56
3.3.4 Ernten und Lyse der transfizierten <i>HEK293T</i> -Zellen	57
3.3.5 β -Galactosidase-Assay	57
3.3.6 Luciferase-Assay.....	58
4. Ergebnisse.....	59
4.1 <i>GLEPPI</i>-Defizienz führt zur Proteinurie und Niereninsuffizienz mit zunehmenden Alter.....	59
4.2 <i>GLEPPI</i>-Defizienz führt zur Bildung von lokalisierten Verdickungen der glomerulären Basalmembran (GBM) und podozytären Fussfortsatzverlusten.....	61
4.2.1 Lichtmikroskopische Veränderungen in der PAS-Färbung.....	61
4.2.2 Elektronenmikroskopie	62
4.2.3 <i>Single block-face scanning</i> -Elektronenmikroskopie.....	64
4.2.4 Immunogold-Färbung von Nierenpräparaten zur Lokalisation von <i>GLEPPI</i> im glomerulären Filtersystem	66
4.3 Modulation der Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran durch <i>GLEPPI</i>	67
4.3.1 Vergleich des Expressionsmusters von Kollagen Typ IV und Laminin auf Ebene der RNA durch <i>Real-Time-PCR</i> im Alter von 6 Monaten.....	67
4.3.2 Unterschiede in der Zusammensetzung von Kollagen Typ IV und Laminin zwischen <i>GLEPPI</i> Wildtyp und <i>Knockout</i> im Westernblot im Alter von 10 Monaten	70
4.3.3 Darstellung der unterschiedlichen Expression von Proteinen im Glomerulum mit Immunfluoreszenz im Alter von 10 Monaten	72
4.4 Untersuchung des Mechanismus der <i>GLEPPI</i>-getriggerten Regulation der GBM.....	75
4.5 Zusammenfassung des <i>GLEPPI-Knockout</i>-Phänotyps	76
5. Diskussion.....	77
5.1 Auswirkungen der Mutation von <i>GLEPPI</i> auf Nierenfunktion und Proteinausscheidung im Vergleich von Maus und Mensch.....	77
5.2 Veränderungen der GBM im <i>GLEPPI</i> – Mausmodell.....	80
5.3 <i>Knockout</i> von <i>GLEPPI</i> führt zu einem Wechsel der Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran	82
5.4 Mechanismus der GBM Veränderungen	86
6. Schlussfolgerung	88
7. Literatur- und Quellenverzeichnis.....	90
8. Danksagung	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Genetische Mutationen als Auslöser von steroid-resistentem und kongenitalem nephrotischen Syndrom bei Kindern (basiert auf Trautmann et al., 2015 ¹³)	3
Abb. 2: Aufbau des Glomerulum (modifiziert nach Kriz et al., 2015 ³⁰)	5
Abb. 3: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung des glomerulären Filters (modifiziert nach Kriz et al., 2015 ³⁰)	6
Abb. 4: Strukturkomponenten der glomerulären Basalmembran (aus Miner, JH, 2012 ³⁴)	7
Abb. 5: Unterschiedliche Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran (GBM) in der Entwicklung des glomerulären Filters (modifiziert nach Abrahamson et al., 2012 ³⁸)	8
Abb. 6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Kapillaren aus gesunden Ratten-Glomeruli (aus Pavenstaedt et al., 2003 ⁵⁰)	9
Abb. 7: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen benachbarten Podozyten und dem Podozyten und der glomerulären Basalmembran (GBM) (aus Pavenstaedt et al., 2003 ⁵⁰)	10
Abb. 8: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung von <i>Foot Process Effacement</i> in Ratten (aus Kriz et al., 2013 ⁵⁹)	11
Abb. 9: Struktur des <i>Glomerular Epithelial Protein 1 (GLEPPI)</i> (aus Thomas et al., 1994 ⁶³)	12
Abb. 10: Einfluss des <i>GLEPPI-Knockout</i> auf den Phänotyp der Podozyten im Mausmodell (modifiziert nach Wharram et al., 2000 ⁶⁸)	13
Abb. 11: Bebilderte Darstellung der Präparationsschritte der perfundierten Niere (nach Potthoff et al., 2008 ⁸⁶)	35
Abb. 12: Auswertung der PAS-Bilder mit ImageJ	48
Abb. 13: Untersuchung des Mausurins auf Albuminurie im Coomassie-Gel und dazugehörige Albumin-Creatinin-Ratio (ACR)	59
Abb. 14: Untersuchung des Cystatin C (CysC) Gehaltes in heparinisiertem Mausplasma	60
Abb. 15: Auswertung der PAS-gefärbten subpodozytären Veränderungen der GBM in Maus-Glomeruli	62
Abb. 16: Darstellung von ultrastrukturellen Veränderungen des glomerulären Filters in <i>GLEPPI</i> Wildtyp (WT)- und <i>Knockout</i> (KO)-Mäusen mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	63
Abb. 17: Dreidimensionale Analyse der glomerulären Strukturen von <i>GLEPPI Knockout</i> (KO)-Mäusen (modifiziert nach Randles et al., 2016 ⁹⁵)	65
Abb. 18: Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Darstellung der Lokalisation von <i>GLEPPI</i> im glomerulären Filter in Immunogold-gefärbten Nierenschnitten	66
Abb. 19: Darstellung der <i>Real-Time-PCR</i> Ergebnisse aus glomerulärer cDNA für Kollagen Typ IV- und Laminin-Ketten	69
Abb. 20: Ergebnisse des Vergleiches der Proteinexpression von Kollagen Typ IV- und Laminin-Ketten in der glomerulären Basalmembran (GBM) im Westernblot	71
Abb. 21: Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen Typ IV $\alpha 1$ in den Glomeruli von <i>GLEPPI</i> Wildtyp (WT)- und <i>Knockout</i> (KO)-Mäusen	73

Abb. 22: Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen Typ IV $\alpha 2$ in den Glomeruli von <i>GLEPPI</i> Wildtyp (WT)- und <i>Knockout</i> (KO)-Mäusen	74
Abb. 23: Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 durch <i>GLEPPI</i> und <i>DDR1b</i>	75
Abb. 24: Zusammenfassung des <i>GLEPPI Knockout</i> (KO)-Phänotyps im Vergleich zum Wildtyp (WT).....	76
Abb. 25: Darstellung von lokalisierten subpodozytären Veränderungen aus anderen <i>Knockout</i> (KO)-Mausmodellen (modifiziert nach Gross et al., 2004 ¹⁰⁶ , Rubel et al., 2014 ¹⁰⁷ und Steenhard et al., 2010 ¹⁰⁸).....	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tabellarisches Protokoll der Präparation der Versuchstiere mit anschließender Perfusion der Nieren mit PBS (nach Potthoff et al., 2008 ⁸⁶)	34
Tabelle 2: Tabellarisches Protokoll der Isolierung von Glomeruli aus perfundierten Mausnieren für RNA-Isolierung und Proteinextraktion (nach Potthoff et al., 2008 ⁸⁶)	36
Tabelle 3: Verdünnungsreihe der <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA) -Stocklösung für Herstellung der Albumin-Standardreihe	37
Tabelle 4: Zusammensetzung des <i>Collagenase-CLSPA-Verdauansatzes</i>	38
Tabelle 5: Protokoll der Extraktion von Laminin aus isolierten Glomeruli (nach Lennon R. et al, 2014 ⁸⁷)	39
Tabelle 6: Protokoll der RNA-Isolierung aus Glomeruli	42
Tabelle 7: Zusammensetzung des gDNA-Verdauansatzes	43
Tabelle 8: Zusammensetzung des Reverse-Transkriptase-Reaktionsgemisches.....	43
Tabelle 9: Zusammensetzung des GAPDH-Reaktionsgemisches.....	44
Tabelle 10: Amplifizierungsprotokoll der GAPDH-Kontroll- <i>PCR</i>	44
Tabelle 11: Zusammensetzung des <i>qPCR-Mastermix</i> für QuantiTect- und MWG-Primer	46
Tabelle 12: Amplifikationsprotokoll der <i>qPCR</i>	47
Tabelle 13: Fixierung von Nierengewebe für 3D-elektronenmikroskopische Aufnahmen.....	49
Tabelle 14: Reaktionsansatz für die Kreatininbestimmung.....	50
Tabelle 15: Tabellarisches Protokoll der Cystatin C-Bestimmung in Mausplasma	51
Tabelle 16: Auflistung der verwendeten <i>E.coli</i> -Stämme und deren Resistenz	52
Tabelle 17: Protokoll der Maxi-Prep zur Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienstämmen	54
Tabelle 18: Übersicht der Enzyme und Puffer für den diagnostischen Verdau von erzeugter Plasmid-DNA	55

1. Einleitung

1.1 Das nephrotische Syndrom

Das nephrotische Syndrom kann im Rahmen von primären glomerulären Erkrankungen oder systemischen Erkrankungen mit sekundärer Schädigung der glomerulären Strukturen auftreten¹. Es ist gekennzeichnet durch eine große Proteinurie ($>3,5\text{g}/24\text{h}$), welche durch eine erhöhte Permeabilität des glomerulären Filters entsteht¹. Durch den Verlust an Proteinen können eine Hypoalbuminämie und Ödeme entstehen¹. Kompensatorisch kommt es zu einer vermehrten hepatischen Synthese von Lipoproteinen und einem verminderten peripheren Katabolismus, was eine Hyperlipidämie verursacht¹. Darüber hinaus kann eine Hyperkoagulabilität aus einem Ungleichgewicht von Synthese und Elimination der Gerinnungsfaktoren resultieren¹. Die erhöhte Permeabilität des glomerulären Filters kann ebenfalls zu einer Lipidurie führen¹. Primäre Erkrankungen, die zu einem nephrotischen Syndrom führen können, sind die Fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS), die *Minimal Change Disease* (MCD) und die membranöse Glomerulonephritis (MGN)². MCD, auch Nil-Krankheit oder Lipoid-Nephrose genannt, ist der häufigste Grund eines nephrotischen Syndroms im Kindesalter³. FSGS und MGN hingegen sind häufig ursächlich für primäre nephrotische Syndrome im Erwachsenenalter⁴. Wichtige systemische Erkrankungen mit sekundärer Schädigung des glomerulären Kompartments sind insbesondere Amyloidose, Diabetes mellitus und systemischer Lupus erythematodes, aber auch postinfektiöse und membranoproliferative Glomerulonephritiden können zur Entwicklung eines nephrotischen Syndroms führen². Persistenz und Progress der glomerulären Dysfunktion können zu einer langfristig reduzierten Nierenfunktion im Sinne einer chronischen Niereninsuffizienz (CKD) führen¹.

Die CKD ist nach *KDIGO* (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*)-Leitlinien von 2012 definiert als verringerte Nierenfunktion und/oder abnorme Strukturveränderung der Niere über einen Zeitraum von >3 Monaten mit Auswirkungen auf die Gesundheit des Patienten⁵. Weltweit steigt die Inzidenz und Prävalenz chronischer Nierenerkrankungen an, was enorme Kosten für das Gesundheitssystem verursacht⁶. In Europa liegt die Prävalenz der CKD im Alter von 45-74 Jahren zwischen 6,3% und 25,6%⁷. In Deutschland leiden etwa 2 Millionen Menschen an einer Nierenerkrankung mit deutlich eingeschränkter Nierenfunktion⁸. Insgesamt wurden im Jahr 2015 83.325 ständig dialysepflichtige Patientinnen und Patienten mit Hämo- oder Peritonealdialyse in Deutschland behandelt⁹. Ende des Jahres 2016 umfasste die Warteliste für Nierentransplantationen in Deutschland 7.876 Patienten, davon 3.348 Anmeldungen im Gegensatz zu 2.094 durchgeführten Transplantationen¹⁰.

1.2 Das idiopathische nephrotische Syndrom im Kindesalter

Das idiopathische nephrotische Syndrom (INS) gehört zu den primären nephrotischen Syndromen. Ungefähr 90% aller nephrotischen Syndrome in den ersten 10 Lebensjahren und 50% aller Fälle im Alter >10 Jahren sind auf ein INS zurückzuführen¹¹. Mit einer Inzidenz von 7/100.000 und einer Prävalenz von annähernd 16/100.000 ist das nephrotische Syndrom insgesamt eine seltene chronische Erkrankung der Nieren im Kindesalter³. Charakteristisch für das Krankheitsbild ist das Vorliegen von klinischen Symptomen eines nephrotischen Syndroms (siehe 1.1) bei gleichzeitig nicht spezifischen, histologischen Veränderungen des glomerulären Filters. Hierzu gehören lichtmikroskopische Pathologien im Sinne der Krankheitsbilder *MCD* und *FSGS*, aber auch elektronenmikroskopisch darstellbare, abnorme podozytäre Fussfortsätze (*Foot Process Effacement*, siehe 1.5). Anhand des Alters der Patienten zum Zeitpunkt der Erstmanifestation der Symptome, kann ein kongenitales nephrotisches Syndrom innerhalb der ersten 3 Lebensmonate, von einem infantilen nephrotischen Syndrom zwischen dem 4. bis 12. Lebensmonat und einem adoleszenten nephrotischen Syndrom ab einem Alter von 12 Jahren abgegrenzt werden^{12,13}. Studien zeigen, dass die Erstmanifestation von typischen Symptomen am häufigsten jedoch zwischen dem 1. und 11. Lebensjahr auftritt, besonders im Alter zwischen 1 und 5 Jahren¹³⁻¹⁵. Ursächlich scheinen genetische Einflüsse auf die Struktur und Funktion des Podozyten und die glomeruläre Schlitzmembran zu sein. Untersuchungen in Europa zeigen, dass ungefähr 85% aller kongenitalen und 44% aller infantilen nephrotischen Syndrome auf Mutationen in Proteinen des Podozyten bzw. der Schlitzmembran zurückzuführen sind¹². Die häufigsten Mutationen sind in den Genen für Nephtrin (NPHS1), Podocin (NPHS2) und Wilms Tumor Protein (WT1) lokalisiert und führen zu isolierten (z.B.: Nephtrin) oder syndromalen (z.B.: WT1, Denys-Drash-Syndrom) nephrotischen Syndromen im Kindesalter (siehe Abbildung 1)^{12,13}. Viele Studien zeigen, dass die *MCD* als häufigste histopathologische Ausprägung des nephrotischen Syndroms im Kindesalter vorliegt¹¹. Jedoch konnten einige aktuellere Studien zeigen, dass die Häufigkeit an nephrotischen Syndromen, welche auf *FSGS* zurückzuführen sind, zuzunehmen scheinen¹⁶⁻²⁰.

Der wichtigste Faktor im Bezug auf die Prognose der Patienten mit INS ist, neben dem erhöhten Infektionsrisiko, das Ansprechen auf eine Therapie mit Steroiden²⁰. Anhand des Therapieerfolges kann die Erkrankung der Patienten in Steroid-sensible- (SSNS) und Steroid-resistente nephrotische Syndrome (SRNS) unterteilt werden. Hierzu empfiehlt die *KDIGO*-Leitlinie von 2012 eine 8 wöchige Behandlung mit Steroidpräparaten, bevor eine Steroidresistenz diagnostiziert wird²¹.

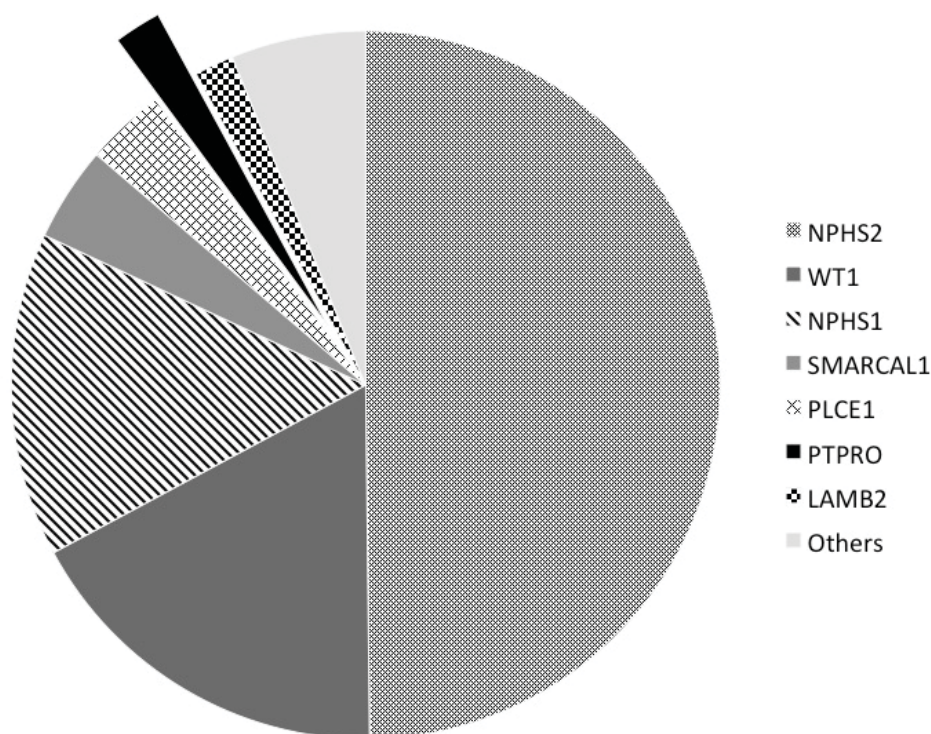


Abb. 1: Genetische Mutationen als Auslöser von steroid-resistentem und kongenitem nephrotischen Syndrom bei Kindern (basierend auf den Daten von Trautmann et al., 2015¹³)
 Dargestellt sind die Ergebnisse des genetischen Screenings von 1174 Patienten einer großen Studie aus 21 Ländern von 2009 bis 2014, welche aufgrund eines Steroid-resistenten nephrotischen Syndroms, eines kongenitalen nephrotischen Syndroms oder einer persistierenden subnephrotischen Proteinurie im Alter von 0-20 Jahren registriert wurden. Eine genetische Ursache wurde in 277 Fälle (23,6%) festgestellt. Am häufigsten betroffen waren die Gene NPHS2 (49,8%), WT1 (17,3%), NPHS1 (14,8%), SMARCAL1 (4,3%), PLCE1 (3,6%), PTPRO (2,17%) und LAMB2 (1,8%) betroffen¹³. NPHS1: Nephtrin, NPHS2: Podocin, WT1: Wilms Tumor Protein, SMARCAL1: *SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1*, PLCE1: Phospholipase Cε1, PTPRO: *Protein-tyrosine-phosphatase Receptor type O*, LAMB2: Laminin β2

Patienten, bei denen eine *MCD* vorliegt, sprechen sehr häufig auf eine Therapie mit Steroiden an, wohingegen die *FSGS* ein häufiger Grund für ein *SRNS* darstellt^{20,22,23}. Insgesamt führt die Steroidtherapie bei etwa 12-15% aller Kinder mit *INS* nicht zu einer Remission der Proteinurie^{14,20,24}. Aus Studien ist bekannt, dass Proteinurie zu einem schnelleren Progress von Nierenerkrankungen führt²⁵. Bei Rezidiven eines *SSNS* und im Falle eines *SRNS* sollte deshalb der Einsatz immunsuppressiven Medikamenten erwogen werden²¹. *SRNS* ist ein schwerwiegendes Krankheitsbild mit vielen Komplikationen, insbesondere Wachstumsstörungen und Infektionen, welche durch die anhaltende Proteinurie, den dauerhaften Einsatz von Steroiden, Malnutrition und chronische Niereninsuffizienz verursacht werden können²⁶. Etwa 15-50% aller Kinder, welche an *SRNS* leiden, entwickeln innerhalb von 15 Jahren ein dialysepflichtiges Nierenversagen (*End-Stage Renal Disease, ESRD*), das mit Dialyse oder Nierentransplantation behandelt werden muss^{15,20,27}. Ebenfalls deuten Daten darauf hin, dass die Inzidenz des primären *SRNS* im Kindesalter zuzunehmen scheint¹⁸.

Studien konnten zeigen, dass dem SRNS häufig eine genetische Ursache des nephrotischen Syndroms zugrunde liegt²⁸. Auch Mutationen im Gen *PTPRO* (*Protein-Tyrosine-Phosphatase Receptor type O*), welches für das Protein *GLEPPI* (*Glomerular Epithelial Protein 1*) kodiert, wurden im Zusammenhang mit nephrotischen Syndromen im Kindesalter beschrieben (siehe Abbildung 1)^{13,29}.

Erstmalig wurde im Jahr 2011 eine Studie veröffentlicht, in der im Rahmen einer Untersuchung von 17 autosomal-rezessiven SRNS-Familien 2 Familien mit Mutationen im Bereich des *PTPRO*-Gens auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 identifiziert werden konnten²⁹. In der ersten Familie wurde eine Mutation (c2627+1G>T, p.Glu854_Trp876del) beschrieben, welche zum Verlust des Exons 16 und somit zu einem verkürzten *GLEPPI*-Protein führte²⁹. In dieser Familie waren 2 Geschwister betroffen, welche im Alter von 5 und 7 Jahren symptomatisch wurden²⁹. Histologisch konnte bei dem jüngeren Kind eine FSGS diagnostiziert werden²⁹. In der zweiten Familie führte die eine Mutation (c.2745+1G>A, p.Asn888Lysfs*3) zum Verlust des Exons 19, wodurch ein Stopcodon entstand, was den kompletten Verlust des *GLEPPI*-Proteins zur Folge hatte²⁹. In dieser Familie waren 3 von 4 Geschwistern erkrankt, welche im Alter von 9, 11 und 14 Jahren symptomatisch wurden²⁹. Histologisch konnte bei dem mittleren Kind eine *MCD* diagnostiziert werden²⁹. Im Untersuchungszeitraum entwickelte das älteste Kind der zweiten Familie im Alter von 18 Jahren ein transplantationspflichtiges Nierenversagen²⁹.

1.3 Aufbau und Funktion des glomerulären Filters

Zum besseren Verständnis der Entstehung einer Proteinurie wird im Folgenden der Aufbau des glomerulären Filters beschrieben. Durch Schädigung einer Schicht des glomerulären Filters kann es zum Auftreten einer Proteinurie kommen. Die Nierenkörperchen (*Corpusculum renale Malpighi*) sind der erste Abschnitt eines jeden Nephrons, der funktionellen Untereinheit der Niere. Diese sind innerhalb der Nierenrinde lokalisiert und bestehen aus einem speziellen Kapillarsystem, dem Glomerulus, welches von mesangialer Matrix und Mesangiumzellen umgeben ist (siehe Abbildung 2)³⁰. Um das Glomerulus liegt die Bowman'sche Kapsel, welche aus 2 Anteilen besteht. Das viszerale Blatt, welches aus den viszeralen Epithelzellen (Podozyten) gebildet wird, liegt dem Kapillarsystem an. Am Gefäßpol des Nierenkörperchens geht das viszerale in das parietale Blatt über, welches aus einschichtigen Plattenepithelzellen (Parietalzellen) besteht und das Kapillarsystem umgebend, den Gefäßpol mit dem proximalem Tubulussystem (Harnpol) verbindet.

Der Raum zwischen den beiden Blättern der Bowman'schen Kapsel ist der Harnraum, in den der Primärharn (proteinreiches Plasmafiltrat) unselektiv durch den glomerulären Filter gepresst wird, um anschließend über den Urinpol in das proximale Tubulussystem abzufließen. Das Nierenkörperchen bildet gemeinsam mit dem Tubulusapparat das Nephron.

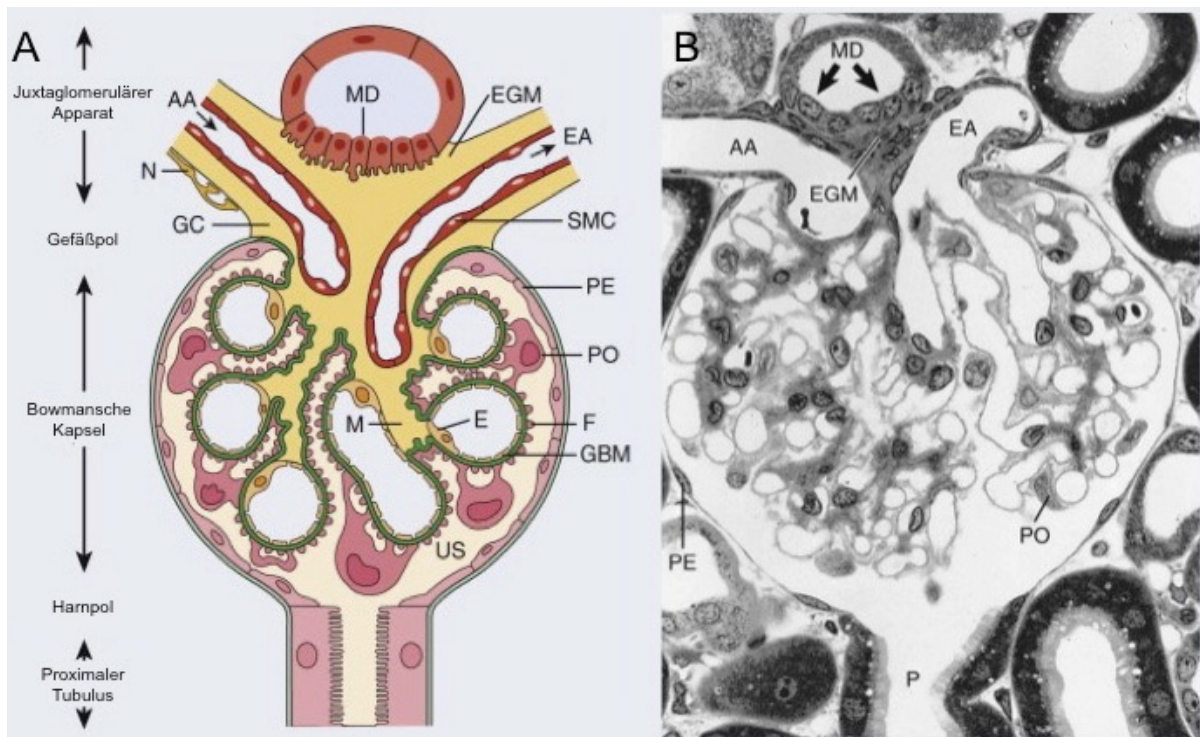


Abb. 2: Aufbau des Glomerulum (modifiziert nach Kriz et al., 2015³⁰)

A zeigt eine schematische Darstellung des Corpusculum renale mit den wichtigsten anatomischen Strukturen. B veranschaulicht den tatsächlichen histologischen Aufbau anhand einer lichtmikroskopischen Aufnahme. Endvergrößerung x390. AA: Afferente Arteriole, EA: Efferente Arteriole, E: Endothel, EGM: Extraglomeruläre Matrix, F: Fussfortsätze der Podozyten, GBM: Glomeruläre Basalmembran, GC: Granuläre Zellen, M: Mesanimum, MD: Macula densa, N: Sympathische Nervenendigungen, P: proximaler Tubulus, PE: Parietale Epithelzellen, PO: Podozyten, SMC: Glatte Muskelzellen der Gefäßwand (*Vascular Smooth Muscle Cells*), US: Harnraum (*Urinary Space*)

Der Mensch besitzt pro Niere ungefähr 1 Millionen Glomeruli, welche jeweils einen Durchmesser von 110-276 μ m aufweisen^{31,32}. Im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme der Anzahl funktionsfähiger Glomeruli, welche über eine pathologische Nierenfunktion zur terminalen Niereninsuffizienz führen kann. Ultrastrukturell ist der glomeruläre Filter aus dem fenestrierten Endothel der Kapillare mit umgebender Glykokalix, den Podozyten und der zwischen den Zellen lokalisierten glomerulären Basalmembran aufgebaut, welche die beiden Zellschichten vollständig voneinander trennt (siehe Abbildung 3)³⁰.

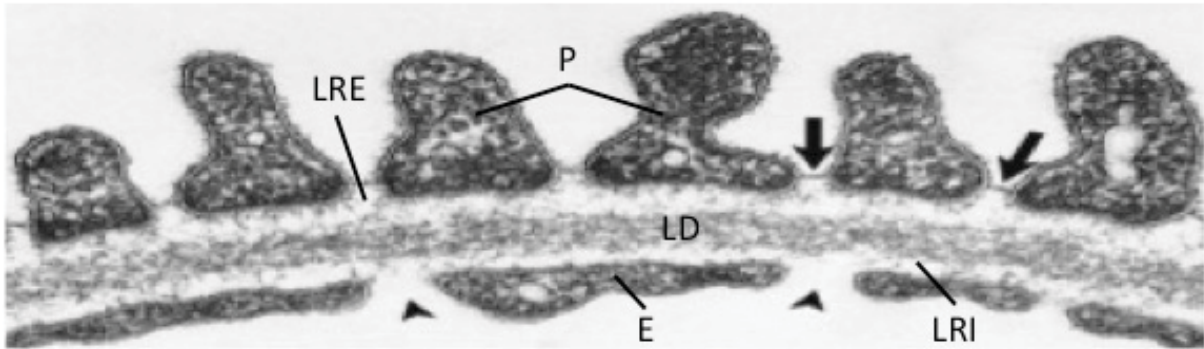


Abb. 3: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung des glomerulären Filters (modifiziert nach Kriz et al., 2015³⁰)

Zwischen den podozytären Fussfortsätzen ist die Schlitzmembran deutlich zu erkennen. Die Basalmembran besteht aus 3 Einheiten: *Lamina rara externa*, *Lamina densa* und *Lamina rara interna*. Nach innen schließt sich das fenestrierte Endothel der glomerulären Kapillaren an. Endvergrößerung x50440. E: Endothel, LRE: *Lamina rara externa*, LRI: *Lamina rara interna*, LD: *Lamina densa*, P: Podozyten, ←: Schlitzmembran, ^: Poren im fenestrierten Endothel

Die physiologische Funktion des glomerulären Filters ist die Gewinnung von Primärharn aus dem Blut bei gleichzeitigem Zurückhalten der Plasmaproteine, was als Permeabilität bezeichnet wird³³. Dies gelingt durch eine hohe Permeabilität für Wasser und Ionen, bei gleichzeitiger Undurchlässigkeit gegenüber Makromolekülen (z.B. Albumin)³³. Das pro Zeiteinheit filtrierte Volumen, welches einerseits vom hydrostatischen und andererseits vom kolloidosmotischen Druckgefälle über dem glomerulären Filter beeinflusst wird, bezeichnet man als glomeruläre Filtrationsrate (GFR)³³. Pro Tag werden etwa 180 l Primärharn durch die selektive Filtration in den Glomeruli gebildet³³.

Der Transport von flüssigen Plasmabestandteilen erfolgt dabei nicht über eine Zellmembran, sondern extrazellulär durch die GBM und die podozytäre Schlitzmembran. Die Permeabilität für Makromoleküle wird über eine Größen- und Ladungselektivität des Endothels mit anliegender Glykokalix, der GBM und der Schlitzmembran verhindert³⁰.

Glomeruläre Erkrankungen führen zu einer reduzierten Integrität des glomerulären Filters, was mit einer Reduktion der Permeabilität einhergeht und zu Proteinurie und Hämaturie führt. Als histologisches Korrelat der reduzierten Barrierefunktion des glomerulären Filters können Veränderungen der podozytären Fussfortsätze im Sinne eines *Foot Process Effacement* auftreten (siehe 1.5). Anhaltende glomeruläre Dysfunktion, wie im Falle des nephrotischen Syndroms, kann zu chronischer Niereninsuffizienz führen, welche schlimmstenfalls in einem terminalen Nierenversagen endet.

1.4 Die glomeruläre Basalmembran

Die glomeruläre Basalmembran (GBM) ist eine extrazelluläre Matrix zwischen dem fenestrierten Endothel und den Podozyten des glomerulären Filtersystems. Als derbe, kollagenreiche Trennschicht zwischen den beiden Zelltypen ist sie gleichermaßen für Funktion und Struktur des Glomerulus von Bedeutung. Mit 250-350nm in menschlichen Glomeruli ist sie wesentlich dicker als andere Basalmembranen³⁰. Elektronenmikroskopisch ist eine dreischichtige Struktur der GBM zu erkennen, welche sich in *Lamina rara externa*, -*interna* und einer dazwischen liegenden, elektronendichteren *Lamina densa* gliedert (siehe Abbildung 3)³⁰. Hauptsächlich besteht die GBM aus Kollagen Typ IV, Laminin, Nidogen und aus Proteoglykanen, wie Agrin und Perlecan (siehe Abbildung 4)³⁴. Kollagen Typ IV bildet gemeinsam mit Laminin ein mechanisch stabiles Netzwerk, welches als die Basisstruktur der GBM verstanden werden kann³⁵. Nidogen bindet sowohl Kollagen Typ IV, als auch Laminin und ist somit entscheidend für die Formation und Interaktion der beiden strukturgebenden Netzwerke³⁶. Proteoglykane (Agrin, Perlecan, u.a.) ergänzen die Struktur der GBM, in dem sie an Laminin binden und vermutlich für die negative Ladung der GBM mitverantwortlich sind^{35,37}. Von besonderer Bedeutung ist die spezielle Zusammensetzung der Strukturproteine in der GBM (siehe Abbildung 5)³⁸.

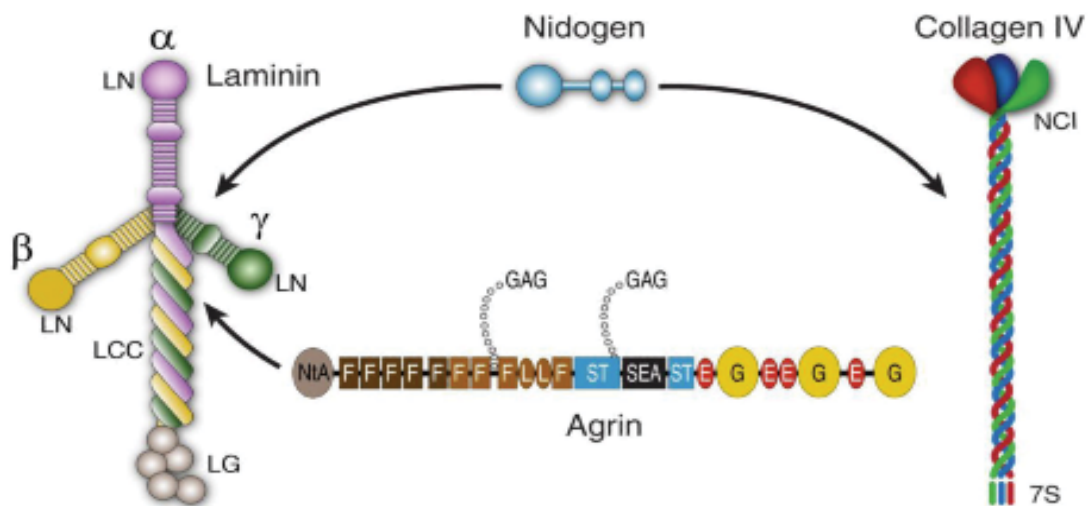


Abb. 4: Strukturkomponenten der glomerulären Basalmembran (aus Miner, JH, 2012³⁴)
 Kollagen Typ IV ist ein Heterotrimer, bestehend aus einer Tripelhelix von α -Ketten ($\alpha 1-6$). Es existieren drei mögliche Heterotrimerer $\alpha 1\alpha 2\alpha 1$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ und $\alpha 5\alpha 6\alpha 5$. Über die N-terminalen 7S-Domäne und die drei C-terminalen NCI-Domänen entsteht durch Bindung zwischen benachbarten Heterotrimeren ein stabiles Netzwerk. Laminin ist ein Heterotrimer aus jeweils einer von 5 α -, 4 β - und 3 γ -Ketten. Die typische kreuzförmige Struktur der Laminins entsteht durch eine Helixbildung der LCC-Domänen der Ketten, an deren C-terminalen Ende über die LG-Domäne eine Bindungsstelle für Zelloberflächenrezeptoren lokalisiert ist. Die drei N-terminalen LN-Domänen der Ketten sind für die Trimer-Trimer-Interaktion verantwortlich. Nidogen bindet sowohl Kollagen Typ IV, als auch Laminin und ist für die Verbindung der beiden Netzwerke verantwortlich. Agrin bindet an Laminin und ergänzt das strukturgebende Gerüst der GBM. GAG: Glykosaminoglykane, LG: Laminin globular domain, LN: Laminin N-terminal domain, LCC: Laminin coiled-coil domain, NCI: Noncollagenous domain

Kollagen Typ IV ist ein trimeres Matrixprotein, welches sich aus insgesamt 6 unterschiedlichen α -Ketten (Kollagen Typ IV α 1-6) zusammensetzen kann³⁵. Die Synthese und Trimerisierung zu einer Tripel-Helix erfolgt intrazellulär³⁵. Die entstandenen Protomere werden in die extrazelluläre Matrix sezerniert, wo sie polymerisieren und über verschiedene Enzyme miteinander verknüpft werden³⁵. Im Rahmen der Glomerulogenese verändert sich die Zusammensetzung der α -Ketten innerhalb des Kollagen Typ IV (siehe Abbildung 5)³⁸. In der unreifen GBM liegen die Ketten α 1 und α 2 in Form des Heterotrimerers α 1 α 2 α 1 vor³⁹. In der reifen GBM hingegen findet sich das Heterotrimer α 3 α 4 α 5³⁹. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass unreifes Kollagen Typ IV α 1 und α 2 sowohl von Endothelzellen, Mesangiumzellen, als auch von Podozyten synthetisiert zu werden scheint, wohingegen Kollagen Typ IV α 3, α 4 und α 5 nur von Podozyten gebildet wird⁴⁰. Aktuelle mikroskopische Untersuchungen konnten zeigen, dass das reife Kollagennetzwerk α 3 α 4 α 5 im Zentrum der GBM lokalisiert ist, wohingegen das unreife Netzwerk α 1 α 2 α 1 an der endothelialen Seite der GBM ausgebildet wird⁴¹. Das Alport-Syndrom entsteht durch Mutationen in den Genen von Kollagen Typ IV α 3, α 4 und α 5 und führt zu einer reduzierten Expression des reifen Netzwerks mit einer kompensatorisch gestiegenen Expression der unreifen Ketten α 1 und α 2, welche sich über die gesamte GBM erstreckt^{41,42}. Typische Symptome wie Proteinurie, Hämaturie und chronische Niereninsuffizienz bei Patienten mit Alport-Syndrom zeigen, dass das reife Kollagennetzwerk für die Funktion des glomerulären Filters unabdingbar ist⁴².

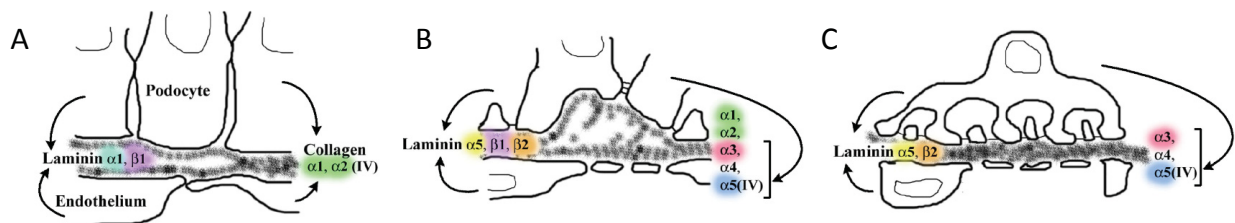


Abb. 5: Unterschiedliche Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran (GBM) in der Entwicklung des glomerulären Filters (modifiziert nach Abrahamson et al., 2012³⁸)
 Die unreife GBM besteht hauptsächlich aus den Ketten Laminin α 1/ β 1 und Kollagen Typ IV α 1/ α 2, welche sowohl vom Podozyten, als auch von der Endothelzelle produziert werden (A). Im Laufe der Entwicklung kommen sowohl die reifen Laminin-Ketten α 5 und β 2, gebildet von Endothelzellen und Podozyten, als auch die reifen Kollagen Typ IV-Ketten α 3, α 4 und α 5 hinzu, die nur von Podozyten synthetisiert werden (B). Die reife GBM besteht letztendlich nur aus den reifen Ketten Laminin α 5/ β 2 und Kollagen Typ 4 α 3/ α 4/ α 5 (C).

Laminin ist ein Heterotrimer aus jeweils einer α -, β - und γ -Kette, welche untereinander über Disulfidbrücken verbunden sind³⁵. Insgesamt gibt es 5 α -, 4 β - und 3 γ -Ketten, die sich zu 16 unterschiedlichen Heterotrimeren zusammensetzen⁴³. In der unreifen GBM liegt hauptsächlich Laminin α 1 β 1 γ 1 vor^{39,44}.

Im Rahmen der Glomerulogenese verändert sich die Zusammensetzung des Laminins über das Heterotrimer Laminin $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ zu der reifen Form Laminin $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ (siehe Abbildung 5)^{38,39,44}. Untersuchungen bezüglich der reifen Laminin $\alpha 5$ -Kette zeigten, dass sowohl Parietalzellen, als auch Podozyten in der Synthese des Netzwerkes eine Rolle zu spielen scheinen⁴⁵. Für einen intakten glomerulären Filter ist auch das Netzwerk aus reifem Laminin $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ von großer Bedeutung. So konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass eine verringerte Expression von Laminin $\alpha 5$ zu Nierenversagen führt und im Fall eines kompletten *Knockout (KO)* keine Ausbildung von vaskularisierten Glomeruli stattfindet^{46,47}. Mutationen im LAMB2-Gen, welches für die Laminin $\beta 2$ -Kette kodiert, führen zur Entwicklung des Pierson-Syndroms, dass bei den betroffenen Patienten ein kongenitales nephrotisches Syndrom verursacht⁴⁸.

1.5 Podozyten

Die Podozyten, auch viszerale Epithelzellen genannt, bilden das viszerale Blatt der Bowman'schen Kapsel. Pro Glomerulus sind etwa 800 Podozyten vorhanden⁴⁹. Ausgehend von ihrem Zellkörper, welcher in den Harnraum ragt, verzweigen sich Primärfortsätze entlang der Kapillaren des Glomerulus. Diese wiederum bilden unzählige kleinere Ausläufer, die podozytären Fussfortsätze, welche sich mit den Fussfortsätzen benachbarter Podozyten ineinander verschränken und die Kapillaren umschließen (siehe Abbildung 6)⁵⁰. Zwischen den Fussfortsätzen entstehen im gesunden Glomerulus Filtrationsschlitze mit einer Weite von 30-40nm⁵¹.

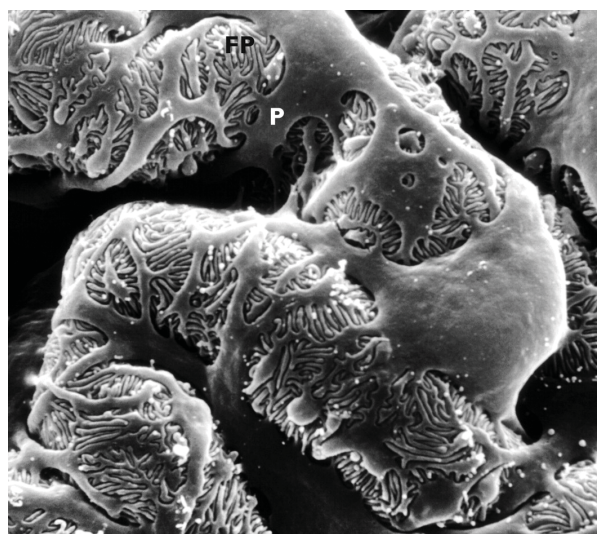


Abb. 6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Kapillaren aus gesunden Rattenglomeruli (aus Pavenstaedt et al., 2003⁵⁰) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Kapillaren aus gesunden Rattenglomeruli mit Blick vom Harnraum aus. Dargestellt sind Podozyten mit ihren fingerförmig-verzweigten Fussfortsätzen, welche die Kapillare umschließen. Endvergrößerung x6000. P: Podozyt, FP: Fussfortsätze der Podozyten

Die Verbindung der Fussfortsätze untereinander wird über die extrazelluläre Schlitzmembran (*Slit diaphragm*) hergestellt. Hierbei handelt es sich um einen reißverschlussartigen Zell-Zell-Kontakt von 30-35nm Weite, welcher 10-12nm große Poren beinhaltet⁵¹. Die Schlitzmembran besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, unter anderem aus Nephrin, Proteinen der NEPH-Familie und Podocin, welche über verschiedene Adapterproteine (z.B.: NCK1/2) mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind. Die Schlitzmembranproteine sind für die Signaltransduktion an der Schlitzmembran verantwortlich⁵⁰. Mutationen des Proteins Nephrin und eine so entstehende Dysregulation der Schlitzmembran führen im Menschen zum kongenitalen nephrotischen Syndrom des finnischen Typs⁵².

Neben der Stabilität der Schlitzmembran und der Zell-Zell-Interaktion ist vor allem die Adhäsion der Podozyten an der GBM für die Integrität und Funktionalität des glomerulären Filters von Bedeutung. Mithilfe von transmembranären Adhäsionsrezeptoren, insbesondere Integrinen, entstehen Zell-Matrix-Kontakte zwischen der Zellmembran der Podozyten und den Komponenten der GBM (siehe Abbildung 7)⁵⁰.

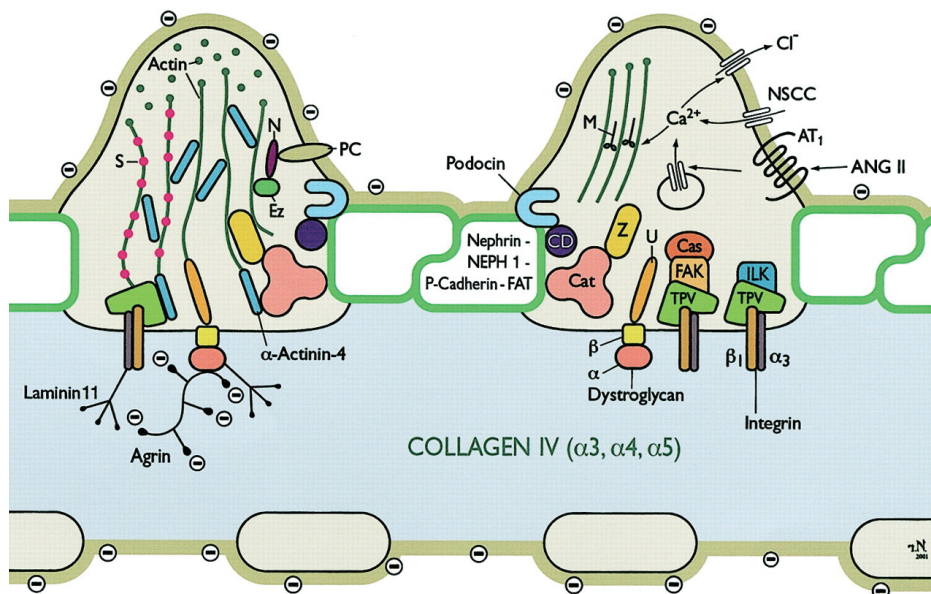


Abb. 7: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen benachbarten Podozyten und dem Podozyten und der glomerulären Basalmembran (GBM) (aus Pavenstadt et al., 2003⁵⁰)
Zwischen den Podozytenfortsätzen liegt die glomeruläre Schlitzmembran, welche aus verschiedenen Molekülen aufgebaut ist (Nephrin, NEPH1, P-Cadherine, FAT und andere). Über Matrixrezeptoren an der Zelloberfläche der Podozyten (Integrine und Dystroglykane) bestehen Verbindungen zwischen dem Zytoskelett des Podozyten und den Bestandteilen der glomerulären Basalmembran. Cas: p130Cas, CD: CD2-assoziiertes Protein, Ez: Ezrin, FAK: Fokale Adhäsionskinase, ILK: Integrin-gebundene Kinase, M: Myosin, N: NHERF2, NSCC: nicht-selektiver Kationenkanal, PC: Podocalyxin, S: Synaptopodin, TPV: Talin/Paxillin/Vinculin, U: Utrophin

Integrine sind α - β -Heterodimere und spielen sowohl in der Adhäsion, als auch in der Signaltransduktion eine entscheidende Rolle⁵³. Integrin $\alpha3\beta1$ ist das am häufigsten exprimierte Integrin der podozytären Zellmembran und bindet sowohl Kollagen Typ IV $\alpha3$ -5, als auch Laminin und Nidogen⁵⁴.

Nach intrazellulär ist das Integrin $\alpha 3\beta 1$ über Adapterproteine mit dem Aktin-Zytoskelett des Podozyten verbunden. Homozygote Mutationen im ITGA3-Gen, welches für Integrin $\alpha 3$ kodiert, führen zu kongenitalen nephrotischen Syndromen im Menschen⁵⁵. Andere Oberflächenrezeptoren des Podozyten sind Dystroglycan und Syndecan, welche Laminin, Agrin und Perlecan binden können^{56,57}.

Podozyten sind hochspezialisierte und ausdifferenzierte Zellen, die nicht mehr im Stande sind Zellteilung zu betreiben⁵⁸. Glomeruläre Schäden können zu charakteristischen Veränderungen der Podozyten-Morphologie führen und sogar einen erhöhten Verlust der Podozyten herbeiführen, welcher nur bedingt kompensiert werden kann⁵⁸. Diese Veränderungen werden als *Foot Process Effacement* bezeichnet (siehe Abbildung 8)⁵⁹. Initial manifestiert sich das *Foot Process Effacement* durch eine Rückbildung der Interdigititation, was einhergeht mit Verplumpung der Strukturen und einem Verlust der Schlitzmembran in diesen Bereichen⁶⁰. Es entstehen verbreiterte und abgeflachte Primärfortsätze, welche sogar mit den Zellkörpern der Podozyten verschmelzen können. Darüber hinaus wurden Veränderungen im Aufbau des Zytoskeletts der Podozyten beschrieben, welche durch eine Zunahme an α -Aktinin-reichen Mikrofilamentklustern charakterisiert sind⁶¹. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine induzierte Expression von α -Aktinin *Foot Process Effacement* und Proteinurie verursachen kann⁶². Bezüglich der Funktion des *Foot Process Effacement* könnte ein akuter, protektiver Mechanismus im Vordergrund stehen, der eine stärkere Adhäsion und gleichzeitig einen geringeren Verlust von Podozyten erreichen könnte, um ein schnelles Fortschreiten der Proteinurie zu verhindern⁵⁹.

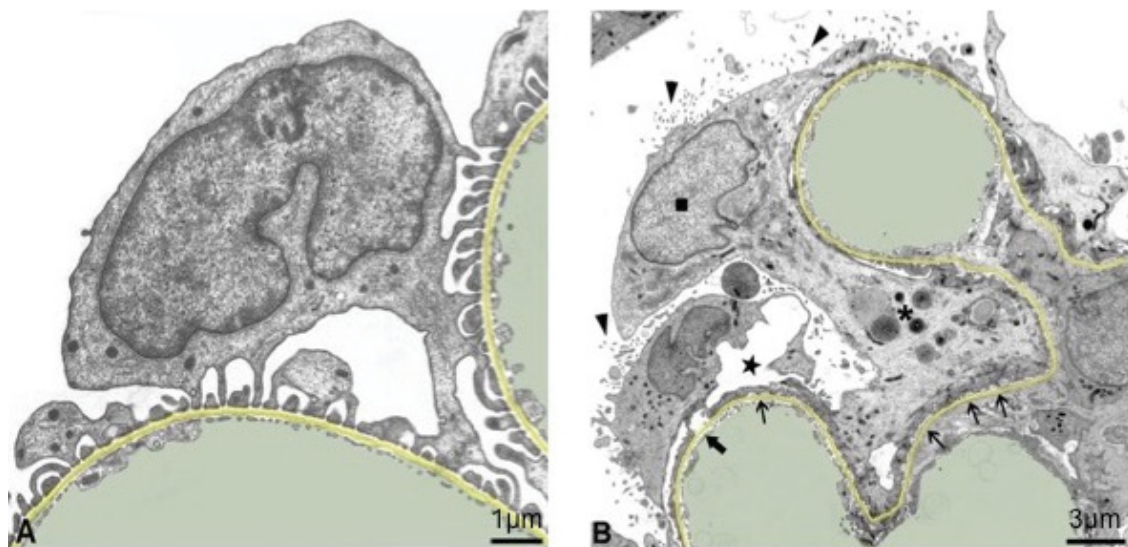


Abb. 8: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung von *Foot Process Effacement* in Ratten (aus Kriz et al., 2013⁵⁹) Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung von Glomeruli aus Ratten (A: gesunde Kontrolle, B: Masugi-Nephritis). A zeigt einen normalen Podozyten mit Primär- und Fussfortsätzen. B zeigt einen geschädigten Podozyten mit ausgeprägtem *Foot Process Effacement* und weiteren typischen Veränderungen aus einer Ratte mit Masugi-Nephritis. μm : Mikrometer

1.6 Die Protein-Tyrosin-Phosphatase *GLEPP1*

Das glomeruläre epitheliale Protein 1 (*Glomerular epithelial protein 1; GLEPP1*) ist eine membranständige Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTPase), welche hauptsächlich in der apikalen Membran des Podozyten, insbesondere im Bereich der podozytären Fussfortsätze, exprimiert wird^{63,64}. Die Struktur des humanen Proteins umfasst 1188 Aminosäuren (AS), wovon das reife Protein, abzüglich des Signalpeptids, 1159 AS lang ist und einem molekularen Gewicht von 200kDa entspricht (siehe Abbildung 9)^{63,65}. Aufgebaut ist das Protein aus einer großen extrazellulären Domäne, welche aus 8 Fibronectin Typ III-Komponenten besteht, einer hydrophoben transmembranären Domäne und einer einzelnen intrazellulären PTPase-Domäne⁶³.

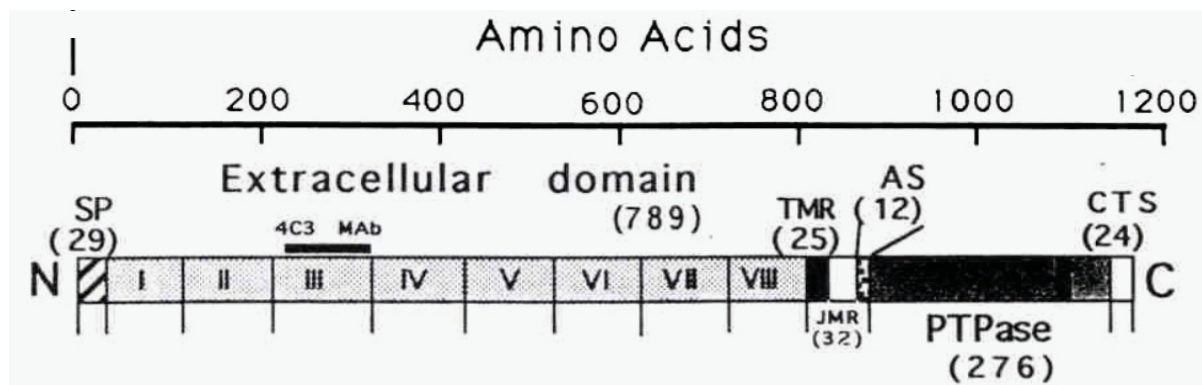


Abb. 9: Struktur des *Glomerular epithelial protein 1 (GLEPP1)* (aus Thomas et al., 1994⁶³) Hier gezeigt ist die Struktur des *GLEPP1*-Proteins aus Hasen bestehend aus 1187 Aminosäuren (AS). Das reife Protein ist abzüglich des Signalpeptids (29 AS) 1158 AS lang⁶³. Im menschlichen Organismus hat *GLEPP1* eine zusätzliche AS in der extrazellulären Domäne (1188 AS). Die Nukleotidsequenz von Kanninchen und Mensch sind zu 90% identisch, die AS-Sequenz zu 97% ähnlich und zu 98% gleich⁶⁵. I-VIII: Fibronectin-Untereinheiten der Extrazellulären Domäne (*Extracellular domain*), 4C3 MAb: Bindungsstelle des ursprünglich verwendeten monoklonalen Antikörpers, AS: wahrscheinlich alternierend gesplicete Region, CTS: C-terminale Sequenz, JMR: Juxtamembranäre Region, PTPase: Protein-Tyrosin-Phosphatase, SP: Signalpeptide, TMR: Transmembranäre Region

Das Gen *PTPRO* (*Protein-tyrosine phosphatase receptor type O*), welches auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 (12p12-p13) lokalisiert ist, kodiert für das Protein *GLEPP1*⁶⁵. Die genetischen Informationen für das Protein *GLEPP1* sind zwischen unterschiedlichen Spezies (Kanninchen, Maus, Mensch und Ratte) stark konserviert^{64,65}. Die genaue Funktion, der Signalmechanismus und mögliche Liganden von *GLEPP1* im Bezug auf den Podozyten sind bisher noch nicht sicher geklärt. Es ist bekannt, dass *GLEPP1* homolog zu anderen PTPasen ist. Hierzu gehört *RPTP-BK* (*Receptor-type protein-tyrosine-phosphatase expressed in brain and kidney*), welcher im zentralen Nervensystem, genauer gesagt in dem sich entwickelnden Neokortex in postmitotisch-reifenden Neuronen zu finden ist und vermutlich Aufgaben der neuronalen Axogenese übernimmt⁶⁶.

Die PTPase-Domäne von *GLEPP1* und *RPTP-BK* ist strukturverwandt mit einer murinen PTPase aus Makrophagen, der PTP Φ , welche wahrscheinlich für das Überleben, die Proliferation und Differenzierung von mononukleären Phagozyten wichtig ist^{66,67}. Untersuchungen zeigten, dass die Proteine PTP Φ , *RPTP-BK*, humanes *GLEPP1* und *GLEPP1* aus Kanneinchen verglichen mit dem murinen *GLEPP1* in der Aminosäuresequenz, der Gesamtlänge und der PTPase-Domäne zu jeweils über 90% ähnlich sind⁶⁴.

In verschiedenen wissenschaftlichen Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass *GLEPP1* eine Rolle in der Regulation von Struktur und Funktion der podozytären Fussfortsätze spielt^{63,65,68}. In sich entwickelnden Mausnieren wurde in der Glomerulogenese beobachtet, dass die Expression von *GLEPP1* im Podozyten mit fortschreitender Entwicklungsphase deutlich zunimmt und zum Zeitpunkt der Differenzierung des podozytären Phänotyps (Verlängerung der Fussfortsätze und deren Interdigitation) am größten ist⁶⁴.

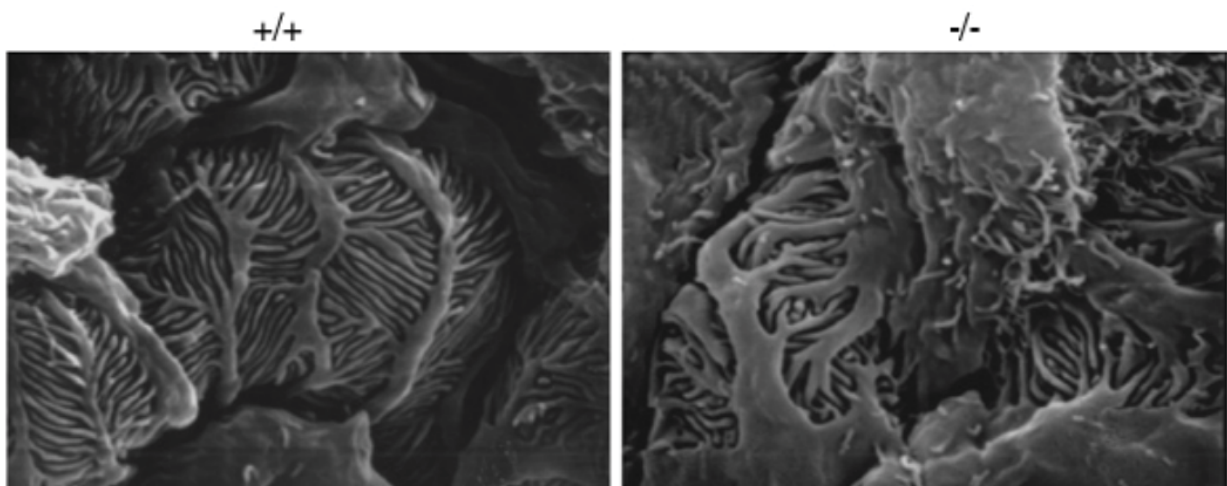


Abb. 10: Einfluss des *GLEPP1-Knockout* auf den Phänotyp der Podozyten im Mausmodell (modifiziert nach Wharram et al., 2000⁶⁸)

Die Abbildung zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Glomeruli von *GLEPP1*-Wildtyp (hier +/+, *PTPRO* +/+) und *GLEPP1*-defizienten-Mäusen (hier -/-; *PTPRO* -/-). Dargestellt ist der Unterschied von regulären, dünnen und verzweigten podozytären Fussfortsätzen im Wildtyp, im Vergleich zu verplumpten und verkürzten Fortsätzen bei nicht exprimiertem *GLEPP1* in den Podozyten. Endvergrößerung x10000.

In Mausmodellen wurde beobachtet, dass ein Ausschalten von *GLEPP1* zu verkürzten und verbreiterten Fussfortsätzen führte (siehe Abbildung 10)⁶⁸, welche einhergingen mit weniger interzellulären Verbindungen zwischen den Podozyten und einer reduzierten glomerulären Filtrationsstrecke⁶⁸. Aktuelle dreidimensionale elektronenmikroskopische Untersuchungen von *GLEPP1*-defizienten Mäusen konnten weiterführend zeigen, dass die Abwesenheit des Proteins zu starken GBM-Expansionen, GBM-Verdickungen, fokal-reduzierter Dichte an Podozytenfortsätzen und podozytären Invasionen in die GBM führt⁶⁹.

Das Auftreten von Proteinurie und Albuminurie in *GLEPPI*-defizienten Versuchstieren konnte bisher nicht beobachtet werden. Bezüglich der Nierenfunktion konnte erst nach Uninephrektomie eine eingeschränkte Nierenfunktion bei *GLEPPI KO* Mäusen festgestellt werden⁶⁸. Durch den Einsatz von Antikörpern gegen *PTPRO* konnte jedoch eine verminderte Phosphatase-Aktivität und ein Anstieg der glomerulären Albuminpermeabilität in Glomeruli von Kaninchen und Ratten beobachtet werden⁶⁵. Gründe für den Gegensatz der gesteigerten Albuminpermeabilität *in vitro* und keiner nachweisbaren Albuminurie und Proteinurie *in vivo* könnten zum einen eine tubuläre Rückresorption *in vivo* erklärt werden, zum anderen auf eine Kompensierung der nicht-vorhandenen Phosphatase-Aktivität von *GLEPPI* durch andere Phosphatasen hinweisen^{68,70}. Bezüglich der Interaktion des Rezeptors mit möglichen Liganden wurde in vorhergehenden Veröffentlichungen vermutet, dass *GLEPPI* durch eine homophile oder heterophile Interaktion für einen Zell-Zell-Kontakt verantwortlich sein könnte^{63,65,66}.

Innerhalb des letzten Jahrzehnts entwickelte sich *GLEPPI* zu einem sensitiven immunhistochemischen Indikator für glomeruläre Schäden bei Inflammation, zum Beispiel im Rahmen der Puromycin-Aminonucleoside-(PAN)-Nephrose oder der Immunglobulin A (IgA)-Nephropathie⁷¹⁻⁷⁴. Untersuchungen von Patienten, die an Formen des nephrotischen Syndroms erkrankt waren (MCN, FSGS, CNF) zeigten keine oder zumindest eine verringerte Expression von *GLEPPI*, sodass auch hier *GLEPPI* ein nützlicher phänotypischer Marker für einen glomerulären Schaden sein könnte⁷⁵. Weiterhin zeigten sich Zusammenhänge zwischen veränderter *GLEPPI*-Expression und dem Ansprechen von Steroid-Therapien von glomerulären Erkrankungen, wie der FSGS^{76,77}. Aktuelle Untersuchungen von *GLEPPI* im Bezug auf Brustkrebs und hepatozelluläre Karzinome konnten zeigen, dass von *GLEPPI* ein tumorsuppressiver Mechanismus auszugehen scheint^{78,79}.

Im Jahr 2011 wurden bei einer genetischen Untersuchung von 17 türkischen Familien mit autosomal-rezessiven SRNS 2 Familien identifiziert, in denen homozygote Mutationen im Bereich des *PTPRO*-Genes lokalisiert waren. Diese führten zu einem Verlust bzw. einem verkürzten Protein *GLEPPI*²⁹. Interessanterweise verursachten diese Mutationen bei 5 von 6 Kindern der Familien ein INS, in Form von *MCD* und FSGS, welches sich zwischen dem 5 und 14 Lebensjahr manifestierte und in einem Fall zur Transplantationsnotwendigkeit führte²⁹.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen von Studien konnten viele podozytäre Proteine identifiziert werden, deren Mutationen zu nephrotischen Syndromen führen. Im Jahr 2011 wurden 2 homozygote Mutationen im Gen für die podozytäre Protein-Tyrosin-Phosphatase *GLEPPI* mit Formen des idiopathischen nephrotischen Syndroms in Form von *MCD* und *FSGS* assoziiert.

Bisher ist die molekulare Funktion von *GLEPPI*, dessen Liganden oder die Signalkaskade des Proteins nicht bekannt. Ziel der Arbeit soll es sein, die molekulare Bedeutung von *GLEPPI* für das Glomerulum anhand von *GLEPPI* Wildtyp- und *KO*-Mäusen näher zu untersuchen. In eigenen Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *GLEPPI* mit einer Albuminurie in alternden Mäusen einhergeht.

Es stellten sich daher folgende Fragen, die in der vorliegenden Arbeit bearbeitet werden sollen:

1. Gibt es einen Unterschied in der Nierenfunktion zwischen *GLEPPI* Wildtyp- und *KO*-Mäusen in den unterschiedlichen Alterskohorten?
2. Liegen strukturelle Veränderungen des Glomerulums zwischen *GLEPPI* Wildtyp- und *KO*-Mäusen vor?
3. Lassen sich Unterschiede in der Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran zwischen *GLEPPI* Wildtyp- und *KO*-Mäusen auf RNA- und Proteinebene feststellen?
4. Welche Moleküle spielen in der Signalkaskade von *GLEPPI* eine Rolle?

2. Material

2.1 Geräte

7300 Real Time <i>PCR</i> System <i>qPCR</i> -Cycler	Life Technologies, Darmstadt (D)
Belüfteter Käfigschrank 9ARMV4124LR	Tecniplast, Buguggiate (I)
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg (D)
Centro LB 960 Mikroplatten Luminometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad (D)
DTX 880 Multimode Detector	Beckman Coulter, Krefeld (D)
DynaMag™-2 Magnet Magnetcatcher	Life Technologies, Darmstadt (D)
Heraeus™ Brutschrank B12 Function Line für Bakterien	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Heraeus™ Brutschrank Hera safe HS 12 für Zellen	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Heraeus™ Brutschrank safe KS 18-1/PE-AC für Zellen	Thermo Fischer Scientific, Waltham (US)
Imager FluorChem FC 2 Multimage Light Cabinet Filter Positions	Alpha Innotech, Santa Clara (US)
IP-Shaker Labquake Shaker Rotisserie	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Mikroskop Axiovert 40CFL für Zellkultur	Zeiss, Oberkochen (D)
Mikrowelle NN-E202-CB	Panasonic, Kadoma (J)
Mini SubCell GT Kammer für Agarosegelelektrophorese	Bio Rad, München (D)
Mini-Protean Tetra Cell SDS-Elektrophoreskammer	Bio Rad, München (D)
Mini-Trans-Blot Cell	Bio Rad, München (D)

MJ Resarch™ PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Bio Rad, München (D)
Multipette stream Multipipette	Eppendorf, Hamburg (D)
Multiply® Pro Gefäße 0,5ml (PCR)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Pharmacia™ Electrophoresis Power Supply EPS 600	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg (D)
Power Pac Universal für Elektrophorese	Bio Rad, München (D)
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Hamburg (D)
Shaker rocky plattform	VWR, Darmstadt (D)
Shaker IKA HS 260 control	IKA®, Staufen (D)
Stuart Shaker Minisee-Sawrocker SSM4	Bibby Scientific Limited, Stone (UK)
Stuart Shaker Rocky 3D	Bibby Scientific Limited, Stone (UK)
SMZ168 Stereo Zoom microscope Mikroskop für Operationstisch	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar (D)
Stereo CL1500 Eco Lampe für Operationstisch	Zeiss, Oberkochen (D)
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg (D)
TissueRuptor	Qiagen, Hilden (D)
Vortexer REAX control	Heidolph, Schwabach (D)
Wärmeschrank Modell 200 D06058	Memmert, Schwabach (D)
Wasserbad 1002	GFL, Burgwedel (D)
Wasserbad WB22	Memmert, Schwabach (D)

Heraeus™ Hera Safe KS18 Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Programmable Syringe Pump 11 Pico Plus Perfusionspumpe für Operationstisch	Harvard Apparatus, Holliston (US)
Heraeus™ Hera Safe HS12 Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Zentrifuge Heraeus™ Multifuge™ 4KR	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Zentrifuge Heraeus™ Pico21 centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Zentrifuge Modell 5417R	Eppendorf, Hamburg (D)
Zentrifuge Rotixa/RP 4200 für Zellkultur	Hettich, Tuttlingen (D)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Aspirationspipette steril 2ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Biosphere Filter Tips 0,5-20µl, 2-100µl, 2-200µl und 100-1000µl	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Bio-Ice Cooling Unit	Bio-Rad, München (D)
Cell Culture Dish 100mmx20mm Style, treated Polystyren, non-pyrogenic sterile	Corning Life Science, Corning (US)
Cell Culture Plate 12-Well Coster non-pyrogenic, Polystyren	Corning Life Science, Corning (US)
CellStar® EASYstreiner™ 100 µm	Greiner Bio-One , Frickenhausen (D)
CellStar® Tubes 15ml, 50ml	Greiner Bio-One , Frickenhausen (D)
Combitips advanced ® 0,5ml, 10ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Dualfilter T.I.P.S. ® SealMax, PCR clean, sterile, 0,1-10µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Filter 0,45mm Porengröße, non-pyrogenic, sterile	Sarstedt, Nümbrecht (D)

Fine Bore Polythene Tubing Katheter 0,58mm ID (0,96mm OD) 0,28mm ID (0,61mm OD)	Smiths medical, Grasbrunn (D)
Gel Blot Paper	VWR, Darmstadt (D)
Glasplatten mit 0,75mm Spacer 8,3x10,1cm	Biostep, Burkhardtsdorf (D)
Glasplatten 7,3x10,1cm	Biostep, Burkhardtsdorf (D)
Injekt®10ml Luer Solo Spritzen Microtest Plate 96 Well, F	B.Braun, Melsungen (D)
Microtest Plate 96 Well, F	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Nunc MaxiSorp® flat-bottom 96 well plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Mini-Protean Casting Frame	Bio-Rad, München (D)
Mini-Protean Casting Stand	Bio-Rad, München (D)
Mini-Protean Casting Stand Gaskets	Bio-Rad, München (D)
Mini-Protean Combs 0,75mm	Bio-Rad, München (D)
Mini Cell Buffer Dams	Bio-Rad, München (D)
Mini-Protean Tetra Electrode Assembly	Bio-Rad, München (D)
Mini-Protean Gel Releasers	Bio-Rad, München (D)
Mini-Protean Casting Frame	Bio-Rad, München (D)
Mini Trans-Blot Gel holder Cassette	Bio-Rad, München (D)
Mini Trans-Blot Foam Pads	Bio-Rad, München (D)
Mini Trans-Blot Central Core	Bio-Rad, München (D)
Nunclon® MicroWell plates, flat bottom, clear	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Omnifix® F 1ml	B.Braun, Melsungen (D)
Operationsbesteck	B.Braun, Melsungen (D) KLS Martin, Tuttlingen (D)
Opti-Seal Optical™ Disposable Adhesive	Bioplastics BV, Landgraaf (NL)
Pasteurpipetten 230mm	Brand, Wertheim (D)

PCR Plate 96-Well, semi-skirted	Starlab, Hamburg (D)
Petrischalen 92x16mm ohne Nocken	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Pipettenspitzen 20, 200 und 1000ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Polypropylene Round-Bottom Tube 5ml FACS-Röhrchen	BD, Heidelberg (D)
Innenröhrchen 110x24mm mit Schraubdeckel	Engelbrecht, Edermünde (D)
Rasierklingen CK07.1	Apollo-Herkenrath,, Solingen (D)
Safe Lock Tubes 0,5ml und 2ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Safe Seal Tubes 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, (D)
Schutzgefäße 114x44mm mit Schraubdeckel	Engelbrecht, Edermünde (D)
Serafelx® USP 5/0 Nahtmaterial	Serag Wiessner, Naila (D)
Serologische Pipetten 5, 10 und 25ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Sterican 100 (0,45*12mm, 0,3*12mm) Kanülen	B.Braun, Melsungen (D)
Sterile Pipetten Costar® Stripette 5, 10 und 25ml	Corning Life Science, Corning (US)
Tissue-Tek® Cryomold® Standard 25mmx20mmx5mm	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn (NL)
Telacomp Tupfer 5x5cm	Hartmann, Heidenheim (D)
Whatman Protran® Nitrozellulosemembran	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg (D)

2.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

Agarose Rotigarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Ammonium hydroxide solution (NH ₄ OH) 5M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
APS (Aluminiumperoxysulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Bromphenolblau Na-Salt	Serva, Heidelberg (D)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Serva, Heidelberg (D)
Compelte Mini Proteaseinhibitor Tabletten EDTA-free	Roche, Basel (CHE)
DL-Dithiothreitol solution (DTT) 1Mq	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Essigsäure 100%	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Ethanol LiChrosolv	Merck-Millipore, Darmstadt (D)
Ethidiumbromidlösung 0,025%	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Fixierungslösung 4% Formalin	Bezogen über Prof.Dr.T.Wiech, UK Hamburg-Eppendorf
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Glycin	AppliChem, Darmstadt (D)
H ₂ O ₂ Rotipuran Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Heparin-Natrium 25000	Ratiopharm, Ulm (D)
HiPerSolv CHROMANORM HPLC-H ₂ O	VWR, Darmstadt (D)

Isopentan	VWR, Darmstadt (D)
Isopropanol Rotipurán	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Isotonische Kochsalzlösung NaCl 0,9%	Fresenius Kabi, Bad Homburg (D)
K ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Ketavet 50 ad us. vet Injektionslösung	Pfizer, Berlin (D)
λ-Marker DNA-BstEII-Digest	New England Biolabs, Frankfurt am Main (D)
Luciferase Assay Reagent	Promega Corporation, Madison (US)
Luminol	Fluka, Buchs (CHE)
Methanol	AppliChem, Darmstadt (D)
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck-Millipore, Darmstadt (D)
Na ₂ VO ₄ (Natriumorthovanadat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Na ₄ P ₂ O ₇ (Natriumpyrophosphat)	MP Biomedicals, Santa Ana (US)
NaCl (Natriumchlorid)	AppliChem, Darmstadt (D)
NaF (Natriumfluorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
NaOH (Natriumhydroxid)	J.T. Baker, Phillipsburg (US)
Paraformaldehyd (PFA) 4%	Morphisto, Frankfurt a.M. (D)
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)

Power SYBR® Green <i>PCR</i> Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Prestained Protein Marker Broad Range	New England Biolabs , Frankfurt a.M. (D)
RNAse Away® Surface Decontaminants	VWR, Darmstadt (D)
RNAse freies H ₂ O	Qiagen, Hilden (D)
RNALater RNA Stabilization Reagent	Qiagen, Hilden (D)
Rompun® 2% Injektionslösung	Bayer, Leverkusen (D)
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) 30% Lösung aus Acrylamid und NN'Methylenbisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe (D)
SDS für Gele	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg (D)
SuperSignal® ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
TEMED 99% p.a. C ₆ H ₁₆ N ₂ (116,2g/l; Dichte:0,78)	Biostep, Burkhardtsdorf (D)
Tissue Freezing Medium® Einbettmedium für Kryokonservierung	Leica Biosystems, Nussloch (D)
TRIS-Base Pufferan	Carl Roth, Karlsruhe (D)
TRIS-HCl Trizma -Hydrochlorid	Sigma, Taufkirchen (D)
Triton X-100 reduced form	Fluka, Buchs (CHE)
Collagenase A (1,5 mg/ml in PBS)	Roche, Basel (CHE)
Collagenase CLSPA (5mg/ml in PBS)	Worthington Biochemical, Lakewood (US)
Dnase I	Roche, Basel (CHE)
Eco-RI, Eco-RV, Hind-III, Kpn-I, Mlu-I, Not-I, Sac-II, Xba-I Restriktionsenzyme für GAPDH-Kontroll- <i>PCR</i> Creatinine urinary Assay	New England Biolabs, Frankfurt a.M. (D) Cayman Chemical, Ann Arbor (US)
Dynabeads® Untouched™ Mouse T Cells Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)

HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden (D)
Maxiprep-Kit	Qiagen, Hilden (D)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Quantikine® ELISA – Mouse/Rat Cystatin	R&D Systems, Wiesbaden (D)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden (D)
RNeasy-Mini-Kit	Qiagen, Hilden (D)

2.4 Gele, Puffer und Lösungen

Sammelgel (pH 6,9) 8% und 10%	763mM Acrylamid 290mM Tris HCl 8mM Tris Base 7mM SDS 10mM APS 1,5 mM TEMED
Trenngel (pH 8,8) 8% SDS	1256mM Acrylamid 180mM Tris HCl 570mM Tris Base 7mM SDS 8,6mM APS 2mM TEMED
Trenngel (pH 8,8) 10% SDS	1570mM Acrylamid 180mM Tris HCl 570mM Tris Base 7mM SDS 8,6mM APS 2mM TEMED
Alkaline Detergent Puffer	0,0424mM 10% Triton X- 100 20mM NH ₄ OH-Lsg. mit PBS auf 50 ml auffüllen
β-Gal-Puffer 2x	200mM NaP pH 7,3 2mM MgCl ₂ 100mM β-Mercaptoethanol 1,3 mg/ml ONPG
BSA (5%) -Blocklösung	BSA in Proteinwaschpuffer

Desoxyribunuklease Puffer	10µg/ml Dnase I in PBS
HEBS (HEPES buffered saline) 2x	274mM NaCl 59mM HEPES 1,5mM Na ₂ HPO ₄ titriert mit NaOH auf pH7,05
HEPES-Fixation-Puffer	0,1M HEPES 4% Paraformaldehyd 2,5% Glutaraldehyd
K ₂ HPO ₄ -Lysispuffer	100mM K ₂ HPO ₄ titriert mit NaOH auf pH 7,8 0,02% Triton 0,1% DTT 1mM
Ketamin-Xylazin-Narkose	10% Ketamin 10% Xylazin 80% NaCl
2x Laemmli + DTT	90mM Tris HCl pH 6,8 126mM SDS 2463mM Glycerin 5,2mM Bromphenolblau 100mM DTT
4x Laemmli + DTT	160mM Tris HCl pH 6,8 224mM SDS 4378mM Glycerin 4,6mM Bromphenolblau 200mM DTT
Laufpuffer	23,1 mM Tris Base pH 8,5 3,5 mM SDS 191,8 mM Glycin
Proteinwaschpuffer	12,9mM Tris HCl pH 7,5 129mM NaCl 1,1mM Polysorbat 20
NEBuffer-2, NEBuffer-3, NEBuffer-4 Restriktionspuffer (10x) für GAPDH-Kontroll-PCR	New England Biolabs, Frankfurt a.M. (D)
RLT-Puffer + β-Mercaptoethanol	10 µl β-Mercaptoethanol in 1ml RLT-Plus-Puffer
TAE-Puffer	0,8mM Tris Base 0,4mM Essigsäure 10mM EDTA pH 8,0 titriert mit NaOH auf pH 8,0

Transferpuffer	61,9 mM Tris Base pH 8,5 480 mM Glycin 4938 mM Methanol
Triton-Lysispuffer 1%	17mM Triton 20mM Tris pH 7,5 50mM NaCl 50mM NaF 15mM Na ₄ P ₂ O ₇ 0,1mM EDTA 2mM Na ₂ VO ₄ 0,25mM PMSF 1 Tabl. Complete Mini/10ml

2.5 Antikörper

Alle Antikörper wurden mit 1x Proteinwaschpuffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

2.5.1 Primäre Antikörper

Name	Beschreibung	Konzentration	Bezogen über
Alpha 1 (IV) NC1 Rat IgG2a H11	<i>Rat monoclonal antibody against human non-collagenous domain 1 (NC1) of alpha 1 chain of type IV collagen</i>	1:200	Ph.D.Yoshikazu Sado (Shigei Medical Research Institute JPN); Nachbestellt über Chondrex Inc., Redmond (US) ⁸⁰
Alpha 2 (IV) NC1 Rat IgG2a H22	<i>Rat monoclonal antibody against human non-collagenous domain 1 (NC1) of alpha 2 chain of type IV collagen</i>	1:200	Ph.D.Yoshikazu Sado (Shigei Medical Research Institute JPN); Nachbestellt über Chondrex Inc., Redmond (US) ⁸⁰
Alpha 3 (IV) NC1 Rat IgG2a H31	<i>Rat monoclonal antibody against human non-collagenous domain 1 (NC1) of alpha 3 chain of type IV collagen</i>	1:200	Ph.D.Yoshikazu Sado (Shigei Medical Research Institute JPN); Nachbestellt über Chondrex Inc., Redmond (US) ⁸¹
Alpha 4 (IV) NC1 Rat IgG2b RH42	<i>Rat monoclonal antibody against human non-collagenous domain 1 (NC1) of alpha 4 chain of type IV collagen</i>	1:100	Ph.D.Yoshikazu Sado (Shigei Medical Research Institute JPN); Nachbestellt über Chondrex Inc., Redmond (US) ⁸¹
Alpha 5 (IV) NC1 Rat IgG2a M54	<i>Rat monoclonal antibody against human non-collagenous domain 1 (NC1) of alpha 5 chain of type IV collagen</i>	1:200	Ph.D.Yoshikazu Sado (Shigei Medical Research Institute JPN); Nachbestellt über Chondrex Inc., Redmond (US) ⁸⁰⁻⁸²
Anti-laminin alpha 1	<i>Antibody from rabbit</i>	1:500	Takako Sasaki (Oita University, JPN) ⁸³
Nidogen (C-7) sc-133175	<i>Mouse monoclonal antibody</i>	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (D)
Agrin (D-2) sc-374117	<i>Mouse monoclonal IgM specific for Agrin of rat origin</i>	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (D)

2.5.2 Sekundäre Antikörper

Name	Beschreibung	Konzentration	Bezogen über
ECL™ Anti-rat IgG	<i>Linked with HRP from goat</i>	1:7500	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg (D)
Anti-rabbit IgG sc-2004	<i>Linked with HRP from goat</i>	1:20000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (D)
Anti-mouse IgG	<i>Polyclonal antibody linked with HRP from goat</i>	1:10000	Dako, Hamburg (D)

2.6 Primer

2.6.1 Primer für GAPDH-Kontroll-PCR

Spezifität	Gen	Prod.	Richtung	Anneal.	Sequenz	Bestellt über
<i>Human, mouse</i>	GAPDH	cDNA 384bp	<i>For</i>	58°C	5'-GGT-CAT-CCA-TGA-CAA-CTT-TGG-TAT-CG-3'	MWG
<i>Human, mouse</i>	GAPDH		<i>Rev</i>	58°C	5'-GTC-GCT-GTT-GAA-GTC-AGA-GGA-GAC-3'	MWG

2.6.2 Primer für Real-time-PCR

Spezifität	Gen	Richtung	Prod.	Anneal.	Foto	Sequenz	Best. über
<i>Mouse</i>	Col4 α1S1	<i>For</i>	238 bp	58°C	78°C	5'-CTG-GCA-CAA-AAG-GGA-CGA-G-3'	MWG
<i>Mouse</i>	Col4 α1S1	<i>Rev</i>	238 bp	58°C	78°C	5'-ACG-TGG-CCG-AGA-ATT-TCA-CC-3'	MWG
<i>Mouse</i>	Col4 α2S2	<i>For</i>	106 bp	58°C	78°C	5'-TGC-TAC-CCG-GAG-AAA-GGA-G-3'	MWG
<i>Mouse</i>	Col4 α2S2	<i>Rev</i>	106 bp	58°C	78°C	5'-CTT-TGC-GGC-CCT-GTA-GTC-C-3'	MWG
<i>Mouse</i>	Col4 α3S7	<i>For</i>	94 bp	58°C	74°C	5'-GGG-ACA-TGT-AAC-TAC-TAC-TCA-AAC-TCC-3'	MWG
<i>Mouse</i>	Col4 α3S7	<i>Rev</i>	94 bp	58°C	74°C	5'-TCA-CAG-TTG-ATG-GAA-TAG-GTT-TTC-T-3'	MWG

<i>Mouse</i>	Col4 α4S4	<i>For</i>	69 bp	58°C	77°C	5'-CTG-GCT-TGA- AGG-GAG-ACC-T-3'	MWG
<i>Mouse</i>	Col4 α4S4	<i>Rev</i>	69 bp	58°C	77°C	5'-CTC-CTG-CAT- CAC-CAG-GAA-GT-3'	MWG
<i>Mouse</i>	Col4 α5	<i>For</i>	247 bp	63°C	77°C	5'-GGA-GAA-CGG- GGG-TTT-CCA-G-3'	MWG
<i>Mouse</i>	Col4 α5	<i>Rev</i>	247 bp	63°C	77°C	5'-CTC-CCT-TGG- TTC-CAT-TGC-ATC-3'	MWG
<i>Mouse</i>	Lam α1	<i>For</i>	165 bp	58°C	79°C	5'-ACT-GTC-ACC- CTG-GAC-TTA-CGG- 3'	MWG
<i>Mouse</i>	Lam α1	<i>Rev</i>	165 bp	58°C	79°C	5'-GCG-GGT-CAA- ACA-CTC-TGT-ATC-3'	MWG
<i>Mouse</i>	Lam α5	<i>For</i>	158 bp	58°C	78°C	5'-ATG-AGG-TCA- ACG-TCA-CAC-TGG- 3'	MWG
<i>Mouse</i>	Lam α5	<i>Rev</i>	158 bp	58°C	78°C	5'-CTT-GGA-GGA- GGC-AAA-GAA-CTG- 3'	MWG
<i>Mouse</i>	Lam β1	<i>For</i>	162 bp	58°C	79°C	5'-GGT-TCG-AGG- GAA-CTG-CTT-CT-3'	MWG
<i>Mouse</i>	Lam β1	<i>Rev</i>	162 bp	58°C	79°C	5'-GGC-AAA-TCG- TGG-TAG-AAA-TCC- 3'	MWG
<i>Mouse</i>	Lam β2	<i>For</i>	131 bp	58°C	78°C	5'-ATG-TGC-TGC- CTA-AGG-ATG-ACC- 3'	MWG
<i>Mouse</i>	Lam β2	<i>Rev</i>	131 bp	58°C	78°C	5'-CCC-TGT-TCC- GAT-CAG-TTT-CA-3'	MWG
<i>Mouse</i>	HIF 1α	<i>For</i>	137 bp	58°C	75°C	5'-TTG-CCA-AAA- GAG-GTG-GAT-ATG- 3'	MWG
<i>Mouse</i>	HIF 1α	<i>Rev</i>	137 bp	58°C	75°C	5'-GGA-GAA-AAT- CAA-GTC-GTG-CTG- 3'	MWG
<i>Mouse</i>	18S	-	129 bp	55°C	72°C	Herstellerspezifisch	Quanti -Tect

2.7 Nährmedium und Chemikalien für Zellkultur

CaCl ₂ 0,25M und 0,5M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
DMEM mit 3,7g/l NaCl, stabilem Glutamin 4,5g/l Glucose und 1g/l Glucose	Biochrom, Berlin (D)
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin (D)
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- Ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
PBS w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺ , low endotoxin	Biochrom, Berlin (D)
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)	Biochrom, Berlin (D)

2.8 Transformation, Mini- und Maxikulturen

Ampicillin-Natrium	Serva, Heidelberg (D)
Tetracyclin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
LB-Broth Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Lenox L-Agar	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
LB-Medium	20mg/ml LB-Broth Base gelöst in <i>Aq. bidest.</i>
LB-Agar	32mg/ml Lenox L-Agar 30mg/ml NaOH gelöst in <i>Aq. bidest.</i>
LB-Medium mit Ampicillin	100mg Ampicillin /ml LB- Medium
LB-Medium mit Ampicillin und Tetracyclin	25mg Ampicillin und 75mg Tetracyclin/ml LB-Medium

2.9 Plasmide

Konstrukt	Bezogen über
3xAP1 pGL3	Addgene, Cambridge (US)
CDM 8	Kloniert, vorbeschrieben durch Sellin et al. (2003) ⁸⁴
CDM Nephtrin WT	Kloniert, vorbeschrieben durch Sellin et al. (2003) ⁸⁴
HA-VHL-pRc/CMV	Addgene, Cambridge (US)
Ig GLEPP cyt	Kloniert, vorbeschrieben durch Doktorarbeit von Sarah Grabowski
P1242 3x-KB-L NFκB-Konstrukt	Addgene, Cambridge (US)
pcDNA 3.1. <i>DDR1b</i>	Bezogen über Dr. Birgit Leitinger, Imperial College, London (UK)
pCMV lacZ	Kloniert, vorbeschrieben durch Sellin et al. (2003) ⁸⁴
STAT1/3 Luciferase reporter assay construct	Bezogen über Thomas Weimbs Lab, University of California, Santa Barbara (US)
V5 GLEPP FL	Kloniert, vorbeschrieben durch Doktorarbeit von Sarah Grabowski

2.10 Softwareprogramme

AlphaView® Imaging and Analysis Software	Alpha Innotech, Santa Clara (US)
Applied Biosystems System SDS RQ Study Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Excel 2011 für Mac	Microsoft, Redmont (US)
FluorChem FC2	Alpha Innotech, Santa Clara (US)
GraphPad Prism6®	GraphPad Software, San Diego (US)
ImageJ Image Processing and Analysing in Java	Wayne Rasband, Bethesda (US)
IrfanView	Irfan Skiljan, Graduate of Vienna University, Wien (A)
MicroWin 2000	Mikrotec Laborsysteme, Overath (D)
NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Powerpoint 2011 für Mac	Microsoft, Redmont (US)
Rest 2009	TU München, München (D) und Qiagen, Hilden (D)
Word 2011 für Mac	Microsoft, Redmont (US)

3. Methoden

3.1 Methoden der Versuche im Maus-Tiermodell

3.1.1 Versuchstiere

Für die Versuche im Tiermodell wurden Wildtyp (WT)- und *GLEPPI Knockout (KO)*-Mauslinien auf einem 129P3/J Hintergrund verwendet und im Alter von 4, 6 und 10 Monaten miteinander verglichen. Der generalisierte *GLEPPI KO* wurde 2000 von Wharram et al. auf einem C57/Bl6 beschrieben. Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden durch Rückkreuzung auf einen 129P3/J Hintergrund erzeugt⁸⁵.

Alle Versuchstiere wurden entsprechend des Tierschutzgesetzes in der Zentralen Einrichtung für Tierversuche und Tierschutz Düsseldorf (ZETT Düsseldorf) gezüchtet und gehalten. Das Projekt ist mit der Projektnummer O68/08 am Landesamt für Natur-/Umwelt- und Verbraucherschutz angemeldet und durch die Behörde genehmigt. Die versuchstierkundlichen Fachkenntnisse nach *FELASA* B-Richtlinien wurden vom 12.Mai – 26.Juni 2014 in Berlin erworben.

3.1.2 Perfusion der Nieren und Organentnahme

Die Präparation der Versuchstiere, die Perfusion der Nieren und die Organentnahme wurden nach dem Protokoll von Potthoff et al. modifiziert durchgeführt⁸⁶. Ein tabellarisches Protokoll der chronologisch durchgeführten Präparationsschritte, sowie eine bebilderte Präparationsanleitung sind der Tabelle 1 und der Abbildung 11 zu entnehmen⁸⁶.

Für die Fixierung in 4%-igem Formalin, die Kryo-Konservierung in Tissue-Tek[®] O.C.T. (*Optimum cutting temperature*) und die Fixierung in HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) wurden die Nieren nach der Perfusion mit PBS aus dem Situs entnommen und nach Entfernung der bindegewebigen Kapsel sofort in das jeweilige Fixationsmedium überführt. Für die Isolierung von Glomeruli wurde im Anschluss an die PBS-Perfusion eine weitere Perfusion der Nieren mit DynaBeads[®]-Lösung (350µl/12ml PBS) durchgeführt (1,8ml/min). Nach Perfusion von 5ml wurden die braun-gefärbten Nieren entnommen, die bindegewebige Kapsel entfernt und die Isolierung der Glomeruli durchgeführt.

1	Tötung des Versuchstiers mittels zervikaler Dislokation
2	Fixierung in Rückenlage und Desinfektion der ventralen Bauch- und Thoraxwand mit Isopropanol (70%)
3	Medianer Hautschnitt vom Becken bis zum Sternum und Ablösung der Haut von der Muskelfaszie, laterale Entlastungsschnitte der Haut und Freilegung des abdominellen Muskelschlauchs (4-Quadranten-Hautschnitt)
4	Medianschnitt durch die abdominelle Muskelschicht (Blase bis Xyphoid) und laterale Entlastungsschnitte zur Freilegung des Abdomens (4-Quadranten-Muskelschnitt)
5	Fixierung des eröffneten Abdomens mit Klemmen
6	Seitverschiebung der abdominellen Organe mit einem Tupfer
7	Präparation der abdominellen Aorta (AO) und Beseitigung von Faszien, Fett und anderem Gewebe im Bereich des Retroperitoneums
8	Ligatur der hepatischen und mesenterialen Arterien kranial der Nierengefäße
9	Ligatur der AO und der Vena cava inferior (VCI) kaudal der Nierenarterien oberhalb der Bifurkation
10	Ligatur der subdiaphragmalen Anteile der AO kranial der Nierenarterien
11	Festziehen der mesenterialen und subdiaphragmalen Ligaturen und Betonung des retroperitonealen Gefäßstranges mit einer Klemme
12	Eröffnung der AO kranial der kaudalen Ligatur und Einbringen des Spülkatheters
13	Fixieren der Spülkatheters in kaudaler Ligatur und anschließend Festziehen der Ligatur
14	Perfusion mit kaltem PBS (4°C) starten (1,5-1,8ml/min)
15	Eröffnung der linken Nierenvene auf Höhe der Nierenarterienkreuzung zum Druckausgleich
16	Vollständige Entfärbung der Niere

Tabelle 1: Tabellarisches Protokoll der Präparation der Versuchstiere mit anschließender Perfusion der Nieren mit PBS (nach Potthoff et al., 2008⁸⁶)

°C: Grad Celsius, min: Minute, ml: Milliliter

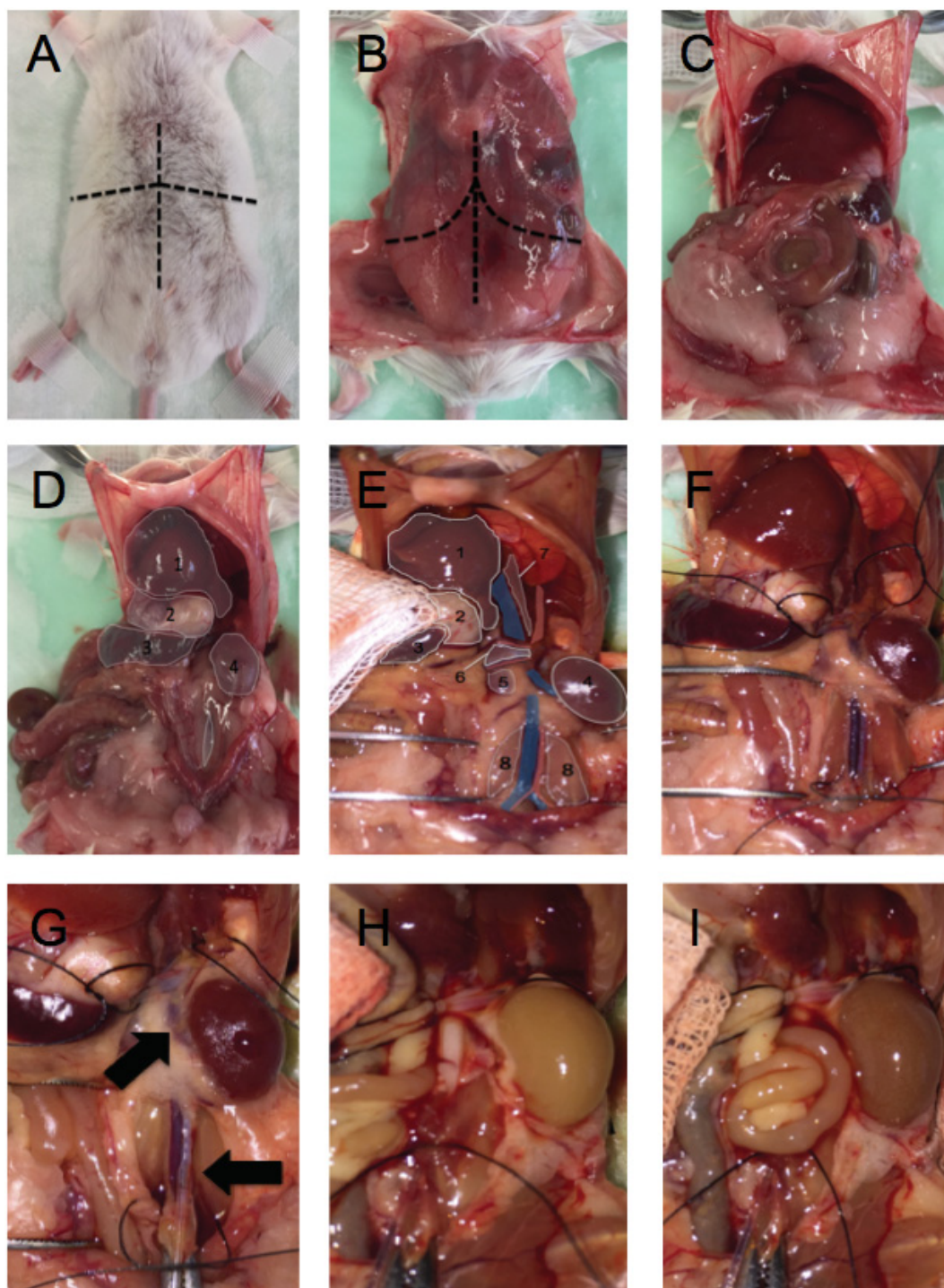


Abb. 11: Bebilderte Darstellung der Präparationsschritte der perfundierten Niere (nach Potthoff et al., 2008⁸⁶) Nach Tötung durch zervikale Dislokation wurde das Versuchstier in Rückenlage fixiert (A) und die Haut mit einem 4-Quadranten-Schnitt (---) von der abdominellen Muskelfaszie gelöst (B). Nach Eröffnung des Abdomens (---) (C) wurden die abdominellen Organe zur Seite verlagert (D). Anschließend wurde das Retroperitoneum präpariert und die Aorta (AO), die Mesenterial- und Leberarterien, die Vena cava inferior (VCI) und die rechte Nierenvene dargestellt (E). Für die Perfusion der Nieren wurde die AO suprarenal und infrarenal, sowie die Mesenterial- und Leberarterien, ligiert (F). Nach Einführen des Katheters in die infrarenale AO (←) und Punktion der linken Nierenvene (→) zur Entlastung (G) wurde die Perfusion beider Nieren mit PBS durchgeführt, bis sich die Niere vollständig entfärbte (H). Im Anschluss erfolgte die Perfusion mit DynaBeads[®] für die spätere Isolierung der Glomeruli (I). 1: Leber, 2: Magen, 3: Milz, 4: linke Niere, 5: rechte Niere, 6: Ligament mit Leber- und Mesenterialarterie, 7: Zwerchfellschenkel, 8: Psoasmuskel, rot: AO, blau: VCI

3.1.3 Isolierung der Glomeruli

Die Isolierung der Glomeruli wurde direkt im Anschluss an die Organentnahme nach dem Protokoll von Potthoff et al. modifiziert durchgeführt⁸⁶.

Die Nieren der Versuchstiere wurden nach oben geschildertem Protokoll mit PBS und *DynaBeads*[®] (Invitrogen) perfundiert und entnommen. *DynaBeads*[®] sind magnetische Partikel, die aufgrund ihres Durchmessers im Kapillarsystem der Glomeruli verbleiben und im weiteren Arbeitsprozess eine magnetische Separation der Glomeruli von anderen Zellen ermöglichen.

1	Zerhacken der Niere mit Rasierklinge, bis eine flüssige Masse entsteht
2a	Nur für <u>RNA-Isolierung</u> : Überführen der Masse in 2ml <i>Tubes</i> und Verdau mit 1ml <i>Collagenase A</i> (1,5mg/ml, in PBS) in Wasserbad für 30min bei 37°C
2b	Nur für <u>Protein-Isolierung</u> : Überführen der Masse in 2ml <i>Tubes</i> mit 1ml PBS auf Eis
3	Mechanische Homogenisierung des Verdauansatzes durch Auf- und Abpipettieren mit 1000µl Pipette
4	Gemisch auf Zellsieb (100µm) über einem 50ml <i>Tube</i> geben und mithilfe eines Stempels restliche Stücke durch das Sieb reiben; abwechselnd mit 10ml PBS spülen
5	Überführen des Gemisches auf ein neues Zellsieb über 50ml <i>Tube</i> ; restliche Stücke ggf. mit Stempel durch Sieb reiben; mit PBS spülen und <i>Tube</i> auf 50ml auffüllen
6	Zentrifugation (5min/239g/4°C)
7	Überstand absaugen
8	<i>Pellet</i> mit 1,5ml PBS resuspendieren und in 2ml <i>Tubes</i> überführen
9	<i>Tubes</i> auf Eis in Magnetcatcher stellen
10	Überstand aus <i>Tube</i> abnehmen und verwerfen
11	Separiertes <i>Pellet</i> in 1ml PBS resuspendieren
12	Arbeitsschritt 10-12 solange wiederholen, bis die Reinheit der Probe (Verhältnis zwischen Glomeruli und Tubuli/anderen Zellresten) unter dem Mikroskop $\geq 90\%$ ist

Tabelle 2: Tabellarisches Protokoll der Isolierung von Glomeruli aus perfundierten Mausnieren für RNA-Isolierung und Proteinextraktion (nach Potthoff et al., 2008⁸⁶) °C: Grad Celsius, g: Gewichtskraft, mg: Milligramm, min: Minute, ml: Milliliter, µl: Mikroliter, µm: Mikrometer

Die Glomeruli-Isolierung erfolgte ausschließlich mit Filterspitzen. Für die Isolierungen von RNA wurden Materialien, Arbeitsflächen und Fingerspitzen nach Möglichkeit mit *RNAse away*[®] gereinigt.

Die isolierten und aufgereinigten Glomeruli wurden im Anschluss an das Protokoll weiterverarbeitet. Für die RNA-Isolierung wurden die Glomeruli in 300µl RLT Puffer und β-Mercaptoethanol (10µl/ml) gelöst. Für die Isolierung der Proteine wurden verschiedene Verdau- und Extraktionsprotokolle verwendet.

3.1.4 Gesamt-Proteinbestimmung

Mithilfe des *Pierce BCA Protein Assay Kit* wurde eine Gesamt-Proteinbestimmung mit dem Ziel durchgeführt, dass die zu vergleichenden Kollagen-/Lamininextrakte in äquivalentem Verhältnis in die SDS-Gelelektrophorese eingebracht werden können. Dieses kolorimetrische Verfahren erlaubte die Konzentrationsbestimmung von Proteinen durch eine Vergleichsmessung mit einem Proteinstandard. Die Durchführung wurde nach Herstellerangaben modifiziert.

Von jeder Probe wurden 100µl der Glomeruli-Suspension (siehe Tabelle 2, Schritt 11) verwendet. Die Glomeruli wurden separiert und anschließend in 1%-igem Triton-Lysis-Puffer lysiert. Das Lysat wurde zur Proteinbestimmung 1:3 mit *Aq. dest.* verdünnt.

Als Albuminstandard wurde die *Bovine Serum Albumin* (BSA)-Stocklösung (2mg/ml) aus dem Kit verwendet und nach festgelegtem Schema verdünnt (siehe Tabelle 3).

Standard (STD)	BSA-Stocklösung (2mg/ml)	<i>Aq. bidest.</i> (µl)	Konzentration (µg/ml)
STD 1	-	10	0
STD 2	50µl von STD 3	200	25
STD 3	162,5µl von STD 4	162,5	125
STD 4	162,5µl von STD 5	162,5	250
STD 5	162,5µl von STD 7	162,5	500
STD 6	87,5µl von STD 8	87,5	750
STD 7	162,5µl	162,5	1000
STD 8	187,5µl	62,5	1500

Tabelle 3: Verdünnungsreihe der *Bovine Serum Albumin* (BSA) -Stocklösung für Herstellung der Albumin-Standardreihe

Aq. bidest.: Doppelt-destilliertes Wasser, mg: Milligramm, ml: Milliliter, µl: Mikroliter

Für das Arbeitsreagenz wurden 50 Teile *BCA*-Reagenz A mit 1 Teil *BCA*-Reagenz B vermischt und bis zur Verwendung dunkel gelagert.

Auf eine Nunc-96-Loch Platte wurden jeweils 10µl Probe und Standard in Doppelwerten pipettiert und 200µl des Arbeitsreagenz mit der Multipipette in jedes Well hinzugefügt. Nach Inkubation (37°C, 30min) erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 562nm und Auswertung mit einem DTX 880 *Multimode Detector* (Beckman Coulter). Die Konzentrationen der Proben wurde nach der Standardkurve berechnet und mit dem Verdünnungsfaktor 3 multipliziert.

3.1.5 Kollagenase-Verdau der Glomeruli

Die folgende Methode wurde für die Isolierung von Kollagen Typ IV aus den Glomeruli verwendet. Um die unterschiedlichen Kollagen Typ IV-Ketten im Westernblot zu detektieren, mussten die NC1 Domänen der Kollagen Typ IV-Ketten exponiert werden. Hierzu wurden die Glomeruli nach oben beschriebenem Verfahren isoliert und aufgereinigt. Nach abgeschlossener Gesamt-Proteinbestimmung wurde die Hälfte der Glomeruli-Suspension (450µl) (siehe Tabelle 2, Schritt 11) für den Kollagenase-Verdau eingesetzt. Unter sterilen Bedingungen wurde der u.g. Verdau mit der *Collagenase* CLSPA Worthington angesetzt (siehe Tabelle 4).

CLSPA- Mastermix	63,2µl PBS (steril) 0,8µl CaCl 500mM (in PBS) 16µl <i>Collagenase</i> CLSPA Worthington (5mg/ml, in PBS)
-----------------------------	--

Tabelle 4: Zusammensetzung des *Collagenase*-CLSPA-Verdauansatzes
mg: Milligramm, min: Minute, ml: Milliliter, mM: Millimol/Liter, µl: Mikroliter

Mithilfe des Magnetcatchers wurden die Glomeruli separiert und in 80µl des Verdauansatzes resuspendiert. Anschließend wurde das Gemisch für 12h bei 37°C im Wasserbad verdaut.

Nach Ablauf der 12h wurden die Proben direkt auf Eis gestellt und zentrifugiert (4°C, 20817g, 15min). Der Überstand, welcher die gelösten NC1 Domänen des Kollagen Typ IV enthielt, wurde mithilfe eines Magneten von den Dynabead-perfundierten Zellresten getrennt und in Abhängigkeit vom Volumen mit 4xLämmli+DTT versetzt. Nach Aufkochen der Proben (95°C, 5min) wurden diese entweder bei -20°C gelagert oder direkt für die SDS-Gelelektrophorese verwendet.

3.1.6 Lamininextraktion aus Glomeruli

Für die Isolierung von Laminin aus den isolierten Glomeruli wurde das Protokoll von Lennon R. et al verwendet und modifiziert⁸⁷. Nach Isolierung der Glomeruli und oben beschriebener Gesamtproteinbestimmung, wurde die Hälfte der Suspension (450µl) für die Lamininextraktion verwendet. Die Glomeruli wurden mithilfe eines Magneten separiert und in 1%-igem Lysis-Puffer auf Eis 30min lysiert. Eine chronologische Auflistung der Arbeitsschritte ist Tabelle 5 zu entnehmen.

1	Zentrifugation (4°C, 20817g, 10min)
2	Überstand mithilfe eines Magneten von <i>Pellet</i> trennen und in neues <i>Tube</i> überführen (1.Fraktion)
3	Resuspendierung des <i>Pellets</i> in 500µl <i>Alkaline detergent buffer</i> und Inkubation auf Eis für 30 min
4	Zentrifugation (4°C, 20817g, 10min)
5	Überstand mithilfe eines Magneten von <i>Pellet</i> trennen und in neues <i>Tube</i> überführen (2.Fraktion)
6	Resuspendierung des <i>Pellets</i> in 500µl <i>Desoxyribonuclease I buffer</i> und Inkubation auf Eis für 30min
7	Zentrifugation (4°C, 20817g, 10min)
8	Überstand mithilfe eines Magneten von <i>Pellet</i> trennen und in neues <i>Tube</i> überführen (3.Fraktion)
9	Resuspendierung des <i>Pellets</i> in 75µl 2xLämmli+DTT (ECM-Fraktion)
10	Kochen der ECM-Fraktion in Thermocycler für 20min bei 70°C

Tabelle 5: Protokoll der Extraktion von Laminin aus isolierten Glomeruli (nach Lennon R. et al, 2014⁸⁷) °C: Grad Celsius, DTT: Dithiothreitol ECM: extrazelluläre Matrix, g: Gewichtskraft, mg: Milligramm, min: Minute, ml: Milliliter, µl: Mikroliter

Die Proben wurden im Anschluss an das Extraktionsprotokoll bei -20°C gelagert oder direkt für die SDS-Gelelektrophorese verwendet.

3.1.7 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Die SDS-Gelelektrophorese ist eine Methode, die von Laemmli UK eingeführt wurde und zur Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe verwendet wird⁸⁸. Im Vorfeld wurden die Proteine mit Dithiothreitol (DTT) und Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert, um das Verhältnis von Molekülmasse und Ladung anzugleichen.

Die linearisierten Proteine konnten jetzt mithilfe einer diskontinuierlichen *SDS-Page*, bestehend aus Sammelgel und Trenngel, elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Aufgrund der negativen Ladung der Proteine wanderten diese von der Kathode der Gelelektrophoresekammer zur Anode, wobei größere Proteine durch einen höheren Widerstand langsamer migrieren als Kleinere. Mithilfe eines Western Blot wurden die aufgetrennten Proteine vom SDS-Gel elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (*geblottet*). Die Darstellung der Proteinbanden erfolgte nach Inkubation der Nitrozellulosemembran mit primären und sekundären Antikörpern mit dem *Imager* durch Chemolumineszenz.

Zunächst wurden gereinigte Glasplatten in die Haltevorrichtung eingespannt und die Gele gegossen. Für die Auftrennung des verdauten Kollagen wurden 10%-ige SDS-Gele verwendet, für die Auftrennung der Lamininextrakte 8%-ige SDS-Gele. Zuerst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten pipettiert und mit 100%-igem Isopropanol überschichtet. Nach Zugabe von Temed und 10%-igem Ammoniumperoxodisulfat (APS) polymerisierte das Acrylamid. Nach Aushärten des Gels wurde das Isopropanol abgeschüttet, der Zwischenraum mit destilliertem Wasser gespült und mit Filterpapier getrocknet. Anschließend wurde das Sammelgel nach Zugabe Temed und 10%-igem APS auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Aussparung der Kammern für das Laden der Proben eingebracht. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurden die Glasplatten aus der Haltevorrichtung entfernt, gründlich gereinigt und der Kamm gezogen. Die Glasplatte mit dem enthaltenen Gel wurden jetzt in die Gelelektrophoresekammer eingespannt und diese nach Herstellerangaben mit Laufpuffer gefüllt. Nach gründlichem Spülen der Kammern wurden die Proben äquivalent anhand der Ergebnisse der Gesamt-Proteinbestimmung geladen. Maximal wurden 20µl des Kollagenverdau und 25µl des Lamininextrakt verwendet.

Als Marker wurde durchgehend 7µl *Broad Range Prestained Protein Marker* (New England Biolabs) geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese in 2 Phasen:

- 1.Phase: Konzentration der Proteine im Sammelgel durch eine kontinuierliche Spannung von 70V für 30min
- 2.Phase: Proteinauftrennung im Trenngel durch eine kontinuierliche Stromstärke von 20mA für 90min.

Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel von den Glasscheiben gelöst und das Sammelgel in Transferpuffer gewaschen.

Zusammen mit Schwämmen, Blotting-Papier und einer Nitrozellulosemembran wurde das Gel in einer Blotapparatur (*Sandwich*) fixiert, ohne dabei Luftblasen zwischen Gel und Membran einzuschließen. Die Blotapparatur wurde in eine gekühlte Blotkammer eingespannt und diese mit Transferpuffer gefüllt.

Anschließend wurden die Proteine auf die Nitrozellulosemembran bei einer kontinuierlichen Stromstärke von 200mA für 1,5h (Kollagenverdau) bzw. für 2h (Lamininextrakt) *geblottet*.

Die beladene Nitrozellulosemembran wurde mit Proteinwaschpuffer gewaschen und 1h bei 37°C in Blocklösung (BSA 5% in Proteinwaschpuffer) inkubiert. Das Blocken mit BSA diente der Reduzierung von unspezifischen Bindungen. Die Blocklösung wurde abgegossen und die Membran drei mal 5min in Proteinwaschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C in Primärantikörper inkubiert, welcher sich gegen das zu untersuchende Proteinbindungsmuster richtete.

Die Membran wurde in Proteinwaschpuffer erneut gewaschen und anschließend mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase, HRP*) gekoppeltem Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, welche sich gegen den F_c-Teil der Primärantikörper richteten.

Abschließend wurde die Membran erneut gewaschen und mit 1 ml *SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate* entwickelt. Die durch *HRP* ausgelöste Chemilumineszenz wurde mithilfe eines Imagers dargestellt. Die Lagerung der Nitrozellulosemembranen erfolgte bei 4°C in Proteinwaschpuffer.

3.1.8 Isolierung der Gesamt-RNA aus Glomeruli

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden die Glomeruli von jeweils einer Niere verwendet. Nach dem oben beschriebenen Waschvorgang wurden diese in 300µl β-Mercaptoethanol (10µg/ml) haltigen RLT-Puffer gelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Die Isolierung von RNA wurde mit dem *RNeasy-Mini-Kit* durchgeführt, welches nach Herstellerangaben verwendet wurde. Zu jedem Zeitpunkt wurden Nitrilhandschuhe und ein Mundschutz getragen. Flächen, Gefäßständer, Pipetten und die Zentrifuge wurden vorher mit *RNAse away*[®] gereinigt. Es wurde ausschließlich mit Filterspitzen und bei Raumtemperatur gearbeitet.

Mit einem *Tissue Ruptor* wurde die Glomeruli-Suspension unter einem Abzug 30s bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert und im Anschluss in ein 1,5ml-*Tube* überführt. Das Protokoll der Gesamt-RNA-Isolierung aus Glomeruli ist der Tabelle 6 zu entnehmen.

1	Zentrifugation der 1,5ml <i>Tubes</i> für 3 min bei 21100g
2	Überstand abnehmen und in gDNA- <i>Eliminator Mini Spin Column</i> überführen
3	Zentrifugation der gDNA- <i>Eliminator Mini Spin Column</i> für 15s bei 8000g
4	Hinzufügen von 250µl Ethanol (70%)
5	250µl des Gemisches auf <i>Rneasy Mini Spin Column</i> (RNA-Säule) geben
6	Zentrifugation der RNA-Säule für 15s bei 8000g; Zentrat verwerfen
7	Rest des Gemisches (300µl) auf RNA-Säule geben
8	Zentrifugation der RNA-Säule für 15s bei 8000g; Zentrat verwerfen
9	Hinzufügen von 350µl RW1-Puffer
10	Zentrifugation der RNA-Säule für 15s bei 8000g; Zentrat verwerfen
11	Hinzufügen von 70µl RDD-Puffer und 10µl Dnase I und Inkubation für 15min
12	Hinzufügen von 350µl RW1-Puffer
13	Zentrifugation der RNA-Säule für 15s bei 8000g; Zentrat verwerfen
14	Hinzufügen von 500µl RPE-Puffer
15	Zentrifugation der RNA-Säule für 15s bei 8000g; Zentrat verwerfen
16	Hinzufügen von 500µl RPE-Puffer
17	Zentrifugation der RNA-Säule für 15s bei 8000g; Zentrat verwerfen
18	Umsetzen der RNA-Säule in neues Auffanggefäß
19	Zentrifugation der RNA-Säule für 2min bei 21100g
20	Umsetzen der RNA-Säule in 1,5ml- <i>Tube</i>
21	Hinzufügen von 50µl RNase-freies H ₂ O
22	Zentrifugation der RNA-Säule für 1min bei 8000g

Tabelle 6: Protokoll der RNA-Isolierung aus Glomeruli

g: Gewichtskraft, mg: Milligramm, min: Minute, ml: Milliliter, µl: Mikroliter, s: Sekunden

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch mithilfe eines *NanoDrop Spectrophotometer* bestimmt. Hierzu wurde das Gerät mit 1µl RNase-freiem Wasser geeicht und anschließend 1µl der isolierten RNA geladen.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der Absorption bei 260nm und 280nm. Mithilfe des Extinktionsquotienten E_{260nm}/E_{280nm} konnte die Qualität der RNA beurteilt werden. Für die nachfolgenden Versuche wurde ausschließlich RNA mit einem Quotienten zwischen 1,5 und 2,2 verwendet.

3.1.9 Umschreibung der RNA in cDNA

Mithilfe einer Reversen Transkriptase (RT) wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Diese ist wesentlich stabiler und wurde für die anschließende Analyse mit *Real-Time-PCR* (qPCR) verwendet.

Für die reverse Transkription wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Im ersten Schritt wurde die isolierte RNA mithilfe des gDNA *Wipeout Buffers* verdaut, um die Probe von Verunreinigungen in Form von genomischer DNA (gDNA) zu befreien (siehe Tabelle 7). Im Anschluss erfolgt die Umschreibung von RNA zu komplementärer DNA (cDNA). Hierfür wurden maximal 750µg RNA eingesetzt. Das Volumen wurde bei Bedarf mit RNase-freiem H₂O (Qiagen) auf 12µl erweitert.

gDNA-Verdau	2µl	gDNA <i>Wipeout Buffer</i> (7x)
	12µl	RNA (maximal 1µg)
	mit RNase-freiem H ₂ O auf 14µl auffüllen	

Tabelle 7: Zusammensetzung des gDNA-Verdauansatzes
µg: Mikrogramm, µl: Mikroliter

Das Gemisch wurde für 3min im vorgeheizten *Thermocycler* bei 42°C inkubiert und im Anschluss sofort auf Eis gestellt. Für die spätere Kontrolle des gDNA-Verdauansatzes in einer GAPDH-Kontroll-PCR wurden 0,5µl des Gemisches entnommen und in 0,5µl-PCR-Tubes pipettiert. Zu den verbleibenden 13,5µl des Verdauansatzes wurden jetzt 6,5µl des Reverse-Transkriptase-Reaktionsgemisches hinzugegeben (siehe Tabelle 8), welcher unmittelbar vor Gebrauch auf Eis angesetzt wurde.

Real-Time-Ansatz	1µl	Quantiscript <i>Reverse Transcriptase</i>
	4µl	Quantiscript RT <i>Buffer</i> (5x)
	1µl	RT Primer <i>Mix</i>
	0,5µl	RNase freies Wasser

Tabelle 8: Zusammensetzung des Reverse-Transkriptase-Reaktionsgemisches
µl: Mikroliter

Zur Synthese der cDNA wurden die Proben für 25min im vorgeheizten *Thermocycler* bei 42°C inkubiert. Direkt im Anschluss erfolgte die Inaktivierung der RT im *Thermocycler* für 3min bei 95°C.

Die Quantifizierung der cDNA wurde ebenfalls mit Hilfe des NanoDrop *Photospectrometer* durchgeführt (siehe 3.1.8). Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -80°C.

3.1.10 GAPDH-Kontroll-PCR

Zur Kontrolle der umgeschriebenen cDNA wurde eine GAPDH-Kontroll-PCR durchgeführt. Ziel dieser PCR ist die Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte mithilfe einer Taq-Polymerase, welche durch die verwendeten Primer vorgegeben wurden.

Für die PCR wurde die *HotStarTaq DNA Polymerase*, das *Master Mix Kit* von Qiagen, sowie ein handelsüblicher Thermocycler verwendet. Es wurden zur Kontrolle jeder Probe 0,5µl der Gesamt-RNA, 0,5µl der Gesamt-RNA nach gDNA-Verdau (siehe 3.1.9) und 0,5µl der cDNA in die PCR eingebracht.

Zu jeder Probe wurde 19,5µl des folgenden Reaktionsansatzes gegeben (siehe Tabelle 9). Proben und Reaktionsgemisch wurden ausschließlich auf Eis pipettiert. Die verwendeten Primer sind der Materialauflistung (siehe 2.6.1) zu entnehmen.

GAPDH-Reaktionsgemisch	16,78µl	HPLC H ₂ O
	2µl	10x Puffer
	0,4µl	dNTP's
	0,1µl	Primer <i>sense</i> GAPDH
	0,1µl	Primer <i>antisense</i> GAPDH
	0,12µl	Hot Star Taq DNA Polymerase

Tabelle 9: Zusammensetzung des GAPDH-Reaktionsgemisches

µl: Mikroliter

Für die Amplifizierung der spezifischen DNA-Abschnitte mittels GAPDH-Kontroll-PCR wurde durchweg das gleiche Protokoll (siehe Tabelle 10) verwendet.

Phase	Anzahl der Zyklen	Temperatur (in °C)	Zeit
Initiale Aktivierung der taq-Polymerase	1	95	15min
DNA-Denaturierung	39	95	30s
Primer-Annealing	39	58	30s
Elongation	39	72	40s
Inaktivierung	1	4	5min

Tabelle 10: Amplifizierungsprotokoll der GAPDH-Kontroll-PCR

°C: Grad Celsius, min: Minuten, s: Sekunden

Die amplifizierten Proben wurden im Anschluss an die PCR mittels einer Agarose-Gelelektrophorese elektrochemisch aufgetrennt und ausgewertet.

3.1.11 Agarose-Gelelektrophorese

Bei dieser Methode werden die Nukleinsäurestränge anhand ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wandern aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode zur Anode der Elektrophoresekammer. Die Gelmatrix wirkt hierbei als Filter, in welchem größere DNA-Abschnitte stärker zurückgehalten werden, als Kleinere. Die Auftrennung erfolgte in einem Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Agarose-Gel (1,5%). Für die Herstellung wurde Agarose in 1xTAE-Puffer gelöst und mit Ethidiumbromid versetzt, ein Farbstoff, welcher in Nukleinsäuren interkaliert und durch UV-Licht zu Fluoreszenz angeregt werden kann.

Anschließend wurde das Gel in einem Gestell gegossen und nach Polymerisation in eine Gelelektrophoresekammer eingespannt, welche mit 1xTAE-Puffer geflutet wurde.

Zu den amplifizierten Proben der *PCR* wurde als Probenpuffer jeweils 2µl des anionischen Azofarbstoffes Orange G gegeben, um die Laufmittelfront zu markieren.

9µl der Proben wurden in die Taschen des Agarosegels geladen. Zum Vergleich wurden 7µl eines Längenstandard (100bp *DNA-Ladder*) geladen.

Nach Auftrennung der DNA-Abschnitte bei 90V für 35min erfolgte die Darstellung der DNA-Banden unter UV-Licht mithilfe des *Imagers*. Banden mit einer Größe von 576bp wurden als Kontamination mit gDNA interpretiert, Banden mit einer Größe von 382bp als die gewünschte cDNA. Für die nachfolgende *qPCR* wurde ausschließlich cDNA verwendet, die keine Kontaminationen der cDNA zeigte.

3.1.12 Real-Time-PCR (*qPCR*)

Die Quantitative *Real-Time-PCR* (*qPCR*) ist ein auf herkömmlicher *PCR* basiertes Verfahren, bei dem nach jedem *PCR*-Zyklus die entstandene Menge DNA über eine photometrische Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden kann.

Hierzu wurde der Farbstoff SYBR Green I verwendet (*Power SYBR Green PCR Master Mix* von Applied Biosystems©), welcher in die doppelsträngige DNA interkaliert und einen Fluoreszenzfarbstoffkomplex bildet und Licht emittiert. In der Denaturierungsphase trennen sich die komplementären DNA-Stränge und die Fluoreszenz sinkt durch Auflösung des Fluoreszenzkomplexes auf Nahe 0. Am Ende jedes *PCR*-Zyklus interkaliert *SYBR Green* erneut in die hybridisierten Doppelstränge und die Zunahme an DNA kann über den Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden. Die *qPCR* wurde mit dem *7300 Real Time PCR System* von Applied Science und 96-Well-*PCR*-Platten von StarLab durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurde die cDNA mit RNase-freiem Wasser 1:2 H₂O verdünnt.

Auf die *qPCR*-Platte wurden pro Well 19µl des Reaktionsansatzes pipettiert, welcher im Vorfeld auf Eis angesetzt wurde (siehe Tabelle 11). Anschließend wurde 1µl der verdünnten cDNA hinzugefügt. Für jede Probe wurden Doppelwerte pipettiert.

QuantiTec-Primer	MWG-Primer
7µl RNase-freies H ₂ O 10µl Sybr. Green (2x) 2µl QuantiTec-Primer (10x)	8,5µl RNase-freies H ₂ O 10µl Sybr. Green (2x) 0,25µl MWG- <i>forward</i> -Primer 0,25µl MWG- <i>reverse</i> -Primer

Tabelle 11: Zusammensetzung des *qPCR-Mastermix* für QuantiTect- und MWG-Primer
µl: Mikroliter

In den durchgeführten Versuchen wurden mithilfe der aufgelisteten Primer verschiedene Kollagen Typ IV- und Laminin-Ketten, sowie HIF1 α untersucht. Die verwendeten Primer mit ihren spezifischen Temperaturen für die Anlagerung der Primer (Annealing) und die Messung der Fluoreszenz (Aufnahmetemperatur) sind der Materialauflistung (siehe 2.6.2) zu entnehmen. Als Housekeeper wurde 18S verwendet.

Die beladene *PCR*-Platte wurde mit Folie abgeklebt und in einer Zentrifuge für 45sec bei 529g zentrifugiert. Das verwendete Amplifikationsprotokoll der *qPCR* kann der Tabelle 12 entnommen werden. Das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA-Abschnitte wurde im Anschluss an die Amplifikation in einer Dissoziationsreihe bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der SDS RQ Study Software und Rest 2009 Software.

Phase	Anzahl der Zyklen	Temperatur (in °C)	Zeit
Initiale Aktivierung der taq-Polymerase	1	95	15min
DNA-Denaturierung	40	95	15s
Primer-Annealing	40	Primerspezifisch (siehe 2.6.2)	30s
Elongation	40	72	30s
Fluoreszenzmessung (Aufnahme)	40	Primerspezifisch (siehe 2.6.2)	34s
Dissoziation	1	95	15s
		60	1min
		95	15s
		60	15s

Tabelle 12: Amplifikationsprotokoll der qPCR

°C: Grad Celsius, min: Minute, s: Sekunden

3.1.13 Histologische PAS-Färbung von Glomeruli

Die *PAS (Periodic acid-Schiff)*-Reaktion ist eine histochemische Färbetechnik zur Anfärbung von kohlenhydratreichen Komponenten in histologischen Präparaten wie der glomerulären Basalmembran der Glomeruli. Die Nieren der Versuchstiere wurden nach PBS-Perfusion von der bindegewebigen Kapsel getrennt und in 4%-iger Formalinlösung (Wiech-Lösung) fixiert. Die Präparate und die Bereitstellung von Bilddateien einzelner angefärbter Glomeruli wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Thorsten Wiech (UK Hamburg-Eppendorf) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software ImageJ.

3.1.14 Auswertung der PAS-Färbungen mit Image J

Die Auswertung der von Herrn Prof. Dr. Thorsten Wiech angefertigten PAS-Präparaten wurde mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ durchgeführt. Ziel der Auswertung war der Vergleich von Veränderungen der glomerulären Basalmembran (GBM) zwischen WT- und KO-Mäusen.

Mithilfe von ImageJ wurden diejenigen fokalen Membranverdickungen markiert, welche subpodozytär und im Randbereich des Glomerulums nahe der Bowman-Kapsel lokalisiert waren. Diese mussten mindestens die doppelte Dicke der unveränderten GBM aufweisen. Die graphische Aufarbeitung und Auswertung der Bilder erfolgte mit den entsprechenden Add-ons von ImageJ und sind dem Fotoprotokoll in Abbildung 12 zu entnehmen.

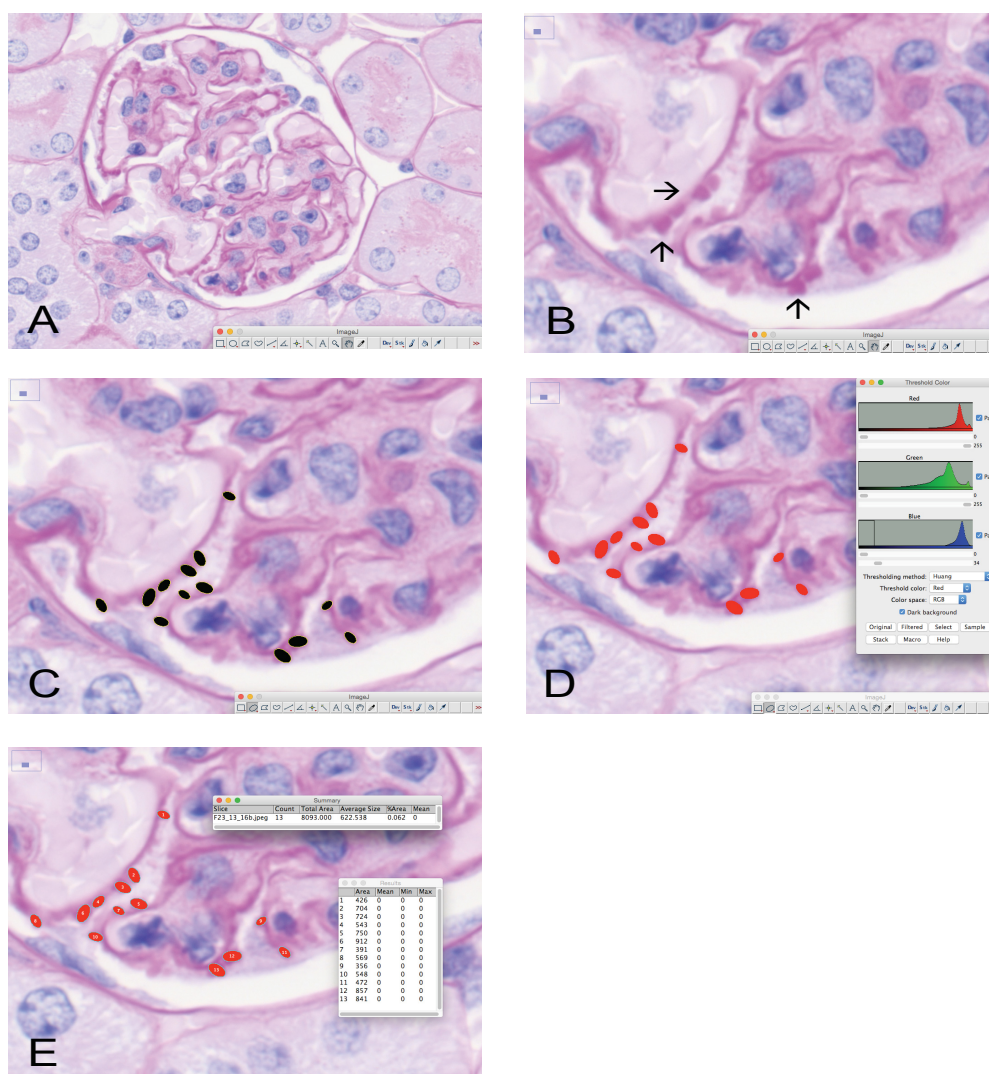


Abb. 12 : Auswertung der PAS-Bilder mit ImageJ

Dargestellt ist die Auswertung der PAS-gefärbten Glomeruli (A) mittels der Software ImageJ. Zunächst wurden die Abschnitte des Glomerulums vergrößert, welche fokale, subpodozytäre *Humps* (Verdickungen der Basalmembran) zeigten (B; →). Diese wurden markiert (C) und mithilfe eines Schwellenwertverfahrens (*Thresholding*) angepasst (D). Anschließend erfolgte die Auswertung der markierten *Humps* mittels Analysefunktion (E).

3.1.15 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Glomeruli

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der WT- und *KO*-Glomeruli wurden ebenfalls freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Thorsten Wiech (UK Hamburg-Eppendorf) nach Übersendung von in 4%-iger Formalinlösung konservierten Mausnieren durchgeführt. Die Immunogold-Färbungen von Nierenpräparaten der Ratte und anschließende transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen wurden von Prof. Dr. Donscho Kerjaschki (Universität Wien) angefertigt und zur Verfügung gestellt. Die Fixierung der Mausnieren für die 3D-elektronenmikroskopische Untersuchung der Glomeruli wurde nach dem Protokoll von Frau Dr. Rachel Lennon (University of Manchester) durchgeführt (siehe Tabelle 13). Die Mausnieren wurden nach PBS-Perfusion entnommen und sofort in die Fixierlösung überführt. Bei Raumtemperatur wurden die Proben nach Manchester versendet. Die weitere Verarbeitung, die Durchführung der Elektronenmikroskopie, sowie die Bereitstellung von rekonstruiertem 3D-Bildmaterial wurde freundlicherweise von Frau Dr. Rachel Lennon durchgeführt.

1	Fixierung der Niere in 0,1M HEPES (4%Paraformaldehyd, 2,5%Glutaraldehyd) für 30min bei Raumtemperatur
2	Entfernung des zentralen Nierenbeckens und des Nierenmarks
3	Zerkleinerung des Nierenkortex in 2-4mm ³ große Stücke
4	Überführung der Stücke in 0,1M HEPES (4%Paraformaldehyd, 2,5%Glutaraldehyd) für 2h bei 4°C
5	Zweifaches Waschen der Stücke mit 0,1M HEPES
6	Überführung der Probe in ein mit 0,1M HEPES gefülltes 2ml- <i>Tube</i>

Tabelle 13: Fixierung von Nierengewebe für 3D-elektronenmikroskopische Aufnahmen
 °C: Grad Celsius, h: Stunden, M: Mol/Liter, min: Minute, ml: Milliliter, mm³: Kubikmillimeter

3.1.16 Kryokonservierung der Nieren und Immunhistochemie

Kryokonservierung ist eine Methode, bei der Gewebeproben in einem Trägermedium eingefroren werden, um ihre Vitalität möglichst lange zu erhalten. Für die Konservierung der Nieren wurden diese mit PBS perfundiert, von Ihrer Kapsel befreit und in ein Trägermedium überführt. Das Trägermittel (Tissue-Tek® O.C.T™) wurde als Frostschutz verwendet, welches innerhalb weniger Sekunden bei -70°C in flüssigem Isopentan zu einem starren Block gefror.

Die Lagerung der konservierten Nieren erfolgte bei -80°C . Für die Anfertigung immunhistochemischer Färbungen von Glomeruli wurden diese Kryoblöcke an Frau Dr. Cathrine Meyer-Schwesinger (UK Hamburg-Eppendorf) versendet, die freundlicherweise die Anfertigung der Präparate und deren Färbung durchführte.

3.1.17 Bestimmung der Albumin-Kreatinin-Ratio im Mausurin

Die Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR) wurde als Indikator für die Beurteilung der Funktion des glomerulären Filters verwendet. Der Urin der Versuchstiere wurde in der Narkoseeinleitung als Spontanurin oder intraoperativ als Blasenpunktion gewonnen, abzentrifugiert und bei -80°C gelagert. Für die Berechnung der ACR wurde die Konzentration von Albumin (mg/l) auf die Konzentration von Kreatinin (mg/dl) im Mausurin bezogen.

Für die Bestimmung der Kreatinin-Konzentration im Urin der Versuchstiere wurde das *Creatinine urinary Assay* von Cayman Chemical nach Herstellerangaben verwendet. Vor Versuchsbeginn wurden die Proben 1:20 mit HPLC- H_2O verdünnt und der Reaktionsansatz (*Alkaline Picrate Solution*) vorbereitet (siehe Tabelle 14).

Alkaline Picrate Solution	Je 150 μl pro Well:
	13,89 μl <i>Sodium Borate</i>
	41,67 μl <i>Surfactant</i>
	69,44 μl <i>Color Reagent</i>
	25 μl <i>Sodium Hydroxide</i>

Tabelle 14: Reaktionsansatz für die Kreatininbestimmung
 μl : Mikroliter

Jeweils 15 μl eines Albuminstandards und 15 μl jeder verdünnten Probe wurden in Doppelwerten auf eine 96-Well-Sarstedt-Platte pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 μl Alkaline Picrate Solution pro *Well* gestartet und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die initiale Absorption (I_{abs}) im Plattenreader bei 490-500nm gemessen. Nach Zugabe von 5 μl *Acid Solution* in jedes *Well* wurde die Platte erneut für 20min bei Raumtemperatur inkubiert und die finale Absorption (F_{abs}) bestimmt. Anhand der Absorptionen konnte eine Standardkurve berechnet und die Kreatinin-Konzentration bestimmt werden.

Die Bestimmung der Albuminkonzentration im Mausurin wurde freundlicherweise von der CellTrend GmbH (Luckenwalde) durchgeführt. Hierfür wurden die Proben auf Trockeneis versendet.

3.1.18 Bestimmung von Cystatin C im Mausplasma

Für die Bestimmung von Cystatin C im Plasma der Versuchstiere, einem Protein, welches als Marker für die Nierenfunktion verwendet wird, wurde der *Quantikine*® *ELISA* (engl.: *Enzyme linked immunosorbant assay*)– *Mouse/Rat Cystatin* (R&D systems) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieses antikörperbasierte Nachweisverfahren basiert auf einem quantitativen *Sandwich-ELISA*. Das im Plasma enthaltene Cystatin C soll an polyklonale spezifische Antikörper auf einer Mikroplatte binden. Anschließend wird das gebundene Cystatin C mit *HRP*-gekoppelten polyklonalen Antikörpern gekoppelt. Durch eine Enzymreaktion mit einem Substrat soll ein Farbumschlag erzeugt werden, dessen Intensität proportional zur enthaltenen Menge Cystatin C in den Plasmaproben ist. Das Blut der Versuchstiere wurde mittels retrobulbärer Blutabnahme entnommen und im Anschluss daran das Plasma durch zweimalige Zentrifugation (240g, 4°C, 5min) von zellulären Bestandteilen getrennt. Anschließend wurden die verschiedenen Reagenzien *Mouse/Rat Cystatin C control*, *Wash Buffer*, *Substrate solution*, *Calibrator diluent RD5-26* und *Mouse/Rat Cystatin C Standard* nach Protokoll resuspendiert bzw. verdünnt. Die einzelnen Arbeitsschritte des Assays sind der Tabelle 15 zu entnehmen.

1	Vorlegen von 50µl <i>Assay diluent</i> RD1W in jedes <i>Well</i> der Mikroplatte
2	Hinzufügen von 50µl Standard, <i>Control</i> und Probe pro <i>Well</i> in Doppelwerten
3	Abkleben der Mikroplatte und Inkubation für 2h bei Raumtemperatur
4	Aspiration der Lösung und 5-maliges Waschen mit 400µl <i>Wash Buffer</i>
5	Hinzufügen von 100µl <i>Cystatin C Conjugate</i> in jedes <i>Well</i>
6	Abkleben der Mikroplatte und Inkubation für 2h bei Raumtemperatur
7	Aspiration der Lösung und 5-maliges Waschen mit 400µl <i>Wash Buffer</i>
8	Hinzufügen von 100µl <i>Substrate Solution</i> in jedes <i>Well</i> und 30min Inkubation (lichtgeschützt) bei Raumtemperatur (Blauer Farbumschlag)
9	Hinzufügen von 100µl <i>Stop Solution</i> in jedes <i>Well</i> (Gelber Farbumschlag)
10	Messen der optischen Dichte bei 450nm (Wellenlängenkorrektur 540-570nm) mittels Plattenreader

Tabelle 15: Tabellarisches Protokoll der Cystatin C-Bestimmung in Mausplasma

h: Stunden, µl: Mikroliter, nm: Nanometer

3.2 Methoden zur DNA-Klonierung

3.2.1 Bakterienstämme

Für die DNA-Klonierung wurden die kompetenten *E.coli*-Stämme MC1061 und MC1061P3 verwendet.

Stamm	Resistenz auf verwendeten Plasmiden	Verwendete Agarplatte
<i>E.coli</i> MC 1061	Ampicillin	LB-Agar + Ampicillin (100µg/ml)
<i>E.coli</i> MC 1061 P3	Ampicillin/Tetracyclin	LB-Agar + Ampicillin (25µg/ml) + Tetracyclin (7,5µg/ml)

Tabelle 16: Auflistung der verwendeten *E.coli*-Stämme und deren Resistenz

E.coli: Escherischia coli, ml: Milliliter, µl: Mikrogramm

3.2.2 Transformation

Transformation ist die nicht-virale Übertragung freier DNA in einen Organismus. Mit dieser Methode wurden kompetente Bakterienstämme mit rekombinanten DNA-Plasmiden versehen, welche von den Bakterien durch Endozytose aufgenommen und transformiert wurde. Bei jeder Zellteilung wurde somit das transformiert DNA-Plasmid kloniert.

Zu 50µl der jeweiligen Bakteriensuspension wurde 1µg der zu klonierenden Plasmid-DNA pipettiert. Für 15min wurde der Transformationsansatz auf Eis gestellt, damit sich das Plasmid an die Zellmembran der Bakterien anlagert. Anschließend wurde der Ansatz bei 37°C für 5min im *Thermocycler* inkubiert und die Endozytose der Plasmide initiiert.

Der Ansatz wurde im Anschluss auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum (siehe Tabelle 16) aufgetragen werden. Die Platte wurde bei 37°C über Nacht (12h) in einem Brutschrank inkubiert, so dass bei erfolgreicher Transformation Bakterienkulturen mit entsprechender Resistenz auf den Antibiotika-Agar-Platten wachsen konnten.

3.2.3 Mini- und Maxikulturen

Das Überführen von angezüchteten Bakterienkulturen in Mini- und Maxikulturen wurde für die weitere Klonierung der DNA-Plasmide durchgeführt. Nach Kontrolle des Bakterienwachstums wurde jeweils 1 Kolonie einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze geerntet und zusammen mit 3ml LB-Medium in ein 15ml-*Tube* gegeben.

Das LB-Medium wurde gemäß der Resistenz auf den verwendeten Plasmiden mit Ampicillin (100µg/ml) oder Ampicillin+Tetracyclin (25µg/ml Amp. + 75µg/ml Tet.) versetzt.

Die Minikulturen wurden mind. 8 Stunden bei 37°C und 220 Umdrehungen/min in einem dynamischen Inkubator gestellt, bis eine deutliche Trübung des Mediums zu verzeichnen war. Die Maxikulturen wurden in 0,5l Erlenmeyerkolben angesetzt. Zu jeweils 200ml LB-Medium wurden entsprechend der transformierten Resistenzen Antibiotika hinzugegeben. Anschließend wurden aus den angezüchteten Mini-Kulturen mit einer sterilen Pipettenspitze 200µl der Bakteriensuspension entnommen und in den Erlenmeyerkolben überführt. Die Maxikulturen wurden dann über Nacht (mindestens 12 Stunden) bei 37°C und 220 Umdrehungen/min inkubiert.

3.2.4 Plasmidpräparation

Die Maxikulturen wurden nach mind. 12 Stunden Inkubationszeit in große Plastikbehälter überführt und für die Plasmidpräparation vorbereitet. Für diese Methode wurde das Plasmid-Maxi-Kit verwendet. Vor Beginn des Protokolls wurde der P1-Puffer mit RNase A-Lösung und LyseBlue versetzt und gemeinsam mit dem P3-Puffer auf Eis gestellt. Die Maxiprep wurde für die Isolierung der Plasmide aus den Bakterien verwendet.

Die Bakterien wurden pelletiert und mithilfe des P1-Puffers lysiert. Anschließend wurden die Proteine ausgefällt und die DNA über eine Säule herausgefiltert.

Nach Aufreinigung der DNA durch Spülen der Säule mit verschiedenen Puffern, wurde die DNA aus der Säule gelöst, pelletiert und in HPLC-H₂O resuspendiert. Das chronologische Protokoll der Maxi-Prep ist in Tabelle 17 aufgeführt. Die Konzentration der Plasmide wurde mithilfe eines NanoDrop Spectrophotometers bestimmt und im Anschluss bei 4°C gelagert.

1	Zentrifugation der Bakteriensuspension (4654g, 15min, 4°C)
2	Überstand verwerfen
3	Lyse der Bakterien: Resuspendierung des <i>Pellet</i> in 10ml P1-Puffer (versetzt mit RNase A-Lsg. und <i>LyseBlue</i>) und Überführung in ein 50ml- <i>Tube</i>
4	Inhibition der Lyse: Hinzufügen von 10ml P2-Puffer
5	Mischen durch 4-6maliges Schwenken und Inkubation 5min bei Raumtemperatur
6	Ausflockung der Proteine: Hinzufügen von 10ml P3-Puffer
7	Mischen durch 4-6maliges Schwenken und Inkubation 20min auf Eis
8	Zentrifugation (4654g, 60min, 4°C)
9	Überführung des Überstandes in neues 50ml- <i>Tube</i>
10	Zentrifugation (4654g, 60min, 4°C)
11	Equilibrierung der Säule mit 10ml QBT-Puffer und Überstand hinzufügen
12	2x Spülen der Säule 30ml QC-Puffer
13	Säule auf neues 50ml- <i>Tube</i> überführen
14	Spülen der Säule mit 15ml QF-Puffer und Entsorgung der Säule
15	Hinzufügen von 10,5ml 100%igem Isopropanol zum Eluat
16	Zentrifugation (4654g, 60min, 4°C)
17	Abdekantieren des Überstandes
18	Hinzufügen von 5ml 70%igem Ethanol zum DNA- <i>Pellet</i> ohne es zu resuspendieren
19	Zentrifugation (4654g, 20min, 4°C)
20	Abdekantieren des Überstandes und Lufttrocknung des <i>Pellet</i>
21	Resuspendieren des <i>Pellet</i> in 200µl HPLC-H ₂ O

Tabelle 17: Protokoll der Maxi-Prep zur Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienstämmen

°C: Grad Celsius, g: Gewichtskraft, min: Minuten ml: Milliliter, µl: Mikroliter

3.2.5 Diagnostischer Verdau der Plasmide

Zur Kontrolle der klonierten DNA-Plasmide wurden diese im Anschluss an die Maxiprep diagnostisch verdaut. Hierzu wurden 1,5µg DNA in ein *Tube* vorgelegt und mit einem Reaktionsgemisch aus 0,7µl Enzym 1, 0,7µl Enzym 2 und 3µl des jeweiligen 10xPuffers versetzt (siehe Tabelle 18).

Alle verwendeten Enzyme und Puffer wurden über New England Biolabs® bezogen. Der Verdauansatz wurde anschließend mit HPLC-H₂O auf 30µl Zielvolumen gebracht und bei 37°C für 1h im Thermocycler inkubiert.

Plasmid	Enzym 1	Enzym 2	10x Puffer
CDM slg Glepp cyt	Mlu-1	Not-1	NEBuffer 3
pcDNA3 V5 Glepp FL	Mlu-1	Not-1	NEBuffer 3
CDM slg Glepp cyt WPA	Mlu-1	Not-1	NEBuffer 3
P1242 3x-KB-L	Hind-3	Eco-R5	NEBuffer 2
pCMV lacZ	Eco-R1	-	NEBuffer 3
CDM slg	Mlu-1	Not-1	NEBuffer 3
pcDNA3 <i>DDR1b</i>	Eco-R1	Xba-1	NEBuffer 4
HA-VHL- pRC/cMV	Kpn-1	Sac-2	NEBuffer 2
CDM8	Mlu-1	Not-1	NEBuffer 3
CDM Nephtrin WT	Hind-3	Not-1	NEBuffer 2
SRC	Eco-R5	-	NEBuffer 3
pcDNA STAT 1/3	Eco-R5	-	NEBuffer 3
3xAP-1	Eco-R5	-	NEBuffer 3

Tabelle 18: Übersicht der Enzyme und Puffer für den diagnostischen Verdau von erzeugter Plasmid-DNA

Nach abgeschlossenem Verdau wurden jeweils 10µl Verdauansatz in ein 1,5%-iges Agarose-Ethidiumbromid-Gel geladen. Als Vergleichsgröße wurden 7µl des λ-DNA Marker (New England Biolabs®, Frankfurt a.M., D) geladen. Die Elektrophorese erfolgte für 40min bei 90V in einer mit 1xTAE Puffer gefüllten Gelelektrophoresekammer. Die Darstellung der aufgetrennten DNA-Banden erfolgte im *Imager* durch Chemolumineszenz.

3.3 Methoden der Versuche in der Zellkultur

3.3.1 Zelllinie

Für die Versuche wurden humane embryonale Nierenzellen (*Human embryonic kidney cells, HEK293T*) verwendet, welche transfizierte DNA-Abschnitte des Adenovirus Typ 5 beinhalten⁸⁹.

3.3.2 Zellkultur der *HEK293T*-Zellen

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter einer sterilen Werkbank mit desinfizierter Arbeitsfläche durchgeführt, um die Kontamination der Zellen zu vermeiden. Die *HEK293T*-Zellen wurden in einem *DMEM*-Medium mit 2,25g/l Glucose und 10% FCS in 10cm-Kulturschalen kultiviert. Die Umweltbedingungen im Brutschrank betragen jederzeit 37°C bei 5% CO₂. Die Zellen wurden alle 2 Tage passagiert (*gesplittet*), um eine Konfluenz der Zellen zu vermeiden.

Das alte Medium wurde abgesaugt und die Kultur vorsichtig mit 5ml sterilem PBS gespült. Nach sofortigem Absaugen wurde 1ml Trypsin (37°C) auf die Zellen gegeben, um die adhärenen Zellen von der Schale zu lösen. Die Schalen wurden im Anschluss 5min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde entsprechend des Splitverhältnisses *DMEM*-Medium (2,25g/l Glucose + 10% FCS) hinzugefügt. Durch Aspiration mit einer Pipettierhilfe wurden die Zellen vereinzelt. Danach konnte die Zellsuspension je nach Splitverhältnis in vorbereitete 10cm-Kulturschalen mit *DMEM*-Medium (2,25g/l Glucose + 10% FCS) verteilt werden.

3.3.3 Transfektion

Für die transiente Transfektion von Plasmid-DNA in die *HEK293T*-Zellen wurde eine Calcium-Phosphat-Präzipitation angewendet. Die Plasmid-DNA bildet Komplexe mit dem Calcium-Phosphat, welche sich an die Zelloberfläche der Zellen anlagert und durch Phagozytose in die Zellen aufgenommen wird⁹⁰. Die *HEK293T*-Zellen wurden am Vortag der Transfektion in 12-Loch-Kulturplatten (*12-Well-Culture plate*) und *DMEM*-Medium (1g Glucose/l, 10% FCS) ausgesät. Für die Transfektion wurden 1-2µg Plasmid-DNA pro *Well* transfiziert. Die Plasmid-DNA wurde hierbei in 1,5ml-*Tubes* vorgelegt.

Zusätzlich wurde ein β-Gal-Expressionsvektor (*lacZ*) und ein spezifisches Reporter-Luciferase-Konstrukt (*AP-1, NFκB, STAT-3*) in ein 50ml-*Tube* pipettiert. Unter der Sterilbank wurden 5ml CaCl-Lösung (0,25M) hinzugegeben.

Von der CaCl-Plasmid-Lösung wurden 120µl in jedes *Tube* pipettiert. Anschließend wurden die *Tubes* tröpfchenweise mit 120µl 2xHEBS-Puffer unter andauerndem Schütteln versetzt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionslösung wurde tröpfchenweise auf jeweils 3 *Wells* verteilt (je 75µl) und im Anschluss zurück in den Brutschrank gestellt. Nach 6-8 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel auf *DMEM*-Hungermedium (1g Glucose/l). Die Kultivierung der transfizierten *HEK293T* auf Hungermedium wurde für 12 Stunden durchgeführt.

3.3.4 Ernten und Lyse der transfizierten *HEK293T*-Zellen

Am Folgetag wurden die Zellen erneut im Bezug auf Dichte und Morphologie unter dem Mikroskop kontrolliert und die Platten anschließend auf Eis gestellt. Das Medium wurde vom Rand der *Wells* abgesaugt. Mithilfe von 1ml kaltem PBS (4°C) wurden die Zellen abgespült und in 1,5ml-*Tubes* auf Eis überführt. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert (6800g, 5min, 4°C) und der Überstand abgesaugt. Das *Pellet* wurde in 100µl K₂HPO₄-Lysispuffer resuspendiert und für 15min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (20817g, 5min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und in neue 1,5ml-*Tubes* überführt. Die Lysate wurden im Anschluss bei -80°C gelagert oder sofort für β-Galactosidase- und Luciferase-Assays verwendet.

3.3.5 β-Galactosidase-Assay

Die Messung der β-Galaktosidaseaktivität wurde als Transfektionskontrolle vor dem Luciferase-Assay durchgeführt. Hierfür wurde das Lysat mit β-Gal-Puffer versetzt, welcher O-Nitrophenyl-β-D-galactoside (ONPG) enthält. Bei erfolgreicher Transfektion wird das ONPG durch die β-Galactosidase zu Galactose und O-Nitrophenol umgesetzt, welches einen gelben Farbumschlag verursacht⁹¹. Von den Lysaten wurden jeweils 40µl auf eine 96-Loch-Platte aufgetragen. Als Bezugsgröße wurden 40µl des K₂HPO₄ – Lysispuffers pipettiert. Mithilfe einer Mehrkanalpipette wurden in jedes Well 40µl des β-Gal-Puffers hinzugefügt. Die Messung des Farbumschlags wurde mithilfe des DTX 880 Multimode Detector bei einer Wellenlänge von 420nm gemessen.

Das Luciferase Assay wurde nur dann durchgeführt, wenn alle Lysate des Versuches vergleichbare Ergebnisse der β-Galaktosidase-Aktivität zeigten.

3.3.6 Luciferase-Assay

Das Luciferase-Assay ist ein Reporter-Assay, welches auf der Messung von emittiertem Licht beruht. Das Enzym Luciferase oxidiert Luxiferine, wobei Energie in Form von Licht frei wird⁹². Anhand dieser erzeugten Chemilumineszenz kann die Aktivität des transfizierten Transkriptionsfaktorreporters (AP-1, NF κ B, STAT3) bestimmt werden. Für die Durchführung des Assays wurde das Luciferase Assay Reagent der Firma Promega Corporation und das Centro LB 960 Mikroplatten Luminometer der Firma Berthold Technologies verwendet. Jeweils 10 μ l der Lysate wurden in eine 96-Loch Platte pipettiert. Die Platte wurde in das Luminometer geladen und das Layout programmiert. Die Injektion von 50 μ l des Luciferase Reagenz erfolgte automatisiert durch das Gerät. Nach 0,1s Inkubationszeit erfolgte die Messung der Lumineszenz über 0,2s. Mithilfe der β -Galaktosidase-Aktivität wurden die Ergebnisse des Luciferase-Assay im Hinblick auf die jeweilige Transfektionseffizienz normalisiert.

4. Ergebnisse

4.1 *GLEPP1*-Defizienz führt zur Proteinurie und Niereninsuffizienz mit zunehmenden Alter

In Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *GLEPP1* *Knockout* (*KO*)-Mäuse mit zunehmendem Alter eine Albuminurie aufweisen. Für die Untersuchung des Mausurins wurden Coomassie-gefärbte Polyacrylamid-Gele angefertigt, in denen die enthaltenen Proteine elektrophoretisch aufgetrennt wurden (vorbeschrieben durch die Doktorarbeit von Laura Lennartz). In Abbildung 13 sind die Coomassiegele des Mausurins von Versuchstieren im Alter von 4 Monaten, 6 Monaten und 10 Monaten dargestellt. Als Vergleichsgröße wurde eine BSA-Konzentrationsreihe (*Bovine Serum Albumin*) verwendet. Zusätzlich wurde die Albumin-Creatinin-Ratio (ACR) der jeweiligen Altersgruppen ($n_{4Mo}=11WT/9KO$, $n_{6Mo}=5WT/9KO$, $n_{10Mo}=18WT/13KO$) verglichen.

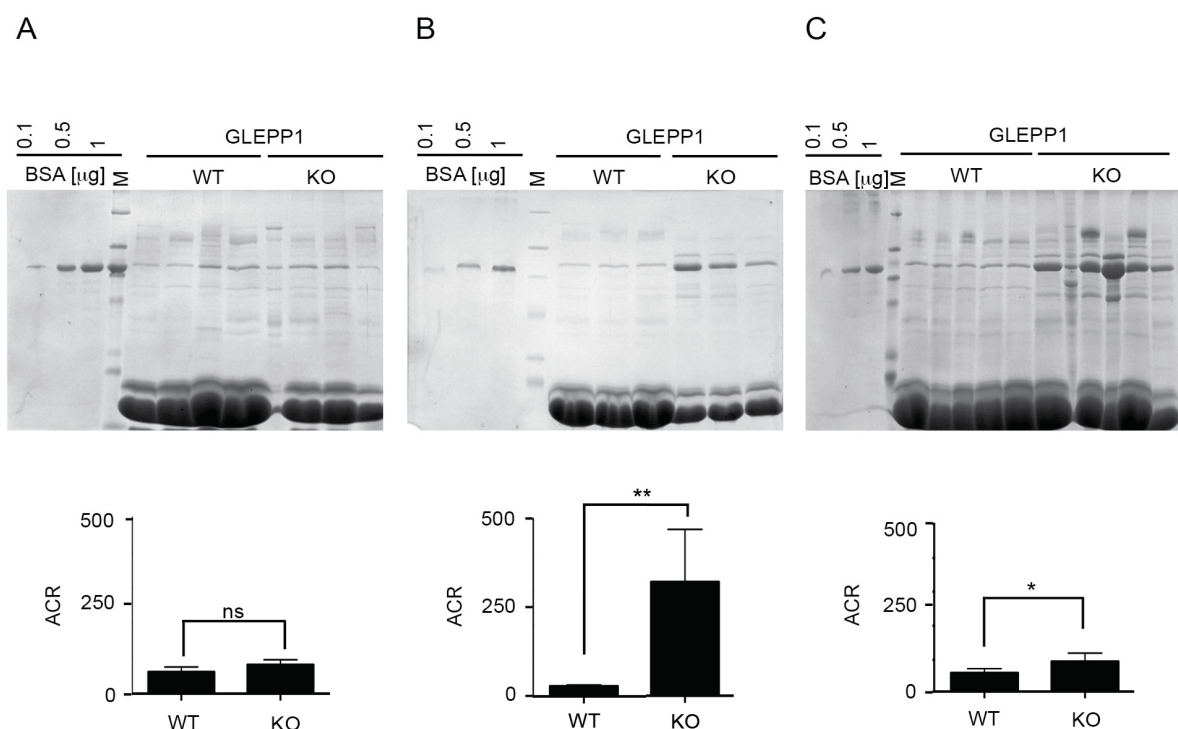


Abb. 13: Untersuchung des Mausurins auf Albuminurie im Coomassie-Gel und dazugehörige Albumin-Creatinin-Ratio (ACR)

Dargestellt sind coomassiegefärbte Polyacrylamidgele zur elektrophoretischen Auftrennung von im Urin enthaltenen Proteinen, welche aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe stammen (Daten erhoben von Laura Lennartz). Verglichen wurde der Urin von *GLEPP1* WT- und *KO*-Mäusen im Alter von 4 Monaten (A), 6 Monaten (B) und 10 Monaten (C). Darunter sind die dazugehörigen Albumin-Creatinin-Ratios (ACR) abgebildet ($n_{4Mo}=11WT/9KO$, $n_{6Mo}=5WT/9KO$, $n_{10Mo}=18WT/13KO$, ns: nicht signifikant, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$). Im Alter von 4 Monaten sind keine Unterschiede zwischen WT und *KO* in der Albuminurie zu erkennen. Das Coomassie-Gel zeigt im Alter von 6 und 10 Monaten mehr Albumin im Urin der *GLEPP1*-defizienten Tiere. Auch die ACR zeigt eine signifikant höhere Albuminurie der *KO*-Mäuse. ACR: Albumin-Creatinin-Ratio, BSA: Bovines Serumalbumin, *GLEPP1*: *Glomerular Epithelial Protein 1*, *KO*: *Knockout*, μ l: Mikroliter, WT: Wildtyp

Im Alter von 4 Monaten konnte zwischen den *GLEPPI* Wildtyp (WT)- und *KO*-Mäusen im Coomassiegel kein Unterschied hinsichtlich der Albuminurie dargestellt werden (siehe Abbildung 13, A). Auch die ACR zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen WT- und *KO*-Mäusen. Der Vergleich der Versuchskohorte im Alter von 6 Monaten zeigte mehr Albumin im Urin der *KO*-Tiere (siehe Abbildung 13, B). Auch die dazugehörige ACR zeigte eine signifikant höhere Albuminurie der *GLEPPI*-defizienten-Mäuse ($p \leq 0,01$) im Vergleich zum WT. Im Alter von 10 Monaten wurde im Coomassiegel mehr Albumin im Urin der *KO*-Mäuse beobachtet (siehe Abbildung 13, C). Ebenfalls war die ACR der *GLEPPI*-defizienten Versuchstiere signifikant erhöht gegenüber dem Wildtyp ($p \leq 0,05$).

Die Nierenfunktion der Versuchstiere wurde mithilfe der Cystatin C (CysC)-Konzentration im Plasma der Versuchstiere bestimmt. CysC ist ein repräsentativer Marker im Plasma für die Nierenfunktion und ist sensitiver als das Creatinin⁹³. Eine Verringerung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) führt zu einem Anstieg der Plasmakonzentration von CysC⁹⁴. Verglichen wurden Versuchstiere im Alter von 4 Monaten ($n_{4Mo}=11$ WT/9 *KO*), 6 Monaten ($n_{6Mo}=9$ WT/10 *KO*) und 10 Monaten ($n_{10Mo}=19$ WT/20 *KO*) (siehe Abbildung 14).

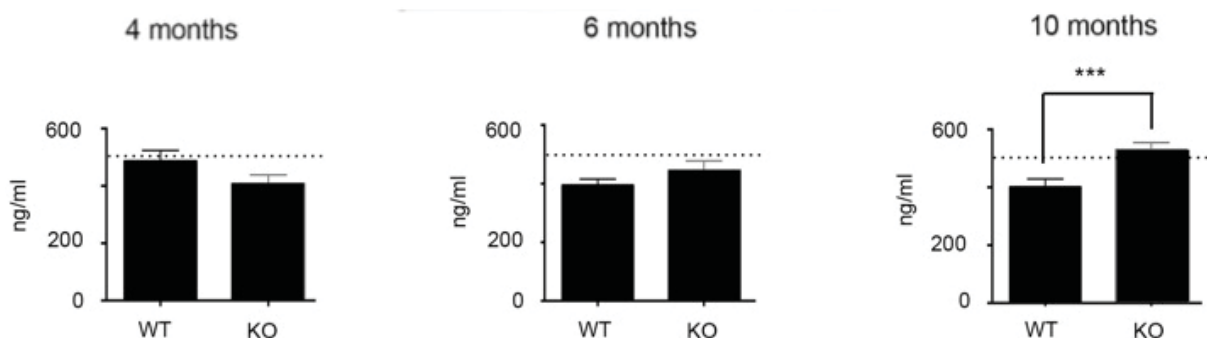


Abb. 14: Untersuchung des Cystatin C (CysC) Gehaltes in heparinisiertem Mausplasma
 Dargestellt ist die Konzentration von CysC in heparinisiertem Mausplasma gemessen mithilfe eines quantitativen *Sandwich-ELISA-Immunoassays*. Verglichen wurde Mausplasma von *GLEPPI*-defizienten Versuchstieren im Vergleich zum Wildtyp in einem Alter von 4 Monaten ($n_{4Mo}=11$ WT/9 *KO*), 6 Monaten ($n_{6Mo}=9$ WT/10 *KO*) und 10 Monaten ($n_{10Mo}=19$ WT/20 *KO*). Die gestrichelte Linie veranschaulicht den Normwert der CysC-Konzentration nach Angaben des Herstellers (500 ng/ml). Im Alter von 4 und 6 Monaten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den WT- und *KO*-Kohorten beobachtet werden. Im Alter von 10 Monaten zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Plasma-CysC in der *KO*-Kohorte im Vergleich zu WT (***: $p \leq 0,001$). Die Konzentration liegt oberhalb des Referenzwertes und zeigt eine beginnende Niereninsuffizienz der *KO*-Tiere. *KO*: Knockout, ml: Milliliter, ng: Nanogramm, WT: Wildtyp

Im Plasma der 4 und 6-Monats-Kohorten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT- und *KO*-Mäusen. Erst im Alter von 10 Monaten konnte eine signifikant höhere CysC-Konzentration im Plasma der *KO*-Tiere beobachtet werden (***: $p \leq 0,001$). Die gemessene Konzentration überschreitet den Grenzwert einer normalen CysC-Konzentration von 500 ng/ml (nach Herstellerangaben), sodass eine beginnende Niereninsuffizienz der *GLEPPI*-defizienten Mäuse im Alter von 10 Monaten gezeigt werden konnte.

4.2 **GLEPPI-Defizienz führt zur Bildung von lokalisierten Verdickungen der glomerulären Basalmembran (GBM) und podozytären Fussfortsatzverlusten**

Im Anschluss an die Betrachtung von Albuminurie und Nierenfunktion der Versuchstiere wurde die Morphologie der Glomeruli von *GLEPPI* WT- und *KO*-Mäusen miteinander verglichen. Ziel der histologischen Untersuchungen war es, mögliche morphologische Unterschiede in den Glomeruli zwischen WT- und *KO*-Tieren darzustellen. Begonnen wurde mit der mikroskopischen Untersuchung PAS-gefärbter Nierenpräparate von Versuchstieren im Alter von 4, 6 und 10 Monaten. Weiterführend wurde die Ultrastruktur der Glomeruli im Alter von 6 Monaten mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) betrachtet. Mit Hilfe der *Single block-face scanning*-Elektronenmikroskopie (*SBSEM*) wurde die Ultrastruktur der GBM dreidimensional rekonstruiert und untersucht. Abschließend wurden Glomeruli mit einer Immunogold-Färbung gegen *GLEPPI* behandelt, um elektronenmikroskopisch das Protein im glomerulären Filtersystem zu lokalisieren.

4.2.1 Lichtmikroskopische Veränderungen in der PAS-Färbung

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Maus-Glomeruli wurden isolierte, subpodozytär-gelegene, lokalisierte Verdickungen (*Humps*) der glomerulären Basalmembran beobachtet. Mithilfe der Software ImageJ® wurden diese Verdickungen erfasst und als Anzahl der *Humps* pro Glomerulum ausgewertet. Als PAS-positiven *Humps* wurden diejenigen Verdickungen gewertet, die mindestens der doppelten Breite der GBM entsprachen. Verglichen wurden histologische Schnitte von *GLEPPI* WT- und *KO*-Mäusen im Alter von 4 ($n_{4Mo}=39WT/33KO$), 6 ($n_{6Mo}=13WT/4KO$) und 10 Monaten ($n_{10Mo}=18WT/15KO$). Die Daten wurden gemeinsam mit Frau Laura Lennartz gewonnen. Die histologische Aufbereitung und Fotografie wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Wiech (UK Hamburg-Eppendorf) durchgeführt (siehe Abbildung 15).

Im Alter von 4 Monaten konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an GBM-*Humps* pro Glomerulum zwischen *GLEPPI* WT- und *KO*-Mäusen beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt waren nur in einigen Glomeruli vereinzelt *Humps* vorhanden. Auch nach 6 Monaten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der *Humps* pro Glomerulum zwischen *GLEPPI* WT- und *KO*-Mäusen. Erst im Alter von 10 Monaten konnten signifikant mehr *Humps* pro Glomerulum (*: $p\leq 0,05$) in den *KO*-Tieren beobachtet werden.

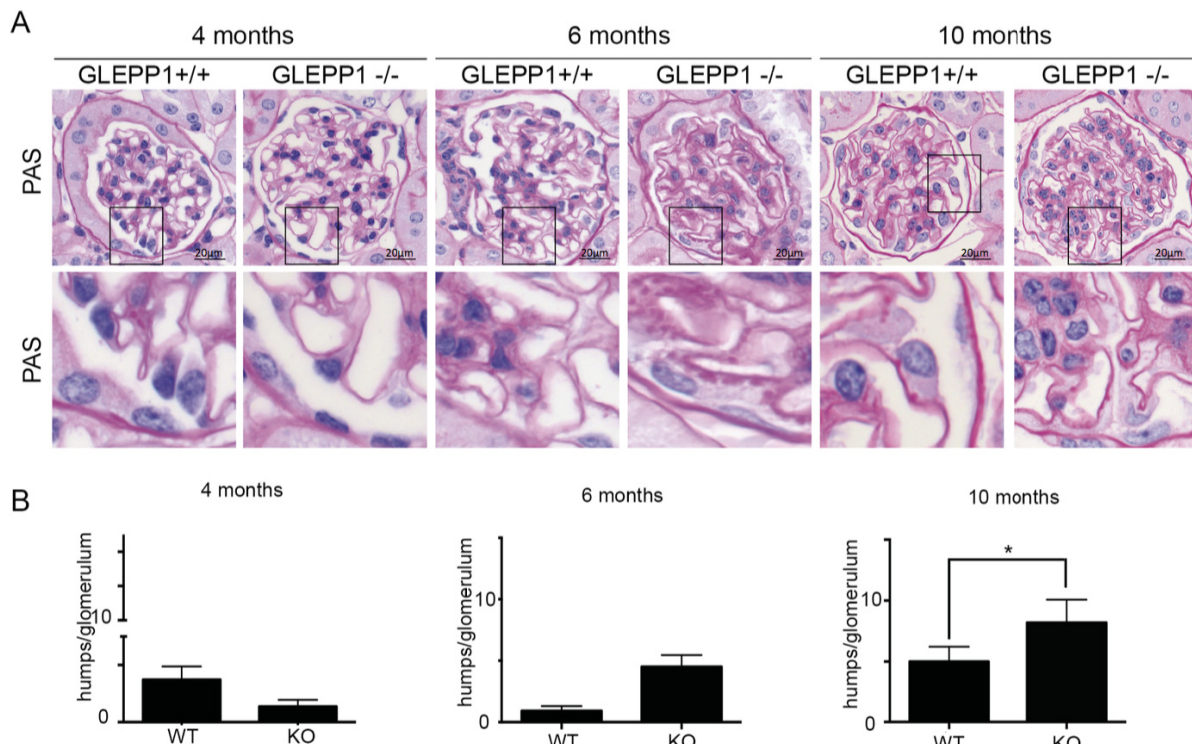


Abb. 15: Auswertung der PAS-gefärbten subpodozytären Veränderungen der GBM in Maus-Glomeruli

Die PAS-Färbungen und die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Wiech (UK Hamburg-Eppendorf) durchgeführt. Die Daten wurden gemeinsam mit Frau Laura Lennartz gewonnen. (A) Dargestellt sind Glomeruli aus PAS-gefärbten Nierenschnitten von *GLEPP1* WT (hier *GLEPP1*+/+) - und KO (hier *GLEPP1*-/-) -Mäusen zum Zeitpunkt von 4 ($n_{4Mo}=39WT/33KO$), 6 ($n_{6Mo}=13WT/4KO$) und 10 Monaten ($n_{10Mo}=18WT/15KO$). Im Alter von 6 und 10 Monaten zeigen sich isolierte, subpodozytär gelegene, PAS-positive Verdickungen der GBM (*Humps*). (B) Im Alter von 4 und 6 Monaten konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an *Humps* pro Glomerulum zwischen WT und KO festgestellt werden. Im Alter von 10 Monaten zeigen sich signifikant mehr *Humps* pro Glomerulum in den *GLEPP1* KO. Darüber hinaus konnte eine Zunahme der durchschnittlichen Anzahl an GBM-*Humps* pro Glomerulum von 4 über 6 bis zu 10 Monaten beobachtet werden. (ns: nicht signifikant, *: $p \leq 0,05$) GBM: Glomeruläre Basalmembran, *GLEPP1*: Glomerular Epithelial Protein 1, KO: Knockout, WT: Wildtyp

Weiterhin zeigte sich im Verlauf der Alterskohorten, dass die durchschnittliche Anzahl an *Humps* pro Glomerulum mit fortschreitendem Alter zunahm. Durch den KO von *GLEPP1* wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr *Humps* auf der GBM identifiziert.

4.2.2 Elektronenmikroskopie

Die ultrastrukturelle Untersuchung der Glomeruli, insbesondere der GBM, wurde mithilfe von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchgeführt. Hierfür wurden Aufnahmen von *GLEPP1* WT- und KO-Glomeruli im Alter von 6 Monaten angefertigt. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Wiech (Nephropathologie, UK Hamburg-Eppendorf) angefertigt und sind Abbildung 16 zu entnehmen. Die Übersichtsaufnahme der WT-Glomeruli (siehe Abbildung 16, A) zeigte keine morphologischen Auffälligkeiten.

In der Vergrößerung (siehe Abbildung 16, B) konnte eine dünne und konstant-dicke GBM mit kapillarseitig anliegendem Gefäßendothel beobachtet werden.

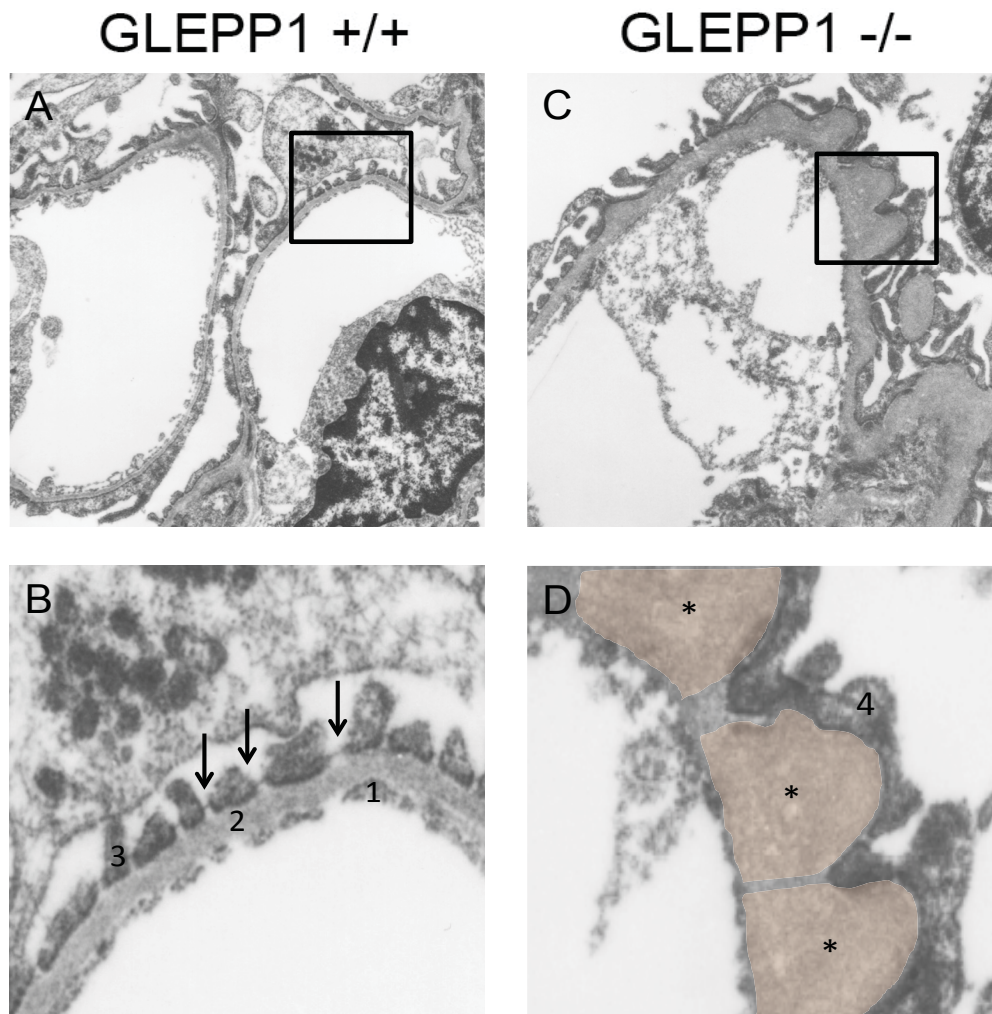


Abb. 16: Darstellung von ultrastrukturellen Veränderungen des glomerulären Filters in *GLEPP1* Wildtyp (WT)- und *Knockout* (KO)-Mäusen mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)
Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Wiech (UK Hamburg-Eppendorf) durchgeführt. Vergleich zwischen TEM-Aufnahmen von Maus-Glomeruli *GLEPP1* WT (hier *GLEPP1* +/+, siehe A,B) und KO (hier *GLEPP1* -/-, siehe C,D) im Alter von 6 Monaten. Abbildung A und B zeigen Anschnitte des glomerulären Filters der untersuchten Wildtypen. Die GBM (2) ist dünn und konstant-dick mit anliegendem Kapillarendothel (1) und podozytären Fussfortsätzen (3). Zwischen den Fussfortsätzen ist die glomeruläre Schlitzmembran (→) zu erkennen. Abbildung C und D zeigen Aufnahmen der *GLEPP1* KO-Mäuse. Erkennbar sind isolierte Verdickungen der GBM (*) und abschnittsweise eine konfluierende und verbreiterte Beschaffenheit der podozytären Fortsätze (4). GBM: Glomeruläre Basalmembran, *GLEPP1*: Glomerular Epithelial Protein 1, KO: Knockout, WT: Wildtyp

An der viszeralen Seite des glomerulären Filters konnten die isolierten Podozytenfortsätze dargestellt werden, zwischen denen sich die glomeruläre Schlitzmembran aufspannte. Sowohl in Übersichtsaufnahme der *GLEPP1* KO-Glomeruli (siehe Abbildung 16, C), als auch in der Vergrößerung (siehe Abbildung 16, D) konnte eine unregelmäßig verdickte GBM beobachtet werden, welche sich durch isolierte Verdickungen der GBM (*Humps*) auszeichnete. Darüber hinaus zeigten sich auffällige Veränderungen in der Beschaffenheit der podozytären Fussfortsätze.

Im Vergleich zu den fingerförmigen Anschnitten der podozytären Fussfortsätzen im WT (siehe Abbildung 16, A und B) zeigten die Fortsätze im *GLEPPI KO* abschnittsweise eine konfluierende und verdickte Beschaffenheit und umfassten die viszerale Seite der GBM. Eine Abgrenzung der Schlitzmembran war in diesen Abschnitten nicht mehr möglich. Diese morphologischen Veränderungen ließen sich am ehesten als ein beginnendes *Foot Process Effacement* beschreiben. Interessanterweise korrelierten die Auffälligkeiten der podozytären Fussfortsätze in einigen Fällen mit den *Humps* der GBM. Neben diesen Arealen lokalisiert-verdickter GBM und veränderter podozytärer Fussfortsätze fanden sich auch unauffällige Abschnitte in der Untersuchung der Glomeruli von *GLEPPI KO*-Mäusen.

4.2.3 *Single block-face scanning*-Elektronenmikroskopie

In Kooperation mit Frau Prof. Dr. Rachel Lennon (*University of Manchester*) wurden Aufnahmen mittels *Single block-face scanning*-Elektronenmikroskopie (*SBSEM*) des glomerulären Filters von *GLEPPI* WT- und *KO*- Mäusen angefertigt und zu 3D-Darstellungen rekonstruiert. Die Ergebnisse der Kooperation bezüglich *GLEPPI* sind in Abbildung 17 zusammengefasst (nach Randles et al., 2016⁹⁵).

Die 3D-Rekonstruktion der *SBSEM*-Aufnahmen des glomerulären Filters zeigte im *GLEPPI KO* abgeflachte und verbreiterte Fussfortsätze im Vergleich zum Wildtyp. Darüber hinaus zeigten auch die *SBSEM*-Aufnahmen die isolierten Verdickungen der GBM (*Humps*), welche bereits in den PAS-Färbungen und der TEM beobachtet wurden. In einigen 3D-Rekonstruktionen dieser irregulär-konfigurierten GBM-Abschnitte konnte in enger Lagebeziehung zu den *Humps* ein podozytäres *Foot Process Effacement* beobachtet werden. Darüber hinaus zeigten viele Abschnitte des glomerulären Filters in der 3D-Rekonstruktion ein komplettes *Foot Process Effacement*. Die statistische Auswertung der Anzahl an podozytären Fussfortsätzen pro μm GBM im Vergleich von WT zu *GLEPPI KO* konnte zeigen, dass die Anzahl der podozytären Fussfortsätze des *KO* gegenüber dem WT signifikant reduziert war. Bei der Analyse der GBM-Dicke in nm zwischen *GLEPPI KO* und WT konnte beobachtet werden, dass die durchschnittliche Dicke der GBM signifikant höher war, als im WT. Interessanterweise konnten in einigen 3D-Rekonstruktionen des glomerulären Filters im *GLEPPI KO* beobachtet werden, dass einige podozytäre Ausläufer in die glomeruläre Basalmembran einzuwachsen scheinen. Eine Analyse von Auftreten dieser Invasionen im *GLEPPI KO* und angrenzender Dicke der GBM zeigte, dass die GBM-Dicke in Bereichen dieser Invasionen signifikant höher war, als in Bereichen ohne Invasionen.

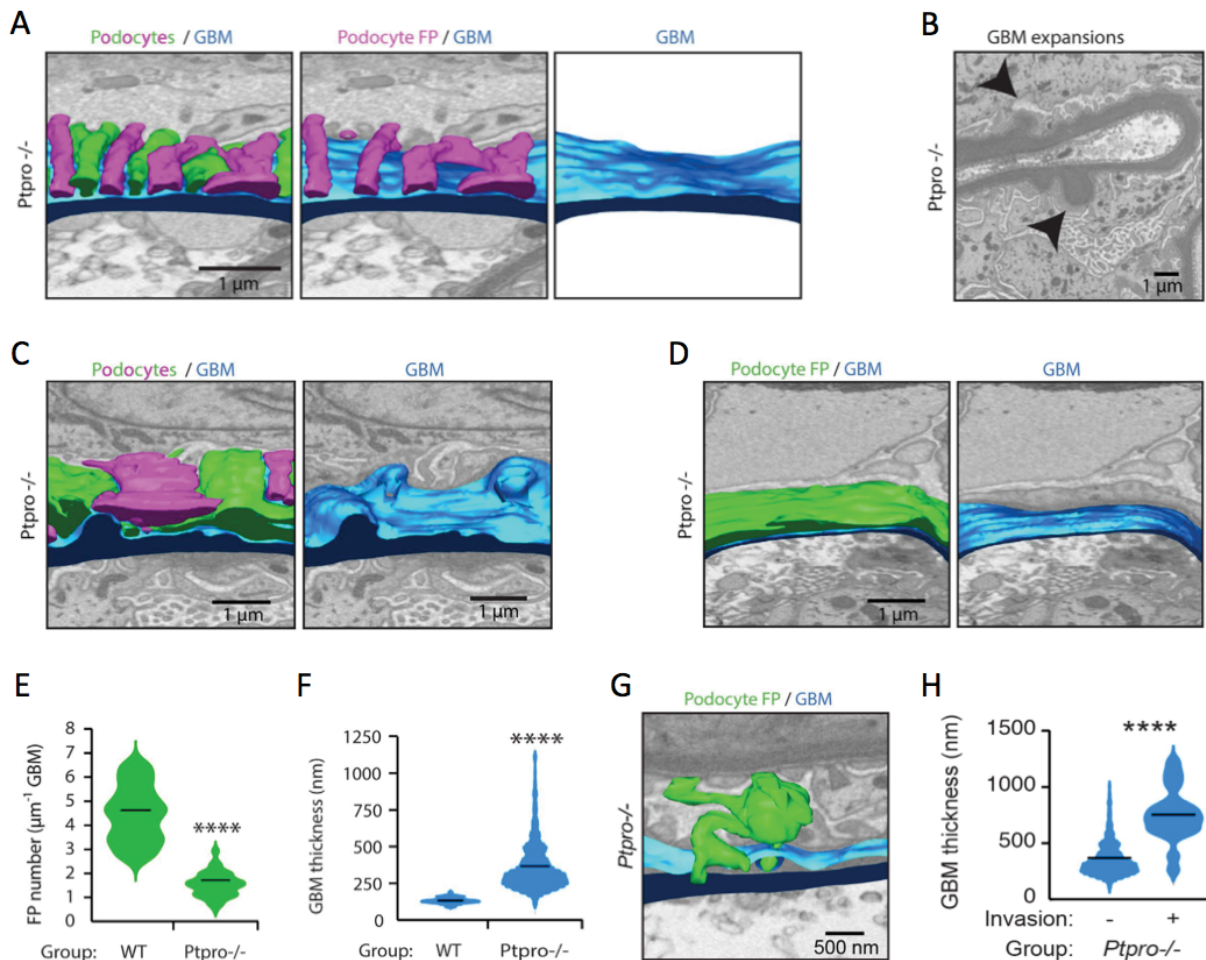


Abb. 17: Dreidimensionale Analyse der glomerulären Strukturen von *GLEPP1* Knockout (KO)-Mäusen (modifiziert nach Randles et al., 2016⁹⁵)

Die vorliegenden Daten wurden in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Rachel Lennon (University of Manchester) gewonnen und freundlicherweise bereitgestellt. A) Transversaler Schnitt des rekonstruierten glomerulären Filters (grün/magenta: podozytäre Fussfortsätze, blau: GBM) zeigt abgeflachte und verbreiterte podozytäre Fussfortsätze im *GLEPP1* KO. (B) In den Aufnahme der *Serial block-face scanning*-Elektronenmikroskopie (SBSEM) sind deutliche Verdickungen der GBM im *GLEPP1* KO zu beobachten. (C) Vereinzelt überschneiden sich Abschnitte des glomerulären Filters mit podozytären *Foot Process Effacement* mit verdickten und irregulär-konfigurierten Bereichen der GBM. (D) Darüber hinaus wurden Abschnitte kompletten Effacement der podozytären Fussfortsätze beobachtet. (E) Dargestellt ist die Quantifizierung von podozytären Fussfortsätzen pro μm^2 GBM im Vergleich von *GLEPP1* KO zum Wildtyp (WT) anhand eines Violinen-Diagramms. Dieses beschreibt die Verteilung der Anzahl an podozytären Fussfortsätzen pro Länge GBM, der schwarze Balken markiert den Mittelwert der Anzahl an podozytären Fussfortsätzen pro Gruppe. Im *GLEPP1* KO konnte eine signifikant erniedrigte Anzahl an podozytären Fussfortsätzen pro μm^2 GBM beobachtet werden. (F) Dargestellt ist die Quantifizierung der Dicke der GBM in nm im Vergleich von *GLEPP1* KO zum WT anhand eines Violinen-Diagramms. Dieses beschreibt die Verteilung der GBM-Dicke, der schwarze Balken markiert den Mittelwert der GBM-Dicke pro Gruppe. Im *GLEPP1* KO konnte eine signifikant erhöhte Dicke der GBM beobachtet werden. (G) Rekonstruierte Aufnahme des glomerulären Filters zeigt die Invasion eines podozytären Ausläufers (grün) in die GBM (blau). (H) Dargestellt ist die Quantifizierung der Dicke der GBM in nm des *GLEPP1* KO im Vergleich von Bereichen mit (+) und ohne (-) podozytäre Invasionen in die GBM anhand eines Violinen-Diagramms. Dieses beschreibt die Verteilung der GBM-Dicke, der schwarze Balken markiert den Mittelwert der pro Gruppe. Die Bereiche im *GLEPP1* KO, in denen podozytäre Invasionen beobachtet wurden, zeigten im Vergleich zu den Bereichen ohne Invasionen eine signifikante Zunahme der GBM-Dicke. (****: $p < 0,0001$) *FP*: Foot processes, GBM: Glomeruläre Basalmembran, *GLEPP1*: Glomerular Epithelial Protein 1, *Ptpro*^{-/-}: *GLEPP1*-Knockout, nm: Nanometer, μm : Mikrometer, WT: Wildtyp

4.2.4 Immunogold-Färbung von Nierenpräparaten zur Lokalisation von *GLEPP1* im glomerulären Filtersystem

Mithilfe einer Immunogoldfärbung sollte die *GLEPP1*-Expression im Podozyten von Ratten dargestellt werden. In Abbildung 18 sind die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt, die freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Donscho Kerjaschki (Medizinische Universität Wien) angefertigt wurden. Dargestellt sind Teilbereiche des glomerulären Filtersystems. In einer Übersichtsaufnahme (siehe Abbildung 18, A) der podozytären Fussfortsätze konnten elektronendichte Partikel (schwarze Punkte) ausgemacht werden, welche dem *GLEPP1* in der Membran der podozytären Fortsätze entsprachen. Auch in den Längsschnitten durch den glomerulären Filter (siehe Abbildung 18, B und C) ließen sich elektronendichte Partikel ausmachen, welche entlang der Membran der Podozytenfortsätze verteilt waren. Diese Partikel, dem angefärbten *GLEPP1* entsprechend, waren nicht nur in den apikalen Bereichen der Podozytenfortsätze lokalisiert, sondern wurden auch in basalen Abschnitten mit räumlicher Nähe zur GBM beobachtet.

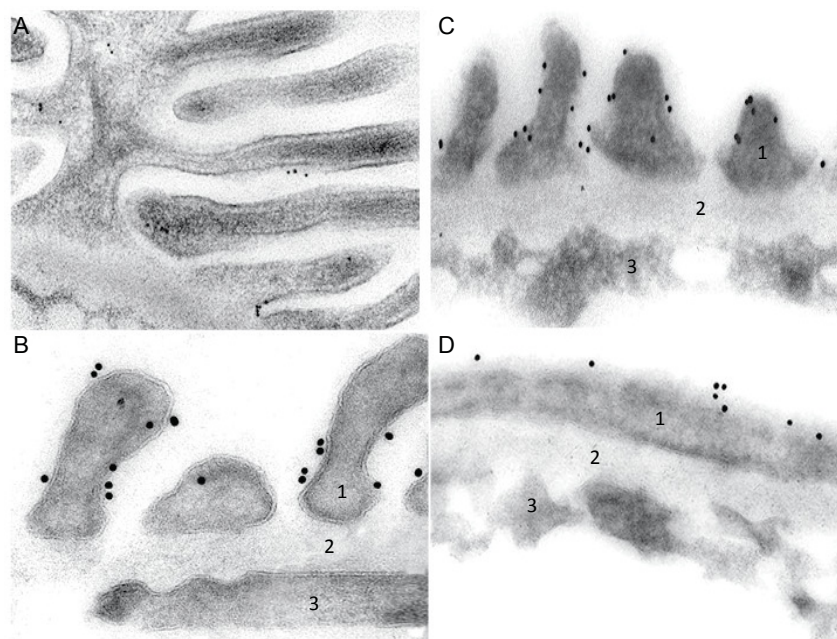


Abb. 18: Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Darstellung der Lokalisation von *GLEPP1* im glomerulären Filter in Immunogold-gefärbten Nierenschnitten

Dargestellt sind TEM-Aufnahmen Immunogold-gefärbter Nierenpräparate der Versuchstiere, die in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Donscho Kerjaschki (Medizinische Universität Wien) entstanden sind. Die Aufnahmen A-D zeigen Ausschnitte des glomerulären Filtersystems mit schwarz-erscheinenden Partikeln, welche dem angefärbten *GLEPP1* entsprechen. (A) Übersichtsaufnahme der podozytären Fortsätze mit einigen verteilten schwarz-erscheinenden Partikeln. (B-D) Längsschnitte durch den glomerulären Filter mit deutlicher Dreischichtung (1: Podozytenfortsätze, 2: GBM, 3: Endothel). In den Bildern zeigt sich eine Vielzahl schwarz-erscheinender Partikel entlang der Membran der podozytären Fortsätze. Diese sind nicht nur an apikalen, sondern auch in den basalen Abschnitten der Podozytenfortsätze lokalisiert (Bild B-C, →) und könnten somit eine räumliche Beziehung zur GBM aufweisen. Bild D zeigt den glomerulären Filter von Ratten mit PAN-Nephrose. Die Fussfortsätze sind aufgrund des ausgeprägten *Foot Process Effacement* nicht mehr abgrenzbar. Die Expression von *GLEPP1* zeigt sich deutlich verringert. *GLEPP1*: Glomerular Epithelial Protein 1, PAN-Nephrose: Puromycin-Aminonukleosid-Nephrose

Anhand dieser transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen lässt sich vermuten, dass *GLEPPI* auch in jenen Bereichen der podozytären Fussfortsätze expremiert wird, welche nahe der GBM liegen. Bild D zeigt einen Längsschnitt durch den glomerulären Filter von Ratten mit Puromycinaminonucleosid (PAN)-Nephrose. Im Sinne eines *Foot Process Effacement* waren die podozytären Fussfortsätze nicht mehr klar darstellbar. Darüber hinaus zeigten sich im Vergleich zu gesunden Ratten (Bild B-C) nur wenige elektronendichte Partikel, was einer verringerten *GLEPPI*-Expression entspricht.

4.3 Modulation der Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran durch *GLEPPI*

Nach Beschreibung des histologischen Erscheinungsbildes der glomerulären Veränderungen und der Darstellung der elektronenmikroskopischen Unterschiede ihrer GBM, wurde die Zusammensetzung der GBM im Bezug auf ihre Komponenten untersucht. Ziele dieser Versuche waren die Darstellung der unterschiedlichen Proteinexpressionsmuster im Vergleich zwischen *GLEPPI* WT- und *KO*-Mäusen auf RNA-Ebene. Weiterhin sollte die Zusammensetzung der Proteine der GBM im Bezug auf Kollagen Typ IV und Laminin untersucht werden. Anschließend sollte eine Immunfluoreszenz von Glomeruli durchgeführt werden, um Unterschiede der Proteinexpressionsmuster zwischen *GLEPPI* WT- und *KO*-Mäusen zu lokalisieren und zu visualisieren.

4.3.1 Vergleich des Expressionsmusters von Kollagen Typ IV und Laminin auf Ebene der RNA durch *Real-Time-PCR* im Alter von 6 Monaten

In Abbildung 19 sind die *Real-Time-PCR* Ergebnisse für Kollagen Typ IV- und Laminin-Ketten von glomerulärer cDNA aus perfundierten und isolierten Maus-Glomeruli im Vergleich zwischen *GLEPPI* WT- und *KO*-Mäusen im Alter von 4, 6 und 10 Monaten dargestellt. Untersucht wurde die Expression von strukturellen Komponenten der GBM. Hierbei wurden die unreifen Ketten Kollagen Typ IV $\alpha 1/\alpha 2$ und Laminin $\alpha 1/\beta 1$ von den reifen Ketten Kollagen Typ IV $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ und Laminin $\alpha 5/\beta 2$ unterschieden. Die Daten im Alter von 4 und 10 wurden in Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Laura Lennartz vorbeschrieben.

Im Alter von 4 Monaten konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der unreifen Ketten von Kollagen Typ IV $\alpha 1/\alpha 2$ und den reifen Ketten Kollagen Typ IV $\alpha 3/\alpha 5$ zwischen *GLEPPI* WT und *KO* beobachtet werden. Lediglich das reife Kollagen Typ IV $\alpha 4$ zeigte sich im *GLEPPI KO* signifikant vermindert ($p \leq 0,05$).

Die Expression der unreifen Kollagen Typ IV $\alpha 1$ Kette im Alter von 6 Monaten stellte sich im Vergleich von *GLEPPI* WT zu *KO* signifikant vermindert ($p \leq 0,01$) dar. Im Bezug auf Kollagen Typ IV $\alpha 2$ konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Bei der Untersuchung der reifen Ketten von Kollagen Typ IV konnte eine signifikante Verminderung aller untersuchten Ketten in den *GLEPPI KO*-Mäusen beobachtet werden ($\alpha 3/\alpha 4$ $p \leq 0,05$; $\alpha 5$ $p \leq 0,01$). Zum Zeitpunkt von 10 Monaten wurde eine signifikant erhöhte Expression ($\alpha 1/\alpha 2$ $p \leq 0,05$) der unreifen Kollagen Typ IV Ketten im *GLEPPI KO* beobachtet. Im Vergleich der reifen Kollagen Typ IV-Ketten zwischen *GLEPPI* WT und *KO* Mäusen wurde eine signifikant verminderte Expression von $\alpha 3$ ($p \leq 0,01$) gezeigt. Bei der Untersuchung von Kollagen Typ IV $\alpha 4/\alpha 5$ konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Ergebnisse der Expression von unreifen ($\alpha 1/\beta 1$) und reifen ($\alpha 5/\beta 2$) Laminin-Ketten zeigten ähnliche Verteilungsmuster wie bei der Untersuchung von Kollagen Typ IV. Im Alter von 4 Monaten konnte eine signifikant verminderte Expression der unreifen Kette Laminin $\alpha 1$ ($p \leq 0,01$) und der reifen Ketten Laminin $\alpha 5/\beta 2$ ($p \leq 0,05$) beobachtet werden. Auch im Alter von 6 Monaten war die Expression der reifen Ketten Laminin $\alpha 5/\beta 2$ und der unreifen Kette Laminin $\beta 1$ signifikant herunterreguliert ($\alpha 5$ $p \leq 0,01$; $\beta 2$ $p \leq 0,05$; $\beta 1$ $p \leq 0,01$). Für die unreife Kette Laminin $\alpha 1$ konnte im Alter von 6 Monaten kein signifikanter Unterschied zwischen *GLEPPI* WT und *KO* gezeigt werden. Die Untersuchung der unreifen Laminin-Ketten im Alter von 10 Monaten zeigte eine signifikant erhöhte Expression von Laminin $\alpha 1$ im *GLEPPI KO* ($p \leq 0,01$). Laminin $\beta 1$ war zu diesem Zeitpunkt signifikant vermindert exprimiert ($p \leq 0,01$). Die reifen Laminin-Ketten zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend konnte in der Untersuchung der glomerulären cDNA mittels *Real-Time-PCR* beobachtet werden, dass mit zunehmendem Alter im *GLEPPI KO* relativ mehr unreife Kollagen Typ IV- und Lamininketten exprimiert werden als im WT. Die reifen Heterotrimere von Kollagen Typ IV und Laminin wurden entweder vermindert im *GLEPPI KO* exprimiert (6-Monats-Kohorte), oder zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen *GLEPPI* WT und *KO* (10-Monats-Kohorte).

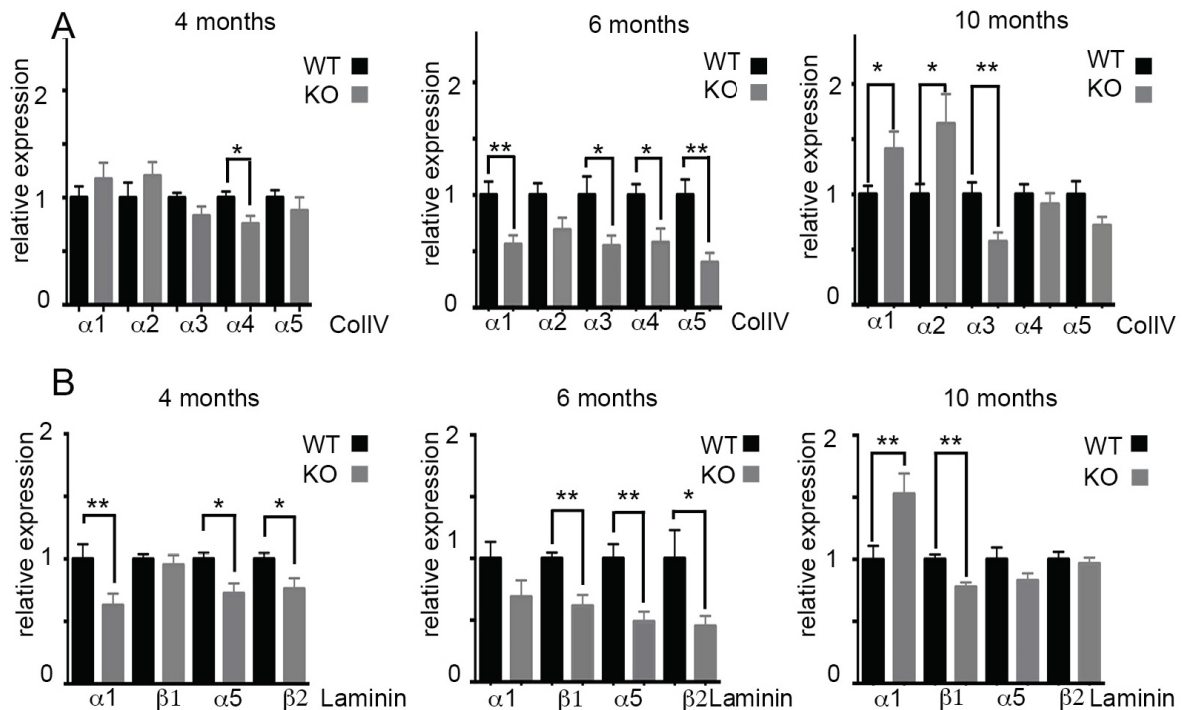


Abb. 19: Darstellung der Real-Time-PCR Ergebnisse aus glomerulärer cDNA für Kollagen Typ IV- und Laminin-Ketten

Dargestellt sind die relativen Expressionen von Kollagen Typ IV (Col IV) - und Laminin-Heterotrimeren. RNA wurde aus *GLEPP1* WT- und KO-Glomeruli isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels *Real-Time-PCR* untersucht und ausgewertet. (A) Die relative Expression der Kollagen Typ IV-Ketten unterscheidet sich im Alter von 4 Monaten zwischen *GLEPP1* WT (schwarz) und KO (grau) nur in einer signifikant verminderten Expression von Kollagen Typ IV $\alpha 4$. Die restlichen Kollagen Typ IV-Ketten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ zeigten keine signifikanten Unterschiede. Im Alter von 6 Monaten konnte eine signifikant verminderte Expression der reifen Kollagen Typ IV-Ketten $\alpha 3$ - 5 und der unreifen Kette Kollagen Typ IV $\alpha 1$ beobachtet werden. Kollagen Typ IV $\alpha 2$ zeigte keine signifikanten Unterschiede. Zum Zeitpunkt von 10 Monaten konnte eine signifikant vermehrte Expression der unreifen Kollagen Typ IV-Ketten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ im KO gezeigt werden, wohingegen eine signifikant verminderte Expression der reifen Kette Kollagen Typ IV $\alpha 3$ festgestellt werden konnte. Kollagen Typ IV $\alpha 4$ und $\alpha 5$ unterschieden sich nicht signifikant zwischen *GLEPP1* WT und KO. (B) Die relative Expression von unreifen und reifen Laminin-Ketten zeigt im Alter von 4 Monaten eine signifikant geringere Expression der reifen Ketten Laminin $\alpha 5$ und $\beta 2$ und der unreifen Kette Laminin $\alpha 1$ im *GLEPP1* KO. Auch im Alter von 6 Monaten wurde eine signifikant verminderte Expression der reifen Ketten Laminin $\alpha 5$ und $\beta 2$ und der unreifen Kette Laminin $\beta 1$ im *GLEPP1* KO beobachtet. Die Expression von Laminin $\alpha 1$ zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen. In der Untersuchung der 10-Monats-Kohorte konnte eine signifikant erhöhte Expression der unreifen Ketten Laminin $\alpha 1$ im *GLEPP1* KO festgestellt werden. Zwischen den reifen Ketten Laminin $\alpha 5$ und $\beta 2$ wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet. (ns: nicht signifikant, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$) Col IV: Kollagen Typ IV, *GLEPP1*: Glomerular Epithelial Protein 1, KO: Knockout, WT: Wildtyp

4.3.2 Unterschiede in der Zusammensetzung von Kollagen Typ IV und Laminin zwischen *GLEPPI* Wildtyp und *Knockout* im Westernblot im Alter von 10 Monaten

Für die Untersuchung der Zusammensetzung der GBM wurden Proteine aus isolierten Glomeruli von 10 Monate alten *GLEPPI* WT- und *KO*-Mäusen isoliert. Die Darstellung der enthaltenen Proteine erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Westernblot. Die Auswertung erfolgte densitometrisch als Quotient der Daten von *GLEPPI KO*-Mäuse zu dem Mittelwert der WT-Mäuse.

In den für Kollagen Typ IV angefertigten Blots (siehe Abbildung 20, A bis D) wurden spezifische Dimere (46-58 kDa) und Monomere (30 kDa) der Kollagen Typ IV-Ketten durch die verwendeten Antikörper gefärbt. Die Auswertung erfolgte über densitometrische Dichtemessung der Monomer-Banden. Als Ladungskontrolle diente Agrin, ein weiteres Strukturprotein der GBM. Die Auswertung der Westernblots zeigte, dass in *GLEPPI KO*-Mäusen signifikant mehr unreifes Kollagen Typ IV $\alpha 1$ exprimiert wird, als im WT ($p \leq 0,01$; $n=9$). Bezüglich der unreifen Kette Kollagen Typ IV $\alpha 2$ konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen *GLEPPI* WT und *KO* beobachtet werden (B). Auch für die reifen Kollagen Typ IV-Ketten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ konnte im Westernblot kein signifikanter Unterschied zwischen *GLEPPI* WT und *KO* dargestellt werden.

Die densitometrischen Werte für Laminin (siehe Abbildung 20, E) wurden auf das GBM-Strukturprotein Nidogen normalisiert. Im Bezug auf die unreife Kette Laminin $\alpha 1$ zeigte sich in der Untersuchung *GLEPPI KO*-Mäuse eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zu WT ($p \leq 0,05$; $n=9$).

Zusammenfassend bestätigten die Versuche im Westernblot die Ergebnisse aus der *Real-Time-PCR* insofern, als das *GLEPPI KO*-Mäuse im Alter von 10 Monaten signifikant mehr unreifes Kollagen Typ IV $\alpha 1$ und Laminin $\alpha 1$ exprimieren als im Vergleich zum *GLEPPI* WT. Bei der Betrachtung der reifen Kollagen Typ IV Ketten konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression festgestellt werden.

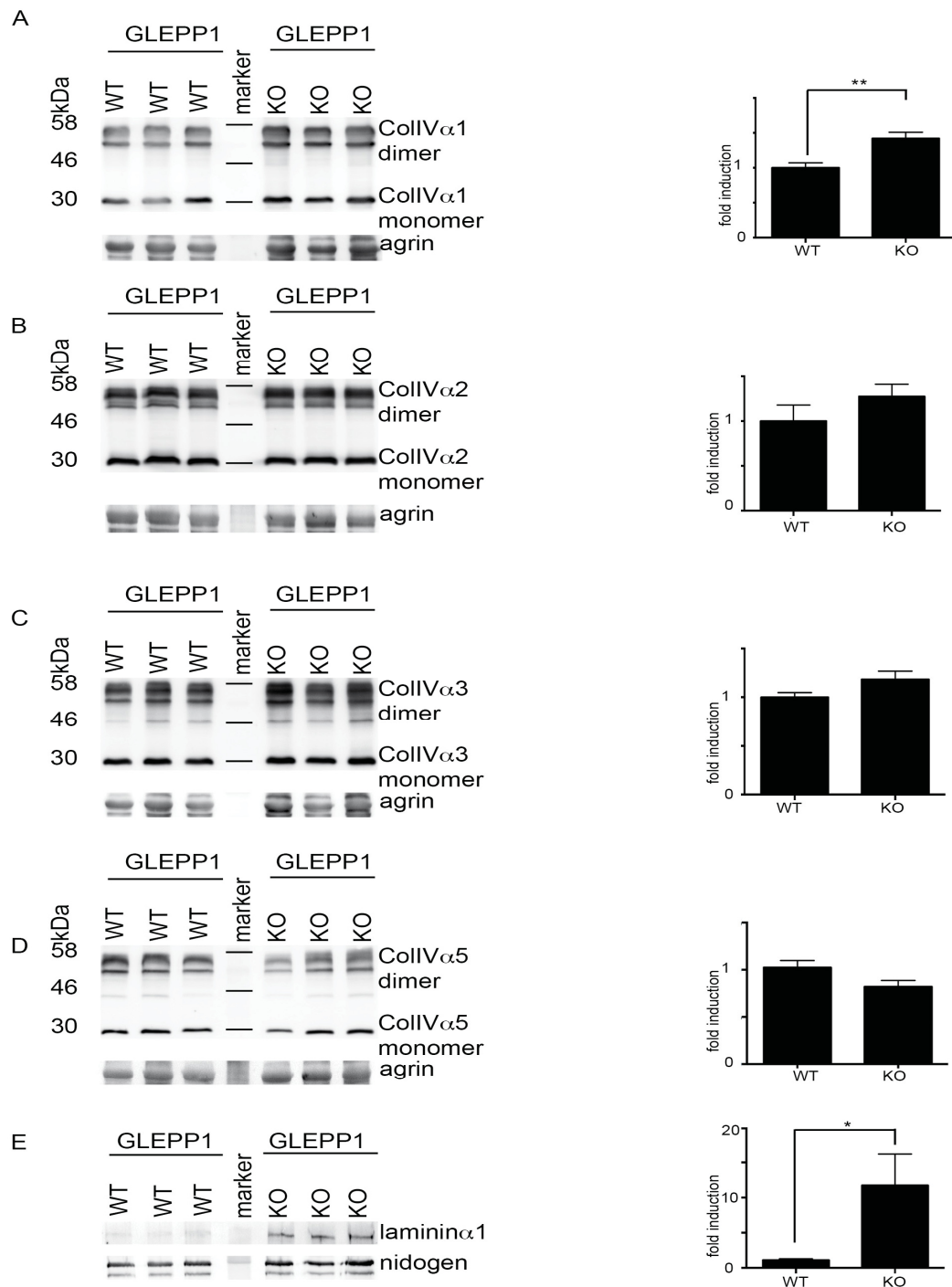


Abb. 20: Ergebnisse des Vergleiches der Proteinexpression von Kollagen Typ IV- und Laminin-Ketten in der glomerulären Basalmembran (GBM) im Westernblot

Glomeruli wurden aus 10 Monate alten Mäusen isoliert und Kollagene bzw. Laminine extrahiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte gelelektrophoretisch und wurde im Anschluss mit Westernblot (WB) untersucht. Abbildung A-D zeigen die WB der isolierten Kollagen Typ IV-Ketten im Vergleich von *GLEPP1* WT- zu KO-Mäusen. Densitometrisch wurde die Kollagen Typ IV Monomerbande (30kDa) ausgemessen und im Anschluss auf Agrin normiert. Abbildung E zeigt den WB für isoliertes Laminin im Vergleich von *GLEPP1* WT- zu KO-Mäusen. Laminin α 1 wurde densitometrisch ausgemessen und auf Nidogen bezogen. Abbildung A und E zeigen eine signifikant erhöhte Expression der unreifen Kollagen Typ IV- und Laminin-Ketten (Kollagen Typ IV α 1 und Laminin α 1) in *GLEPP1* KO-Mäusen. Die Untersuchung der reifen Kollagen Typ IV-Ketten α 3 (C) und α 5 (D) zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen *GLEPP1* WT- und KO-Tieren. (ns: nicht signifikant, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, $n=9$). Col IV: Kollagen Typ IV, GBM: Glomeruläre Basalmembran, *GLEPP1*: Glomerular Epithelial Protein 1, kDa: Kilodalton, KO: Knockout, WB: Westernblot, WT: Wildtyp

4.3.3 Darstellung der unterschiedlichen Expression von Proteinen im Glomerulum mit Immunfluoreszenz im Alter von 10 Monaten

Die oben beschriebenen Veränderungen in der Proteinzusammensetzung der GBM mit der vermehrten Expression der unreifen Kollagen Typ IV-Ketten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ wurden weiterführend mit Hilfe von Immunfluoreszenz untersucht. Ziel der Immunfluoreszenz war es, die unreifen Kollagen Typ IV-Ketten im Glomerulum zu lokalisieren. Es wurden kryofixierte Nierenpräparate von jeweils 3 WT- und 3 *GLEPPI KO*-Mäusen im Alter von 10 Monaten für die Immunfluoreszenz verwendet. Die immunhistochemischen Färbungen und die Aufnahmen der Bilder wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. Catherine Meyer-Schwesinger (UK Hamburg-Eppendorf) durchgeführt. Neben den Kollagen Typ IV-Ketten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ (grün) wurde Nephrin (rot) angefärbt, welches im Bereich der Schlitzmembran von Podozyten exprimiert wird. Bei gesunden Tieren zeigt sich hier ein lineares Expressionsmuster. Weiterhin wurden die Zellkerne (blau) mithilfe von DRAQ5, ein synthetisches Fluoreszenzmittel mit hoher Affinität für DNA, gefärbt⁹⁶. Zusätzlich zu isolierten Aufnahmen der Färbungen bei unterschiedlicher Vergrößerung, wurde eine kombinierte Aufnahme der Glomeruli von Kollagen Typ IV, Nephrin und podozytären Zellkernen durchgeführt.

Abbildung 21 zeigt die Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Untersuchung von Kollagen Typ IV $\alpha 1$ im Vergleich von *GLEPPI WT*- und *KO*-Glomeruli. Sowohl im *GLEPPI WT*, als auch im *KO*-Glomerulum konnte eine starke Expression von Kollagen Typ IV $\alpha 1$ in der mesangialen Matrix und der Bowman'schen Kapsel beobachtet werden. Bei der Untersuchung der GBM der *GLEPPI KO*-Glomeruli konnte zusätzlich ein granuliertes Expressionsmuster von Kollagen Typ IV $\alpha 1$ in der GBM beobachtet werden. Der Vergleich mit der GBM im *GLEPPI WT*-Glomeruli zeigte nur eine sehr geringe, lineare Expression an Kollagen Typ IV $\alpha 1$. In der Betrachtung der Nephrin-Expression konnte kein relativer Unterschied festgestellt werden, jedoch zeigte sich auch hier ein granuläres Expressionsmuster in den *GLEPPI KO*-Glomeruli.

In Abbildung 22 sind die Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Untersuchung von Kollagen Typ IV $\alpha 2$ dargestellt. Ähnlich wie bei der Expression von Kollagen Typ IV $\alpha 1$ wurde eine Expression von Kollagen Typ IV $\alpha 2$ in der mesangialen Matrix und der Bowman'schen Kapsel beobachtet. In der mesangialen Matrix der untersuchten *GLEPPI KO*-Glomeruli zeigte sich eine relative Zunahme in der Expression von Kollagen Typ IV $\alpha 2$ im Vergleich zum *WT*. Ebenfalls konnte ein granuliertes, perlschnurartiges Expressionsmuster in der GBM von Kollagen Typ IV $\alpha 2$ im *KO* beobachten werden.

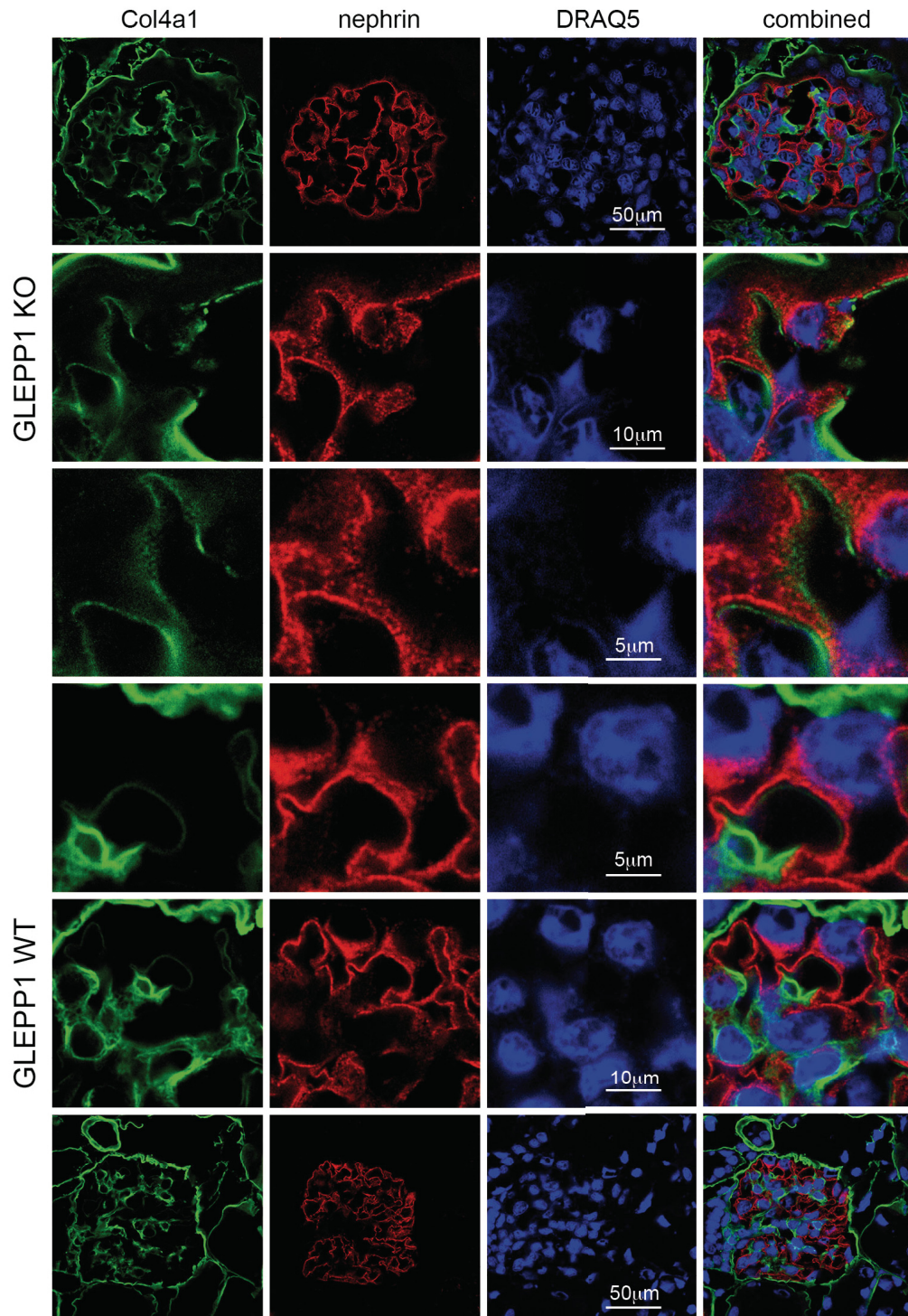


Abb. 21: Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen Typ IV α 1 in den Glomeruli von *GLEPP1* Wildtyp (WT)- und *Knockout* (KO)-Mäusen

Glomeruli aus kryofixierten Maus-Nierenpräparaten wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz gefärbt. Dargestellt sind die Färbungen für Kollagen Typ IV α 1 (grün), Nephrin (rot) und Zellkerne (blau) in Einzel- und Kombinationsaufnahmen von *GLEPP1* WT und KO-Tieren bei unterschiedlicher Auflösung. Im Bezug auf Kollagen Typ IV α 1 konnte eine Expression in der Bowman'schen Kapsel und der mesangialen Matrix beobachtet werden. In *GLEPP1* KO-Glomeruli zeigte sich ebenfalls eine granulierte Expression von Kollagen Typ IV α 1 im Bereich der GBM. Im WT zeigte sich hier nur eine geringe lineare Expression von Kollagen Typ IV α 1. Das Expressionsmuster von Kollagen Typ IV und Nephrin stellte sich im WT linear, im KO granuliert dar. GBM: Glomeruläre Basalmembran, *GLEPP1*: *Glomerular Epithelial Protein 1*, KO: *Knockout*, μ m: Mikrometer, WT: Wildtyp

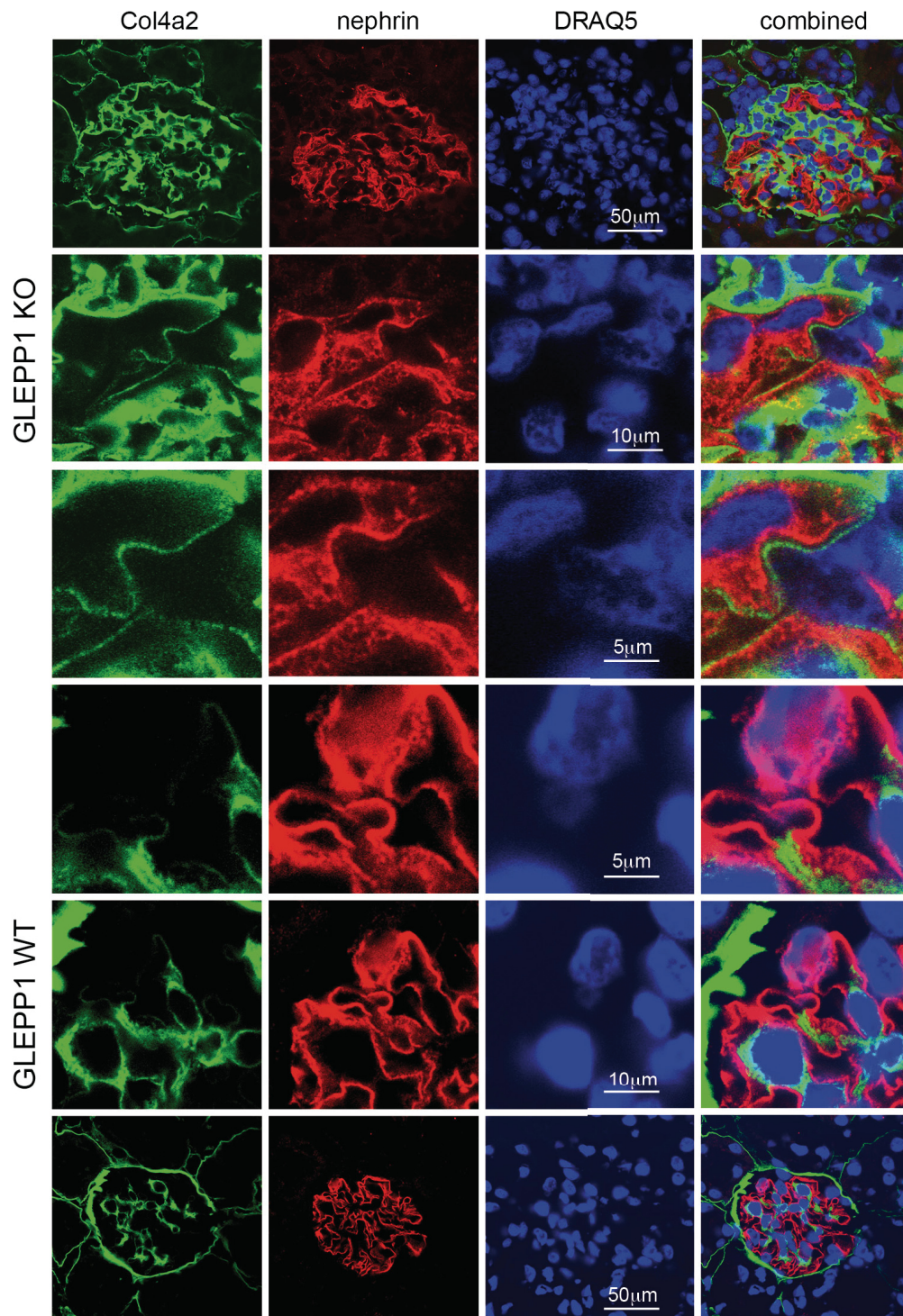


Abb. 22: Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen Typ IV $\alpha 2$ in den Glomeruli von *GLEPP1* Wildtyp (WT)- und *Knockout* (KO)-Mäusen

Glomeruli aus kryofixierten Maus-Nierenpräparaten wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz gefärbt. Dargestellt sind die Färbungen für Kollagen Typ IV $\alpha 1$ (grün), Nephrin (rot) und Zellkerne (blau) in Einzel- und Kombinationsaufnahmen von *GLEPP1* WT- und KO-Tieren bei unterschiedlicher Auflösung. Sowohl in der Bowman'schen Kapsel, als auch in der mesangialen Matrix zeigte sich eine Expression von Kollagen Typ IV $\alpha 2$. Im KO-Glomerulum wurde eine vermehrte Expression von Kollagen Typ IV $\alpha 2$ in der mesangialen Matrix beobachtet. Das Expressionsmuster zeigte sich im Vergleich zum WT als granuliert. Eine starke perlschnurartige Expression von Kollagen Typ IV $\alpha 2$ wurde zudem in der GBM der *GLEPP1* KO-Tiere beobachtet, welche sich im WT nicht nachweisen ließ. Im Bezug auf Nephrin konnte ein granuliertes Expressionsmuster im *GLEPP1* KO verglichen mit dem WT dargestellt werden. GBM: Glomeruläre Basalmembran, *GLEPP1*: *Glomerular Epithelial Protein 1*, KO: *Knockout*, μm : Mikrometer, WT: Wildtyp

In den entsprechenden Glomeruli der WT-Mäuse ist die Expression von Kollagen Typ IV $\alpha 2$ in der GBM kaum nachweisbar. Die Untersuchung von Nephryn zeigte keine relativen Expressionsunterschiede, aber ein granuläres Expressionsmuster im *GLEPP1 KO* verglichen mit einem linearen Expressionsmuster im WT. Zusammenfassend konnte in der Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass die in *Real-Time-PCR* und Westernblot beobachtete Zunahme der Expression der unreifen Kollagen Typ IV Ketten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ hauptsächlich auf Veränderungen der GBM der *GLEPP1 KO*-Tieren zurückzuführen ist.

4.4 Untersuchung des Mechanismus der *GLEPP1*-getriggerten Regulation der GBM

Um den Mechanismus der *GLEPP1*-getriggerten Regulation der Zusammensetzung der GBM nachvollziehen zu können, wurden in der Zellkultur Luciferase-Assays für die Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 in *HEK293T*-Zellen durchgeführt. Abbildung 23 zeigt die gemessenen Veränderungen der Luciferase-Aktivität, welche mit der Aktivierung oder Inhibition des jeweiligen Transkriptionsfaktors interpretiert wurde.

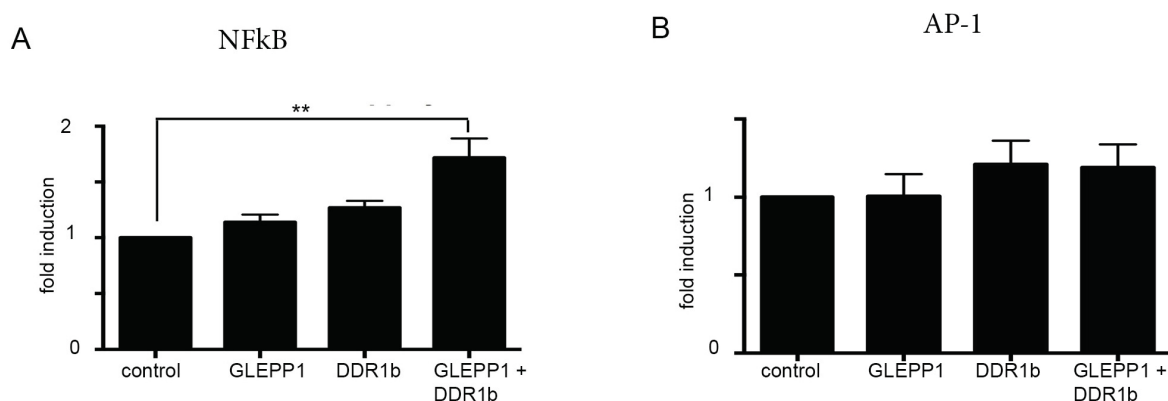


Abb. 23: Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 durch *GLEPP1* und *DDR1b*
 Dargestellt ist die Messung der Luciferase-Aktivität in Lysaten von transfizierten *HEK293T*-Zellen. Transfiziert wurden die jeweiligen Transkriptionsfaktor-Reporter-Konstrukte NF κ B und AP-1, ein beta-Galactosidase-Expressionsvektor zur Normierung der Transfektionseffizienz und die *GLEPP1* und *DDR1b*-Plasmide. (A) In den Versuchen mit NF κ B konnte durch Co-Transfektion von *GLEPP1* und *DDR1b* eine signifikante 1,75-fache Erhöhung der Luciferase-Aktivität gemessen werden (**: $p \leq 0,01$, $n=3$). Die separate Transfektion von *GLEPP1* und *DDR1b* zeigte keine signifikanten Unterschiede. (B) Die Versuche mit AP-1 zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Luciferase-Aktivität. *DDR1*: *Discoidin Domain Receptor Family Member 1*, *GLEPP1*: *Glomerular Epithelial Protein 1*, *HEK*: *Human Embryonic Kidney*, *KO*: *Knockout*, NF κ B: Nukleärer Faktor Kappa B

Die Expression von *GLEPP1* und *DDR1b* führten zu einer signifikanten, 1,75-fach erhöhten Transaktivierung des NF κ B Reporter-Luciferase-Konstrukts. Die separate Expression von *GLEPP1* oder *DDR1b* zeigte hingegen keine signifikanten Veränderungen in der Luciferase-Aktivität.

Zwischen den Kontrollen und *GLEPP1* bzw. *DDR1b* exprimierenden Zellen stellten sich keine Unterschiede hinsichtlich der AP1-Transaktivierung dar. Basierend auf diesen Messungen könnte NFκB im gemeinsamen *Signaling* von *GLEPP1* und *DDR1b* eine Rolle spielen. Für den Transkriptionsfaktor AP-1 konnten keine Hinweise für eine Interaktion mit dem *GLEPP1*- und/oder dem *DDR1b*-*Signaling* in den Luciferase-Assays gefunden werden.

4.5 Zusammenfassung des *GLEPP1*-Knockout-Phänotyps

Die Ergebnisse dieser Dissertation sind in Abbildung 24 zusammengefasst und geben einen Überblick über die Zusammenhänge zwischen klinischer Symptomatik, (elektronen-)mikroskopischen Auffälligkeiten und Veränderung der Proteinzusammensetzung der glomerulären Basalmembran im Vergleich von *GLEPP1*-defizienten Versuchstieren zu Wildtyp-Tieren.

	4 Monate					6 Monate					10 Monate					
Proteinurie	0					++					+					
Nierenfunktion	0					0					-					
Humps	0					0					+					
qPCR Coll IV	α1	α2	α3	α4	α5	α1	α2	α3	α4	α5	α1	α2	α3	α4	α5	
	0	0	0	-	0	-	0	-	-	-	+	+	-	0	0	
WB Coll IV											α1	α2	α3		α5	
											+	0	0		0	
IF Coll IV											α1		α2			
											+		+			
qPCR Laminin	α1	β1	α5	β2	α1	β1	α5	β2	α1	β1	α5	β2	α1	β1	α5	β2
	-	0	-	-	0	-	-	-	-	+	-	0	0	+	-	0
WB Laminin											α1					
											+					

Abb. 24: Zusammenfassung des *GLEPP1* Knockout (KO)-Phänotyps im Vergleich zum Wildtyp (WT) Dargestellt sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit dem Schwerpunkt auf den Eigenschaften der untersuchten *GLEPP1* KO-Mäuse im Vergleich zum WT. Die Proteinurie wurde mit Coomassie-Gelen veranschaulicht und mit Hilfe von einer Albumin-Creatinin-Ratio quantifiziert. Die Nierenfunktion wurde mithilfe des Cystatin C-Plasmaspiegels (ng/ml) gemessen. *Humps* beschreibt die Anzahl der isolierten Verdickungen der GBM pro Glomerulum. Die Ergebnisse der *qPCR* und der Westernblots (WB) von Kollagen Typ IV und Laminin sind nach Ihren Ketten getrennt dargestellt (grün: unreif, rot: reif). Die vermehrte Expression von unreifen Kollagen Typ IV-Ketten in der GBM der *GLEPP1* KO-Mäuse wurden in der Immunfluoreszenz (IF) gezeigt. „+“: signifikante Erhöhung oder Mehrexpression, „-“: signifikante Abnahme oder Minderexpression, „0“: kein signifikanter Unterschied. Die einzelnen Signifikanzniveaus der dargestellten Ergebnisse sind dem Ergebnisteil zu entnehmen. Col IV: Kollagen Typ IV, *GLEPP1*: *Glomerular Epithelial Protein 1*, IF: Immunfluoreszenz, KO: *Knockout*, Lam: Laminin, ml: Milliliter, ng: Nanogram, WB: Westernblot, WT: Wildtyp

5. Diskussion

Erstmalig entdeckten Fatih Ozaltin et al. zwei homozygote Mutationen in zwei Familien mit autosomal-rezessiven Steroid-resistenten nephrotischen Syndromen (SRNS) im Bereich des Gens für *GLEPPI* (*PTPRO*)²⁹. Diese Mutationen führten bereits im Kindesalter zum idiopathischen nephrotischen Syndrom, was bei zwei Patienten histologisch durch eine Fokal-Segmentale Glomerulosklerose (FSGS) und eine *Minimal-Change-Disease* (MCD) nachgewiesen wurde²⁹. Bereits in vergangenen Publikationen konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Expression von *GLEPPI* in den Glomeruli von Patienten, welche von MCD, FSGS, kongenitalem nephrotischen Syndrom des finnischen Typs (CNF), Immunglobulin A (IgA)-Nephritis, Rasch-progressive Glomerulonephritis (RPGN) oder Präeklampsie betroffen sind, nachzuweisen ist^{71,74,75,97}. Die genaue Funktion des Proteins ist noch nicht verstanden. Im Mausmodell scheint *GLEPPI* die Funktion der Podozyten zu beeinflussen und in der Regulation der podozytären Fussfortsätze (*Foot Process Effacement*) eine Rolle zuzuspielen^{64,68}. Wharram et al. untersuchten anhand eines *GLEPPI Knockout* (KO)-Mausmodells die Auswirkung der *GLEPPI*-Defizienz auf den renalen Phänotyp und beobachteten neben verbreiterten, weniger verzweigten podozytären Fussfortsätzen eine verschlechterte Nierenfunktion nach Uninephrektomie⁶⁸.

5.1 Auswirkungen der Mutation von *GLEPPI* auf Nierenfunktion und Proteinausscheidung im Vergleich von Maus und Mensch

Bisherige Untersuchungen von *GLEPPI KO*-Mäusen auf einem C57BL/6-Hintergrund konnten zeigen, dass im Alter von 4-6 Wochen im Vergleich zur WT-Kohorte keine Unterschiede hinsichtlich Proteinurie, Albuminurie und Nierenfunktion bestehen⁶⁸. Erst nach Uninephrektomie konnte in den *GLEPPI KO*-Mäusen eine verringerte Nierenfunktion zu diesem Zeitpunkt beobachtet werden⁶⁸. Die Versuchstiere der vorliegenden Arbeit wurden auf einem 129P3-Hintergrund gezüchtet und zu wesentlich späteren Zeitpunkten im Alter von 4, 6 und 10 Monaten untersucht. Im Alter von 6 bzw. 10 Monaten wurde eine größere Albuminurie der *GLEPPI KO*-Mäuse im Vergleich zu den WT-Tieren beobachtet (siehe Abbildung 24).

Dieser Sachverhalt könnte eine Altersabhängigkeit der Funktion von *GLEPPI* für die Funktion des Podozyten implizieren. Die Reduktion der Nierenfunktion im Rahmen der glomerulären Alterung entsteht hauptsächlich durch den Verlust an Nephronen, welche durch Glomerulosklerose bedingt untergehen^{98,99}.

Diese Glomerulosklerose entsteht aufgrund von zahlreichen histologischen Veränderungen im Glomerulum, welche zusammenfassend zu einer erhöhten Permeabilität des glomerulären Filters und einer Expansion der mesangialen Matrix führen^{98,100,101}. Der Podozyt scheint eine zentrale Rolle im Alterungsprozess zu spielen, da es bei zunehmendem Volumen der Glomeruli im Alter ebenfalls zu einer podozytären Hypertrophie kommt^{100,101}. Diese podozytäre Hypertrophie könnte als Stressor zu einer verstärkten Depletion der Podozyten führen, was wiederum eine stärkere Permeabilität des glomerulären Filters bedingen könnte¹⁰⁰. Im Rahmen von Untersuchungen der FSGS konnten höhere Konzentrationen an Podozyten im Urin nachgewiesen werden als in der Vergleichsgruppe¹⁰². Die Untersuchung von *ad libitum* gefütterten Ratten zeigte im Vergleich zu diätätisch-gefütterten Vergleichsgruppe eine Glomerulosklerose und Proteinurie im Alter von 24 Monaten, welche einhergingen mit einer Reduktion der Expression von podozytären Proteinen wie *GLEPPI*, Nephtrin und WT1¹⁰³. Interessanterweise konnte auch in Biopsien von FSGS-Patienten gezeigt werden, dass *GLEPPI* als podozytärer Marker sowohl in sklerosierten, als auch in einigen nicht-sklerosierten Glomeruli vermindert exprimiert wird⁷⁵. Anhand dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass *GLEPPI* ein prädikativer Marker für glomeruläre bzw. podozytäre Schädigung sein könnte, auch im Bezug auf die Entwicklung von Glomerulosklerose im Alter⁷⁵.

Die Albuminurie der *GLEPPI*-defizienten Mäuse der vorliegenden Arbeit könnte durch einen schnelleren Alterungsprozess der Nieren induziert werden, was sich durch eine erhöhte Permeabilität des glomerulären Filters ab einem Alter von 6 Monaten manifestieren könnte. Allerdings wurden zu keinem Zeitpunkt Zeichen der Glomerulosklerose in Elektronenmikroskopie oder PAS-Färbungen der Glomeruli beobachtet. Die Zunahme der GBM-Humps ab einem Alter von 6 Monaten im *GLEPPI KO* ist jedoch eine auffällige Veränderung, was an anderer Stelle diskutiert wird (siehe 5.2). Die Untersuchung der Versuchstiere zu späteren Lebenszeitpunkten könnte hier aufschlussreich sein, ob der *GLEPPI KO* in 129P3-Mäusen zu Glomerulosklerose und letztendlich einer schnelleren glomerulären Alterung führt.

Auffällig ist der Unterschied zwischen den Ergebnissen der Urinuntersuchung im Bezug auf die Albumin-Creatinin-Ratio (ACR) und das Coomassie-Gel im Alter von 10 Monaten. Das Coomassie-Gel zeigt einen sehr deutlichen Unterschied im Gehalt der Proteine im Urin der Versuchstiere zwischen *GLEPPI WT* und *KO*. Jedoch ist der Unterschied zwischen *GLEPPI WT* und *KO* und die absolute Höhe der ACR geringer als im Alter von 6 Monaten.

Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus der Bestimmung der Nierenfunktion, die mithilfe des Cystatin C-Spiegels im Plasma der Versuchstiere gemessen wurde. Erst in der 10-Monatskohorte beobachteten wir eine Verringerung der Nierenfunktion der *GLEPPI KO*-Tiere im Sinne einer beginnenden Niereninsuffizienz (siehe Abbildung 24). Zwischen den jüngeren Versuchstieren im Alter von 4 und 6 Monaten konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Cystatin-C Spiegel im Plasma beobachtet werden. Offen bleibt die Frage, ob es einen Unterschied in der Sensibilität der Mausorganismen mit den unterschiedlichen genetischen Hintergründen C57BL/6 und 129P3 gegenüber dem *GLEPPI KO* gibt. Zwar manifestiert sich die reduzierte Nierenfunktion der untersuchten 129P3-Mäuse erst im Alter von 10 Monaten, jedoch mussten die C57BL/6-Mäuse im Alter von 4-6 Wochen uninephrektomiert werden, um einen Unterschied darzustellen⁶⁸. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den beiden untersuchten Mausstämmen im Bezug auf die Auswirkung einer *GLEPPI*-Defizienz auf Proteinurie, Albuminurie und Nierenfunktion bestimmen zu können, müssten weitere Untersuchungen in gleichaltrigen Versuchstieren der beiden genetischen Hintergründe durchgeführt werden.

Die beschriebenen Mutationen im *GLEPPI*-Gen führten in den beobachteten Patienten zu einem Auftreten des nephrotischen Syndroms im Kindesalter²⁹. Diese Mutationen manifestierten sich bei dem betroffenen FSGS-Patienten aus Familie A im Alter von 5 und bei dem *MCD*-Patienten aus Familie B im Alter von 11 Jahren²⁹. Betrachtet man die oben beschriebenen Ergebnisse zur Untersuchung der Albuminurie im experimentellen Mausmodell, so zeigen *GLEPPI KO*-Mäuse keine erhöhte Albuminurie im Alter von 4 Monaten (siehe Abbildung 24). Darüber hinaus ist in einer weiteren Studie beschrieben worden, dass es keine erhöhte Proteinurie der *GLEPPI KO* auf einem C57BL/6-Hintergrund im Alter von 4-6 Wochen gibt⁶⁸. Vergleicht man jetzt das Auftreten der Proteinurie zwischen Menschen mit *GLEPPI*-Mutation mit der Albuminurie der *GLEPPI*-defizienten Mäuse, so kommt man zu dem Ergebnis, dass die Proteinurie beim Menschen im Kindesalter wesentlich früher beginnt, als die Albuminurie im Mausmodell. Die normale Lebenszeit der Mäuse des Stamms 129 beträgt ungefähr 23 Monate für Männchen und 22 Monate für Weibchen¹⁰³. Zum Zeitpunkt der erstmalig ansteigenden Albuminurie im Alter von 6 Monaten haben die Versuchstiere der vorliegenden Arbeit also schon etwa ein Viertel ihres Lebenszyklus durchlaufen. Möglich wäre, dass andere Gene mit einer ähnlichen Funktion wie *GLEPPI* zu Beginn der Entwicklung des Mausorganismus die Aufgaben des Proteins übernehmen und sich somit dessen Abwesenheit erst in späteren Entwicklungsstadien manifestiert⁷⁷.

Eine andere Möglichkeit bestende darin, dass *GLEPPI* erst in späteren Phasen der Alterung für die Funktion des Podozyten relevant wird und sich deshalb in frühen Stadien nicht auf den Phänotyp der Versuchstiere auswirkt. Im Mausmodell scheinen Mechanismen vorzuliegen, die eine Schädigung des glomerulären Filters durch Abwesenheit von *GLEPPI* abmildern, so dass im Vergleich zum Menschen nur eine Albuminurie und kein nephrotisches Syndrom entstehen. Um diese Frage zu beantworten, müssten weitere Untersuchungen hinsichtlich möglicher Proteine oder kompensatorischer Signalkaskaden mit homologer Funktion zu *GLEPPI* durchgeführt werden (siehe 5.4).

5.2 Veränderungen der GBM im *GLEPPI* – Mausmodell

Bei der mikroskopischen Untersuchung von Periodsäure-Schiff (PAS)-gefärbten Nierenschnitten beobachteten wir isolierte, subpodozytär gelegene Verdickungen (*Humps*) der glomerulären Basalmembran (GBM). Im Alter von 4 Monaten traten diese nur vereinzelt in den Glomeruli der *GLEPPI* WT- und *KO*-Mäuse auf.

Ab einem Alter von 10 Monaten war die Anzahl der *Humps* in den Glomeruli der *KO*-Mäuse signifikant größer als in Glomeruli der WT-Mäuse (siehe Abbildung 24). Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Glomeruli des *GLEPPI KO* im Alter von 6 Monaten konnten an einigen Stellen verschmolzene, podozytäre Fussfortsätze im Bereich der *Humps* zeigen, welche auf ein beginnendes *Foot Process Effacement* hinweisen. In der 3D-Elektronenmikroskopie konnten die *Humps* und das *Foot Process Effacement* im *GLEPPI-KO* dargestellt und quantifiziert werden. So konnte neben einer deutlich reduzierten Anzahl an podozytären Fussfortsätzen auch eine signifikante Verdickung der GBM im *GLEPPI KO* beobachtet werden. Vergleicht man die beobachteten *Humps* mit anderen humanen Krankheitsbildern, welche sich an der GBM manifestieren, so findet man nur wenige morphologische Gemeinsamkeiten mit bekannten Erkrankungen. Das Alport-Syndrom zeichnet sich je nach Ausprägung durch verdickte und lamellierte Basalmembranabschnitte, aber auch durch Verschmälerungen der GBM aus¹⁰⁴. Die Erkrankung der dünnen Basalmembran (engl.: *Thin-basement-membrane-nephropathy*, *TBMN*) führt zu einer uniform-verschmälerten und die diabetische Nephropathie zu einer generalisiert verdickten GBM¹⁰⁵. Im Mausmodell wurden ähnliche morphologische Veränderungen beispielsweise bei *DDR1*-Defizienz und bei Knockout von Integrin $\alpha 2\beta 1$ beobachtet (siehe Abbildung 25)^{106,107}. Auch der Knockout von podozytärem VHL (Von-Hippel-Lindau) zeigte ähnliche Veränderungen in der GBM der Mausglomeruli¹⁰⁸.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen waren in den *DDR1*-defizienten und Integrin $\alpha 2\beta 1$ -defizienten Mäusen lokalisierte, pilzförmige Verdickungen (*Humps*) auszumachen, welche sich isodens zur normal konfigurierten GBM darstellten und im Bereich dieser Veränderungen fokale Verluste der podozytären Schlitzmembran aufwiesen (siehe Abbildung 25)^{106,107}. In den Glomeruli von Mäusen mit einem Verlust von podozytärem VHL konnten ungleichmäßige Verdickungen der GBM mit zahlreichen subepithelialen *Humps* beobachtet werden, welche darüberhinaus mit verbreiterte Fussfortsätze der Podozyten assoziiert waren (siehe Abbildung 25)^{106–108}. Darüber hinaus zeigten sich inkomplett-verschmolzene und fragmentierte GBM-Abschnitte¹⁰⁸.

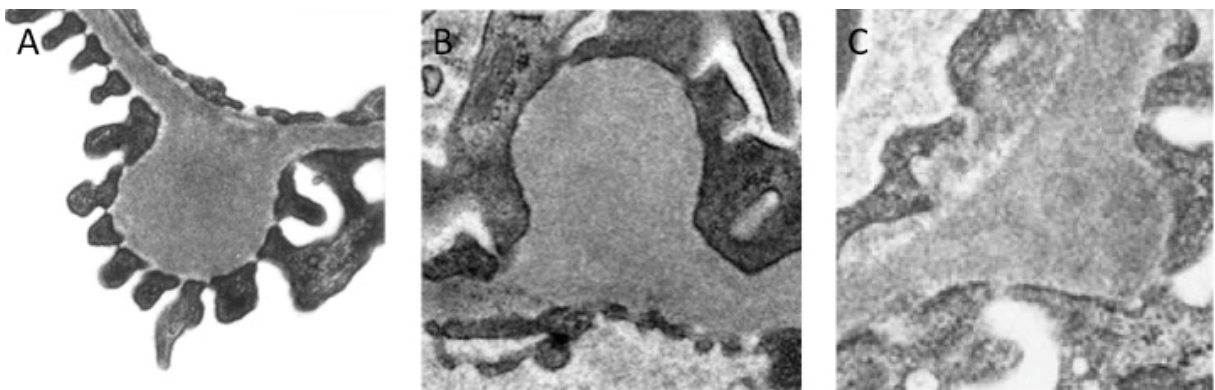


Abb. 25: Darstellung von lokalisierten subpodozytären Veränderungen aus anderen *Knockout* (KO)-Mausmodellen (modifiziert nach Gross et al., 2004¹⁰⁶, Rubel et al., 2014¹⁰⁷ und Steenhard et al., 2010¹⁰⁸) Die Abbildung zeigt beschriebene morphologische Veränderungen der GBM in KO-Mausmodellen, welche als isolierte, subpodozytäre Verdickungen (*Humps*) imponieren. A: *DDR1* KO (modifiziert nach Gross et al., 2004¹⁰⁶), B: Integrin $\alpha 2\beta 1$ -KO (modifiziert nach Rubel et al., 2014¹⁰⁷), C: VHL-KO (modifiziert nach Steenhard et al., 2010¹⁰⁸) GBM: Glomeruläre Basalmembran, *DDR1*: *Discoidin Domain Receptor Family Member 1*, VHL: Von-Hippel-Lindau

Die Anzahl der *Humps* steigt in den Glomeruli der *GLEPPI* KO- und WT-Mäusen im Alter von 4 bis 10 Monaten an, im *GLEPPI* KO jedoch deutlich stärker gegenüber dem WT. Parallel zu diesen Veränderungen beobachteten wir eine größere Albuminurie ab einem Alter von 6 Monaten und im Alter von 10 Monaten eine schlechtere Nierenfunktion im *GLEPPI* KO als in den WT (siehe Abbildung 24). Diese Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass die steigende Anzahl der *Humps* ein Zeichen für Veränderungen in der GBM darstellt, die im Altersverlauf zu Albuminurie und Niereninsuffizienz führt.

Darüber hinaus bleibt zu diskutieren, warum neben der Anzahl der *Humps* in den Glomeruli der KO-Mäuse auch die Anzahl in den WT-Mäusen mit zunehmendem Alter ansteigt. Zu vermuten wäre eine Prädisposition des genetischen Hintergrundes 129, welcher durch die *GLEPPI*-Defizienz verstärkt wird.

Als Ursache der *Humps* könnte eine fehlregulierte Produktion von Proteinen der GBM durch den Podozyten infrage kommen, welche sich in den beschriebenen subpodozytären Lokalisationen ansammeln. Darüber hinaus könnte der Verlust von *GLEPPI* als ein potentieller Auslöser für ein beginnendes *Foot Process Effacement* infrage kommen.

Interessanterweise zeigen auch *DDR1*-defiziente Mäuse neben den morphologischen Veränderungen eine erhöhte Proteinurie im Alter von 3-9 Monaten, jedoch konnte in diesem Zusammenhang kein Einfluss auf die Nierenfunktion beobachtet werden¹⁰⁶. Zu untersuchen wäre, ob die Anzahl der Verdickungen im *DDR1 KO* über die unterschiedlichen Altersklassen konstant ist. So könnte rückblickend auf die beobachteten Veränderungen im *GLEPPI KO* eine Assoziation zwischen vermehrten *humps*, steigender Proteinurie und verringerter Nierenfunktion im Altersverlauf hergestellt werden. Neben dem *KO* von *DDR1*, *GLEPPI* und *VHL* konnten *Humps* der GBM auch in weiteren Mausmodellen, wie zum Beispiel für *Integrin $\alpha 2$ KO*-Mäuse, nachgewiesen werden¹⁰⁹.

In Untersuchungen mithilfe von 3D-Elektronenmikroskopie eines Alport-Mausmodells konnten neben globalem Verlust an podozytären Fussfortsätzen, variierende GBM-Dicke und fokal reduzierter Dichte der podozytären Zellkörper auch zelluläre Invasionen in die GBM ausgehend von den Podozyten beobachtet werden⁹⁵. Im Rahmen der Kooperation mit Frau Prof. Dr. Rachel Lennon konnten ähnliche morphologische Veränderungen im *GLEPPI KO* beobachtet werden⁹⁵. Erklärungen für die Invasion der podozytären Zellausläufer könnten einerseits ein Versuch des Podozyten sein, sich in der GBM zu verankern, andererseits eine Reaktion des Podozyten auf die abnormale GBM-Konfiguration, um die geschwächte GBM zu remodellieren⁹⁵.

5.3 Knockout von *GLEPPI* führt zu einem Wechsel der Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Mausglomeruli zeigte eine isodense Struktur der *Humps* im Vergleich zur normal konfigurierten GBM. Ausgehend von dieser Beobachtung wurde mithilfe von RNA- und Proteinuntersuchungen nach Unterschieden in der Zusammensetzung der GBM gesucht. Im Alter von 4 Monaten zeigten sich kaum Unterschiede in der Expression der Kollagen Typ IV-Ketten. Dagegen ergab die Untersuchung nach 6 Monaten eine Herabregulation der Kollagen Typ IV-Ketten $\alpha 1-5$. Nach 10 Monaten zeigte sich eine vermehrte Expression der unreifen Kollagen Typ IV-Ketten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ und eine verminderte Expression der reifen Ketten $\alpha 3$.

Zusammengefasst beobachteten wir bei der Untersuchung der *GLEPPI KO*-Mäuse einen Wechsel der Zusammensetzung der GBM im Altersverlauf von einer reifen Form, bestehend aus Kollagen Typ IV $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Heterotrimeren, hin zu einer unreifen Form mit einem vermehrten Anteil der unreifen Kollagen Typ IV $\alpha1\alpha2\alpha1$ -Heterotrimeren im Alter von 10 Monaten.

Ähnliche molekulare Veränderungen lassen sich in der GBM beim Alport-Syndrom finden. Das Alport-Syndrom beruht auf autosomal-rezessiven Mutationen in den Genen für Kollagen Typ IV $\alpha3$ und $\alpha4$ oder auf X-chromosomalen Mutationen des Kollagen Typ IV $\alpha5$ -Gens^{110,111}. Der resultierende Verlust des reifen Kollagen Typ IV $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Heterotrimers führt kompensatorisch zu einer vermehrten Ausbildung von unreifen Kollagen Typ IV-Ketten, die das Kollagen Typ IV $\alpha1\alpha2\alpha1$ -Netzwerk ausbilden. Dieses Netzwerk, welches in der Glomerulogenese nur zu Beginn der Entwicklung ausgeprägt wird, ist nicht so stabil zwischen den Heterotrimeren verbunden und anfälliger für biomechanischen Stress und Proteinolyse¹¹². Morphologisch entstehen Verdickungen, Verdünnungen oder Laminierung der GBM, welche von ausgeprägtem *Foot Process Effacement* begleitet werden und klinisch zu fortschreitender Hämaturie, Proteinurie und oftmals zu Nierenversagen führen¹¹³.

Interessanterweise führt der Verlust von *GLEPPI* in den Versuchstieren dieser Arbeit erst im Alter von 6 Monaten zu einer Veränderung der Expression der Kollagen Typ IV-Ketten auf RNA-Ebene. Die Herabregulation von sowohl unreifen, als auch reifen Ketten im Vergleich zu der 4 Monatskohorte zeigt, dass sich der *Knockout* von *GLEPPI* anscheinend erst nach 4 Monaten auf die Zusammensetzung der GBM der Mäuse auswirkt. An dieser Stelle ist zu vermuten, dass die Funktion von *GLEPPI* innerhalb der Glomerulogenese und bis zum Alter von 4 Monaten über andere Proteine oder Signalwege kompensiert werden könnte, wie schon im Bezug zu den Proteinurie-Daten diskutiert (siehe 5.1). Der kompensatorische Anstieg der unreifen Ketten Kollagen Typ IV $\alpha1$ und $\alpha2$ könnte über andere Kollagen Typ IV-bindende Proteine in der Membran der Podozyten getriggert werden, wie z.B. Integrine ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$) oder durch den oben beschriebene *DDR1*-Rezeptor^{114,115}. Aktuelle Untersuchungen bezüglich der Kollagen-Rezeptoren Integrin $\alpha2\beta1$ und *DDR1* in Kollagen Typ IV $\alpha3$ *KO*-Mausmodellen konnten zeigen, dass die beiden Proteine eine wichtige Rolle in der Ausprägung einer reifen GBM spielen¹⁰⁷.

Ein kompensatorischer Anstieg der unreifen Kollagen Typ IV-Ketten im Alter von 10 Monaten konnte in dieser Arbeit auf Proteinebene nur für Kollagen Typ IV $\alpha1$ gezeigt werden. Im Bezug auf Kollagen Typ IV $\alpha2$ wurde kein signifikanter Unterschied dargestellt.

Eine Erklärung hierfür könnte im experimentellen Aufbau zu finden sein. Es wurden gesamte Glomeruli mit Kollagenase verdaut, wodurch auch unbekannte Mengen von Kollagen in die quantitative Auswertung einbezogen werden, welche nicht in der GBM exprimiert sind. Als Beispiel lässt sich die Bowman'sche Kapsel aufzeigen, die sowohl aus unreifem Kollagen Typ IV $\alpha 1$ und $\alpha 2$, als auch aus reifen Kollagen Typ IV $\alpha 5$ und $\alpha 6$ besteht und somit die quantitative Auswertung der GBM-Zusammensetzung anhand des Gesamtproteins erschwert¹¹⁶.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz jedoch zeigen eindeutig eine stärkere Expression von Kollagen Typ IV $\alpha 1$ und $\alpha 2$ in der glomerulären Basalmembran im *GLEPPI KO*. Diese ist perlschnurartig entlang der peripheren Abschnitte im Glomerulum lokalisiert.

Darüber hinaus konnte in anderen Arbeiten zum Alport-Syndrom gezeigt werden, dass die Mutation in einer α -Kette des Kollagen Typ IV-Heterotrimer zu einem Verlust des gesamten Proteins führt und somit eine vermehrte Expression von Kollagen Typ IV $\alpha 1$ als erhöhte Expression des gesamten unreifen Heterotrimer (Kollagen Typ IV $\alpha 1\alpha 2\alpha 1$) interpretiert werden kann, was eine Erhöhung des unreifen Kollagen Typ IV $\alpha 2$ einschließen würde¹¹⁷.

Eine weitere Möglichkeit, welche zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann, ist die vermehrte Produktion von Kollagen Typ IV $\alpha 1$ und $\alpha 2$ ausgehend von der glomerulären Endothelzelle. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass unreifes Kollagen Typ IV sowohl von Podozyten, als auch von jenen glomerulären Endothelzellen synthetisiert werden kann⁴⁰. Obwohl die *GLEPPI*-Mutation nur den Podozyten betrifft und die *Humps* eindeutig auf der podozytären Seite der GBM lokalisiert sind, ist über *Cross-Talk*-Mechanismen auch der Einfluss der glomerulären Endothelzelle bisher nicht ausgeschlossen. Es ist bekannt, dass dieser *Cross-Talk* Einfluss auf die Zusammensetzung der GBM hat¹¹⁸.

Anhand von weiteren Untersuchungen des *GLEPPI KO* sollten mehr Einblicke in die Funktion von Podozyten und Endothelzellen, bzw. Ihrer Kommunikation untereinander bezüglich der Regulation der GBM-Zusammensetzung gewonnen werden. Dieser *Cross-Talk* zwischen Podozyten und Endothelzellen könnte über verschiedene Systeme funktionieren, welche beispielsweise im Zusammenhang mit der endothelialen Dysfunktion bei Diabetes erforscht sind¹¹⁹. Als Beispiel könnte das System aus dem Liganden *Vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A), welcher von Podozyten gebildet wird und dem VEGF-Rezeptor 2, welcher hauptsächlich von Endothelzellen exprimiert wird, genannt werden¹²⁰.

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass sowohl eine Veränderung der Expression des podozytär-gebildeten VEGF, als auch die Deletion des endothelialen VEGF-Rezeptors 2 zu Abnormalitäten der glomerulären Strukturen, unter anderem zu Endothelzelldefekten, führte^{120,121}. Eine Interaktion über verschiedenste Signalwege zwischen Podozyt und glomerulärer Endothelzelle scheint somit entscheidend für die Integrität der glomerulären Strukturen zu sein und könnte somit auch eine Rolle in der Entstehung der veränderten Zusammensetzung der GBM durch *GLEPPI KO* spielen.

Auch die Zusammensetzung des Laminins zeigte bei unseren *GLEPPI KO*-Mäusen, analog zu den beschriebenen Ergebnissen des Kollagen Typ IV, im Alter von 10 Monaten eine vermehrte Expression der unreifen Kette Laminin $\alpha 1$. Ähnliche Ergebnisse bezüglich des unreifen Laminin-Heterotrimers $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ sind wiederum aus Untersuchungen der GBM im Alport-Syndrom bekannt, die ebenfalls eine vermehrte Expression dieses unreifen Proteins nachweisen konnten, was wahrscheinlich auf kompensatorische Mechanismen zurückzuführen sei¹²². Die eben diskutierten Möglichkeiten zur Entstehung des beobachteten Wechsels von einer reifen zu einer unreifen Zusammensetzung der GBM im *GLEPPI KO* könnten auch für Laminin gelten.

Basierend auf den Beobachtungen in der PAS-Mikroskopie und den Expressionsanalysen der GBM auf RNA und Proteinebene, könnten die bereits diskutierten *Humps* (siehe 5.2) eine Akkumulation von vermehrt gebildeten unreifen Kollagen Typ IV- und Laminin-Ketten sein. Dies konnte bisher jedoch nicht dargestellt werden. Möglich wäre der Vergleich zwischen der tatsächlichen Ausdehnung der *Humps* und der Fläche der in der Immunfluoreszenz gefärbten Verdickungen, um einen Zusammenhang zwischen mikroskopischer und molekularer Veränderung darzustellen. Immunogoldfärbungen der unreifen Kollagen Typ IV-Ketten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen könnten darüber hinaus noch mehr Klarheit schaffen.

5.4 Mechanismus der GBM Veränderungen

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass *GLEPPI* eine entscheidende Rolle in der Integrität und Zusammensetzung der GBM im Bezug auf ihre Strukturkomponenten spielt. Bekannt ist, dass *GLEPPI* als Rezeptor-Tyrosin-Phosphatase an der Regulation der podozytären Fussfortsätze und der Phosphorylierung von Proteinen beteiligt ist⁶³. Komponenten des Signalwegs von *GLEPPI* sind im Bezug auf den Podozyten bisher nicht bekannt und wurden in der vorliegenden Arbeit thematisiert.

Wie oben beschrieben, waren die Gemeinsamkeiten in Phänotyp und Proteinurie des *GLEPPI* *KO* und der von Gross et al. untersuchten *DDR1*-defizienten Mäusen auffällig¹⁰⁶. Ausgangspunkt für die Untersuchungen des Mechanismus war die Annahme, dass *GLEPPI* und *DDR1* gemeinsame Signalwege benutzen, um Einfluss auf die Zusammensetzung der GBM zu nehmen. Bisher wurde eine Vielzahl von Adaptermolekülen für die zytosolische Tyrosinkinase-Untereinheit des *DDR1* beschrieben.

Unsere Untersuchungen konzentrierten sich auf NFκB, AP-1 und *STAT3*, welche im Bezug auf das *GLEPPI*- und *DDR1*-*Signaling* in anderen Zelllinien erarbeitet wurden.

In Untersuchungen von hepatozellulären Karzinomen konnte gezeigt werden, dass *GLEPPI* einen tumor-suppressiven Effekt durch eine Herabregulation von *STAT3* besitzt⁷⁸. Darüber hinaus kann *DDR1* über Shp-2 die Aktivierung von *STAT3* auslösen und wirkt somit antagonistisch zum *Signaling* vom Kollagenrezeptor Integrin α2β1¹²³.

Im Zusammenhang zu fulminanter Hepatitis wurde ein protektiver Effekt gegenüber Leberzellschäden durch *GLEPPI*-Expression beobachtet¹²⁴. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *GLEPPI* über NFκB-Aktivierung einen proinflammatorischen Effekt besitzt¹²⁴.

In Brustkrebszellen wurde gezeigt, dass über *DDR1* eine Aktivierung von NFκB stattfinden kann, welche zur Induktion Cyclooxygenase-2 und Chemoresistenz der Zellen führt¹²⁵.

Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist ein entscheidender Teil in den Signalwegen der *MAP*-Kinasen (*Mitogen-Activated-Protein-Kinasen*) ERK, JNK und p38 in der Transduktion von Zelloberfläche zum Nucleus¹²⁶. An humanen Th17-Zellen konnte gezeigt werden, dass *DDR1* wiederum MAP-Kinasen aktivieren kann¹²⁷.

Die Untersuchung dieser Arbeit im Bezug auf *STAT3* und AP1 ergaben keine Unterschiede in der Luciferase-Aktivität bei gleichzeitiger Expression von *GLEPPI* und *DDR1b*. Die Untersuchung des Transkriptionsfaktors NFκB hingegen zeigte eine 1,75-fach erhöhte Luciferase-Aktivität durch *GLEPPI* und *DDR1b* im Vergleich zur Kontrolle, welche auf eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch *GLEPPI* hindeuten könnte.

Jedoch ist die Aktivierung von NFκB so gering, dass die biologische Bedeutung der NFκB-Aktivierung durch *GLEPPI* in Frage gestellt werden kann.

Vertiefende Versuche bezüglich der NFκB-Aktivierung könnten sich auf die Bestandteile der Signalkaskade *GLEPPI*/ErbB2/Akt/GSK-3β/β-Catenin/NFκB konzentrieren, welche im Zusammenhang mit fulminanter Hepatitis identifiziert wurde¹²⁴. Zukünftig sollte die Suche nach weiteren Komponenten des *Signaling* von *GLEPPI* fortgesetzt werden. Hierfür könnten weitere bekannte Faktoren aus dem *DDR1-Signaling* infrage kommen, zum Beispiel ShcA, Grb2, Nck, Shp-1, Shp-2, STAT5, p38, PI-3-Kinase, Csk oder Notch1¹²⁸. Aufgrund des ähnlichen Phänotyps zwischen dem *GLEPPI KO* und *VHL KO* könnten auch Faktoren aus dem *Signaling* des VHL infrage kommen. Beispielfhaft können hier HIF1α, HIF2α, VEGF, HGF, Wnt, β-catenine, TCF und LEF genannt werden¹²⁹.

Aktuelle Untersuchungen bezüglich des Wilms Tumor Proteins 1 (WT1) und seiner Rolle in der Integrität der testikulären Basalmembran konnten zeigen, dass ein Knockout von WT1 zu reduzierten Kollagen Typ IV Konzentrationen in der GBM führt¹³⁰.

Insbesondere die wichtigen Bestandteile der testikulären GBM, Kollagen Typ IV α1 und α2, zeigten sich herunterreguliert¹³⁰. Luciferase-Assays dieser Studie belegten, dass Kollagen Typ IV α1 und α2 durch WT1 aktiviert werden. Aufgrund dieses Zusammenhangs sollten weitere Untersuchungen bezüglich einer möglichen Interaktion von WT1 und *GLEPPI* durchgeführt werden.

Darüber hinaus könnten RNA-Arrays aus Glomeruli durchgeführt werden, um die Transkriptionsaktivität genauer zu beurteilen und mehr über das *Signaling* von *GLEPPI* herauszufinden.

6. Schlussfolgerung

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass der *Knockout (KO)* von *GLEPPI* im Mausmodell sowohl zu einer reduzierten Nierenfunktion führt, als auch Einfluss auf die Struktur des glomerulären Filters und insbesondere auf die Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran (GBM) nimmt.

Die GBM der *KO*-Mäuse zeigte im Alter von 10 Monaten einen Wechsel hin zu einer unreifen Zusammensetzung der Strukturkomponenten Kollagen Typ IV und Laminin. Aus der Literatur ist bekannt, dass die unreife GBM weniger stabil ist als die reife GBM¹¹².

Zusätzlich konnten fokale Verdickungen (*Humps*) der GBM dargestellt werden, die an einigen Stellen mit *Foot Process Effacement* assoziiert waren. Dies könnte als Indikator für die Schädigung des glomerulären Filters verstanden werden, welcher auf die *GLEPPI*-Defizienz zurückzuführen sein könnte. Interessanterweise konnten in einigen Abschnitten podozytäre Invasionen in die GBM dargestellt werden, welche ein Versuch des Podozyten sein könnten, die Integrität des glomerulären Filters aufrecht zu erhalten. Die Beobachtung dieser Veränderung innerhalb der GBM könnte ein möglicher Anhaltspunkt in der Pathogenese des idiopathischen nephrotischen Syndroms im Menschen aufgrund einer *GLEPPI*-Mutation sein. Um die Auswirkungen des *GLEPPI KO* auf die menschliche Niere zu beobachten und um die vorliegenden Ergebnisse im Mausmodell mit Patienten mit *GLEPPI*-Mutationen vergleichen zu können, sollten in Zukunft auch Untersuchungen humaner Glomeruli durchgeführt werden.

Interessanterweise konnte ebenfalls erst im Alter von 10 Monaten eine reduzierte Nierenfunktion der *KO*-Mäuse beobachtet werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass sich ein *KO* von *GLEPPI* im Altersverlauf auch auf die Funktion der Niere auswirkt. Auch im Menschen konnte der Einfluss von *GLEPPI*-Mutationen auf die Nierenfunktion beobachtet werden, sogar bis hin zur Transplantationspflichtigkeit^{13,29}. Die Ergebnisse über die Folgen des *GLEPPI KO* im Mausmodell könnten die Wichtigkeit einer frühzeitigen diagnostischen Abklärung von Patienten mit idiopathischem nephrotischem Syndrom betonen. Diese Patienten könnten nach Diagnose frühzeitig mit entsprechenden Therapieschemata behandelt werden, um schwerwiegende Komplikationen einer Niereninsuffizienz abzuwenden, beziehungsweise den Prozess der Erkrankung zu verlangsamen oder sogar zu verhindern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich möglicher Signalwege von *GLEPPI* zeigten keine eindeutige Mitbeteiligung der untersuchten Komponenten. Ein genaueres Verständnis des Signalweges könnte es ermöglichen mit zielgerichteten Therapien das *Outcome* der Patienten zu verbessern. Weiterhin wären Untersuchungen von möglichen Kompensationsmechanismen interessant. Da im Mausmodell die Ausbildung der unreifen GBM erst nach 10 Monaten beobachtet werden konnte, besteht die Möglichkeit einer Kompensation der *GLEPPI*-Defizienz bis zu diesem Zeitpunkt über andere Signalwege. Die Kenntnis solcher Interaktionen zwischen den Signalwegen könnte ebenfalls eine zielgerichtete Therapiemöglichkeit darstellen, um die Auswirkungen von *GLEPPI*-Mutationen zu reduzieren.

7. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Floege, J. & Feehally, J. Introduction to Glomerular Disease: Clinical Presentations. in *Comprehensive clinical nephrology* (eds. Floege, J., Johnson, R. J. & Feehally, J.) 193–207 (Saunders/Elsevier, 2010).
2. Johnson, R. J., Floege, J. & Feehally, J. Introduction to Glomerular Disease: Histologic Classification and Pathogenesis. in *Comprehensive clinical nephrology* (eds. Floege, J., Johnson, R. J. & Feehally, J.) 208–217 (Saunders/Elsevier, 2010).
3. Eddy, A. A. & Symons, J. M. Nephrotic syndrome in childhood. *The lancet* **362**, 629–639 (2003).
4. Braden, G. L. *et al.* Changing incidence of glomerular diseases in adults. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **35**, 878–883 (2000).
5. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Inter Suppl* **2013** 1–150 (2013).
6. Eknoyan, G. *et al.* The burden of kidney disease: improving global outcomes. *Kidney Int.* **66**, 1310–1314 (2004).
7. Bruck, K. *et al.* CKD Prevalence Varies across the European General Population. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2015). doi:10.1681/ASN.2015050542
8. Girndt, M., Trocchi, P., Scheidt-Nave, C., Markau, S. & Stang, A. The Prevalence of Renal Failure. *Dtsch. Ärztebl. Int.* **113**, 85–91 (2016).
9. Potthoff, F., Berendes, A., Weber, W. & Münscher, C. Zusammenfassender Jahresbericht Dialyse 2014, i.A. des gemeinsamen Bundesausschusses. (2015).
10. DSO. Organspende und Transplantation in Deutschland Jahresbericht 2016, Zugriff: 19.06.2017. (2016).
11. Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. A report of the International Study of Kidney Disease in Children. *Kidney Int.* **13**, 159–165 (1978).
12. Hinkes, B. G. *et al.* Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2). *Pediatrics* **119**, e907-919 (2007).
13. Trautmann, A. *et al.* Spectrum of steroid-resistant and congenital nephrotic syndrome in children: the PodoNet registry cohort. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **10**, 592–600 (2015).
14. McKinney, P. A., Feltbower, R. G., Brocklebank, J. T. & Fitzpatrick, M. M. Time trends and ethnic patterns of childhood nephrotic syndrome in Yorkshire, UK. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* **16**, 1040–1044 (2001).
15. Mekahli, D. *et al.* Long-term outcome of idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome: a multicenter study. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* **24**, 1525–1532 (2009).
16. Bonilla-Felix, M. *et al.* Changing patterns in the histopathology of idiopathic nephrotic syndrome in children. *Kidney Int.* **55**, 1885–1890 (1999).
17. Filler, G. *et al.* Is there really an increase in non-minimal change nephrotic syndrome in children? *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **42**, 1107–1113 (2003).
18. Banaszak, B. & Banaszak, P. The increasing incidence of initial steroid resistance in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* **27**, 927–932 (2012).
19. Shah, S. S. H., Akhtar, N., Sunbleen, F., ur Rehman, M. F. & Ahmed, T. HISTOPATHOLOGICAL PATTERNS IN PAEDIATRIC IDIOPATHIC STEROID RESISTANT NEPHROTIC SYNDROME. *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad JAMC* **27**, 633–636 (2015).
20. Özlü, S. G. *et al.* Long-term prognosis of idiopathic nephrotic syndrome in children. *Ren. Fail.* **37**, 672–677 (2015).

21. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerulonephritis Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. *Kidney Inter Suppl* 2012 139–274 (2012). doi:10.1007/s11560-013-0754-z
22. Gulati, S. *et al.* Steroid resistant nephrotic syndrome: role of histopathology. *Indian Pediatr.* **43**, 55–60 (2006).
23. Dinçel, N., Yılmaz, E., Kaplan Bulut, İ., Hacıkara, Ş. & Mir, S. The long-term outlook to final outcome and steroid treatment results in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Ren. Fail.* **37**, 1267–1272 (2015).
24. Kim, J. S. *et al.* High incidence of initial and late steroid resistance in childhood nephrotic syndrome. *Kidney Int.* **68**, 1275–1281 (2005).
25. Ruggenti, P., Schieppati, A. & Remuzzi, G. Progression, remission, regression of chronic renal diseases. *Lancet Lond. Engl.* **357**, 1601–1608 (2001).
26. Schärer, K., Essigmann, H. C. & Schaefer, F. Body growth of children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* **13**, 828–834 (1999).
27. Beins, N. T. & Dell, K. M. Long-Term Outcomes in Children with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome Treated with Calcineurin Inhibitors. *Front. Pediatr.* **3**, (2015).
28. Santin, S. *et al.* Clinical Utility of Genetic Testing in Children and Adults with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **6**, 1139–1148 (2011).
29. Ozaltın, F. *et al.* Disruption of PTPRO Causes Childhood-Onset Nephrotic Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 139–147 (2011).
30. Kriz, W. & Elger, Marlies. Renal Anatomy. in *Comprehensive clinical nephrology* (eds. Floege, J., Johnson, R. J. & Feehally, J.) 3–14 (Saunders/Elsevier, 2010).
31. Keller, G., Zimmer, G., Mall, G., Ritz, E. & Amann, K. Nephron Number in Patients with Primary Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **348**, 101–108 (2003).
32. Samuel, T., Hoy, W. E., Douglas-Denton, R., Hughson, M. D. & Bertram, J. F. Applicability of the glomerular size distribution coefficient in assessing human glomerular volume: the Weibel and Gomez method revisited. *J. Anat.* **210**, 578–582 (2007).
33. Shirley, D. G. & Unwin, R. J. Renal Physiology. in *Comprehensive clinical nephrology* (eds. Floege, J., Johnson, R. J. & Feehally, J.) 15–28 (Saunders/Elsevier, 2010).
34. Miner, J. H. The Glomerular Basement Membrane. *Exp. Cell Res.* **318**, 973–978 (2012).
35. Timpl, R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur. J. Biochem. FEBS* **180**, 487–502 (1989).
36. Fox, J. W. *et al.* Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J.* **10**, 3137–3146 (1991).
37. Groffen, A. J. *et al.* Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **46**, 19–27 (1998).
38. Abrahamson, D. R. Role of the Podocyte (and Glomerular Endothelium) in Building the GBM. *Semin. Nephrol.* **32**, 342–349 (2012).
39. Miner, J. H. & Sanes, J. R. Collagen IV alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. *J. Cell Biol.* **127**, 879–891 (1994).
40. Abrahamson, D. R., Hudson, B. G., Stroganova, L., Borza, D.-B. & St. John, P. L. Cellular Origins of Type IV Collagen Networks in Developing Glomeruli. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1471–1479 (2009).
41. Suleiman, H. *et al.* Nanoscale protein architecture of the kidney glomerular basement membrane. *Elife* **2**, e01149 (2013).

42. Savige, J. Alport syndrome: its effects on the glomerular filtration barrier and implications for future treatment: Alport syndrome and the glomerular filtration barrier. *J. Physiol.* **592**, 4013–4023 (2014).
43. Miner, J. H. & Yurchenco, P. D. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 255–284 (2004).
44. Miner, J. H. Developmental biology of glomerular basement membrane components. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **7**, 13–19 (1998).
45. St John, P. L. & Abrahamson, D. R. Glomerular endothelial cells and podocytes jointly synthesize laminin-1 and -11 chains. *Kidney Int.* **60**, 1037–1046 (2001).
46. Shannon, M. B., Patton, B. L., Harvey, S. J. & Miner, J. H. A hypomorphic mutation in the mouse laminin alpha5 gene causes polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **17**, 1913–1922 (2006).
47. Miner, J. H. & Li, C. Defective glomerulogenesis in the absence of laminin alpha5 demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. *Dev. Biol.* **217**, 278–289 (2000).
48. Zenker, M. *et al.* Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2625–2632 (2004).
49. Steffes, M. W., Schmidt, D., McCreary, R., Basgen, J. M. & International Diabetic Nephropathy Study Group. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. *Kidney Int.* **59**, 2104–2113 (2001).
50. Pavenstadt, H., Kriz, W. & Kretzler, M. Cell Biology of the Glomerular Podocyte. *Physiol. Rev.* **83**, 253–307 (2003).
51. Wartiovaara, J. *et al.* Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J. Clin. Invest.* **114**, 1475–1483 (2004).
52. Kestilä, M. *et al.* Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell* **1**, 575–582 (1998).
53. Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).
54. Dedhar, S., Jewell, K., Rojiani, M. & Gray, V. The receptor for the basement membrane glycoprotein entactin is the integrin alpha 3/beta 1. *J. Biol. Chem.* **267**, 18908–18914 (1992).
55. Has, C. *et al.* Integrin $\alpha 3$ mutations with kidney, lung, and skin disease. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1508–1514 (2012).
56. Morgan, M. R., Humphries, M. J. & Bass, M. D. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 957–969 (2007).
57. Durbeej, M., Henry, M. D., Ferletta, M., Campbell, K. P. & Ekblom, P. Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **46**, 449–457 (1998).
58. Kriz, W. Progressive renal failure--inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **11**, 1738–1742 (1996).
59. Kriz, W., Shirato, I., Nagata, M., LeHir, M. & Lemley, K. V. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *AJP Ren. Physiol.* **304**, F333–F347 (2013).
60. George, B. *et al.* Crk1/2-dependent signaling is necessary for podocyte foot process spreading in mouse models of glomerular disease. *J. Clin. Invest.* **122**, 674–692 (2012).
61. Shirato, I., Sakai, T., Kimura, K., Tomino, Y. & Kriz, W. Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis. *Am. J. Pathol.* **148**, 1283–1296 (1996).

62. Smoyer, W. E., Mundel, P., Gupta, A. & Welsh, M. J. Podocyte alpha-actinin induction precedes foot process effacement in experimental nephrotic syndrome. *Am. J. Physiol.* **273**, F150-157 (1997).
63. Thomas, P. E. *et al.* GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit. *J. Biol. Chem.* **269**, 19953–19962 (1994).
64. Wang, R., St John, P. L., Kretzler, M., Wiggins, R. C. & Abrahamson, D. R. Molecular cloning, expression, and distribution of glomerular epithelial protein 1 in developing mouse kidney. *Kidney Int.* **57**, 1847–1859 (2000).
65. Wiggins, R. C., Wiggins, J. E., Goyal, M., Wharram, B. L. & Thomas, P. E. Molecular cloning of cDNAs encoding human GLEPP1, a membrane protein tyrosine phosphatase: characterization of the GLEPP1 protein distribution in human kidney and assignment of the GLEPP1 gene to human chromosome 12p12-p13. *Genomics* **27**, 174–181 (1995).
66. TAGAWA, M. *et al.* Identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in postmitotic maturing neurons: its structure and expression in the central nervous system. *Biochem J* **321**, 865–872 (1997).
67. Pixley, F. J., Lee, P. S., Dominguez, M. G., Einstein, D. B. & Stanley, E. R. A heteromorphous protein-tyrosine phosphatase, PTP ϕ , is regulated by CSF-1 in macrophages. *J. Biol. Chem.* **270**, 27339–27347 (1995).
68. Wharram, B. L. *et al.* Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptp^{ro})-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. *J. Clin. Invest.* **106**, 1281–1290 (2000).
69. Randles, M. J. *et al.* Three-dimensional electron microscopy reveals the evolution of glomerular barrier injury. *Sci. Rep.* **6**, 35068 (2016).
70. Charba, D. S. *et al.* Antibodies to protein tyrosine phosphatase receptor type O (PTP^{ro}) increase glomerular albumin permeability (Palb). *AJP Ren. Physiol.* **297**, F138–F144 (2009).
71. Yang, D. H. *et al.* Glomerular epithelial protein 1 and podocalyxin-like protein 1 in inflammatory glomerular disease (crescentic nephritis) in rabbit and man. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **74**, 571–584 (1996).
72. Kim, Y. H. *et al.* Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int.* **60**, 957–968 (2001).
73. Kim, Y. H. *et al.* GLEPP1 receptor tyrosine phosphatase (Ptp^{ro}) in rat PAN nephrosis. A marker of acute podocyte injury. *Nephron* **90**, 471–476 (2002).
74. Tian, J., Wang, H. P., Mao, Y. Y., Jin, J. & Chen, J. H. Reduced glomerular epithelial protein 1 expression and podocyte injury in immunoglobulin A nephropathy. *J. Int. Med. Res.* **35**, 338–345 (2007).
75. Sharif, K., Goyal, M., Kershaw, D., Kunkel, R. & Wiggins, R. Podocyte phenotypes as defined by expression and distribution of GLEPP1 in the developing glomerulus and in nephrotic glomeruli from MCD, CNF, and FSGS. A dedifferentiation hypothesis for the nephrotic syndrome. *Exp. Nephrol.* **6**, 234–244 (1998).
76. Hirakawa, M. *et al.* Expression of synaptopodin and GLEPP1 as markers of steroid responsiveness in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Life Sci.* **79**, 757–763 (2006).
77. Clement, L. C. *et al.* Early changes in gene expression that influence the course of primary glomerular disease. *Kidney Int.* **72**, 337–347 (2007).
78. Hou, J. *et al.* Estrogen-sensitive PTPRO expression represses hepatocellular carcinoma progression by control of STAT3. *Hepatol. Baltim. Md* **57**, 678–688 (2013).

79. Liu, Z. *et al.* Protein tyrosine phosphatase receptor type O expression in the tumor niche correlates with reduced tumor growth, angiogenesis, circulating tumor cells and metastasis of breast cancer. *Oncol. Rep.* (2015). doi:10.3892/or.2015.3772
80. Borza, D.-B. The NC1 Domain of Collagen IV Encodes a Novel Network Composed of the alpha 1, alpha 2, alpha 5, and alpha 6 Chains in Smooth Muscle Basement Membranes. *J. Biol. Chem.* **276**, 28532–28540 (2001).
81. Heidet, L. *et al.* A human-mouse chimera of the $\alpha 3 \alpha 4 \alpha 5$ (IV) collagen protomer rescues the renal phenotype in Col4a3^{-/-} Alport mice. *Am. J. Pathol.* **163**, 1633–1644 (2003).
82. Ninomiya, Y. *et al.* Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* **130**, 1219–1229 (1995).
83. Ettner, N., Göhring, W., Sasaki, T., Mann, K. & Timpl, R. The N-terminal globular domain of the laminin $\alpha 1$ chain binds to $\alpha 1 \beta 1$ and $\alpha 2 \beta 1$ integrins and to the heparan sulfate-containing domains of perlecan. *FEBS Lett.* **430**, 217–221 (1998).
84. Sellin, L. NEPH1 defines a novel family of podocin-interacting proteins. *FASEB J.* (2002). doi:10.1096/fj.02-0242fje
85. Wharram, B. L. *et al.* Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptpro)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. *J. Clin. Invest.* **106**, 1281 (2000).
86. Potthoff, S. A. *et al.* The glomerular proteome in a model of chronic kidney disease. *PROTEOMICS – Clin. Appl.* **2**, 1127–1139 (2008).
87. Lennon, R. *et al.* Global Analysis Reveals the Complexity of the Human Glomerular Extracellular Matrix. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 939–951 (2014).
88. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
89. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59–72 (1977).
90. Loyer, A., Scangos, G. A. & Ruddle, F. H. Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 422–426 (1982).
91. Miller, J. H. *Experiments in molecular genetics*. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1972).
92. Hampf, M. & Gossen, M. A protocol for combined Photinus and Renilla luciferase quantification compatible with protein assays. *Anal. Biochem.* **356**, 94–99 (2006).
93. McDougal, W. S. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *J. Urol.* **174**, 1024–1025 (2005).
94. Nilsson-Ehle, P. & Grubb, A. New markers for the determination of GFR: iohexol clearance and cystatin C serum concentration. *Kidney Int. Suppl.* **47**, S17-19 (1994).
95. Randles, M. J. *et al.* Three-dimensional electron microscopy reveals the evolution of glomerular barrier injury. *Sci. Rep.* **6**, 35068 (2016).
96. Smith, P. J., Wiltshire, M., Davies, S., Patterson, L. H. & Hoy, T. A novel cell permeant and far red-fluorescing DNA probe, DRAQ5, for blood cell discrimination by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **229**, 131–139 (1999).
97. Zhao, S., Gu, X., Groome, L. J. & Wang, Y. Decreased Nephlin and GLEPP-1, But Increased VEGF, Flt-1, and Nitrotyrosine, Expressions in Kidney Tissue Sections From Women With Preeclampsia. *Reprod. Sci.* **16**, 970–979 (2009).
98. Goyal, V. K. Changes with age in the human kidney. *Exp. Gerontol.* **17**, 321–331 (1982).

99. Lindeman, R. D., Tobin, J. & Shock, N. W. Longitudinal studies on the rate of decline in renal function with age. *J. Am. Geriatr. Soc.* **33**, 278–285 (1985).
100. Wiggins, J. E. Podocyte Hypertrophy, ‘Adaptation,’ and ‘Decompensation’ Associated with Glomerular Enlargement and Glomerulosclerosis in the Aging Rat: Prevention by Calorie Restriction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2953–2966 (2005).
101. Hodgin, J. B. *et al.* Glomerular Aging and Focal Global Glomerulosclerosis: A Podometric Perspective. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **26**, 3162–3178 (2015).
102. Hara, M., Yanagihara, T. & Kihara, I. Urinary podocytes in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron* **89**, 342–347 (2001).
103. Festing, M. F. W. & Blackmore, D. K. Life span of specified-pathogen-free (MRC category 4) mice and rats. *Lab. Anim.* **5**, 179–192 (1971).
104. Heidet, L. & Gubler, M.-C. The Renal Lesions of Alport Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1210–1215 (2009).
105. Ziyadeh, F. N. The extracellular matrix in diabetic nephropathy. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **22**, 736–744 (1993).
106. Gross, O. *et al.* DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria. *Kidney Int.* **66**, 102–111 (2004).
107. Rubel, D. *et al.* Collagen receptors integrin alpha2beta1 and discoidin domain receptor 1 regulate maturation of the glomerular basement membrane and loss of integrin alpha2beta1 delays kidney fibrosis in COL4A3 knockout mice. *Matrix Biol.* **34**, 13–21 (2014).
108. Steenhard, B. M. *et al.* Deletion of Von Hippel-Lindau in Glomerular Podocytes Results in Glomerular Basement Membrane Thickening, Ectopic Subepithelial Deposition of Collagen $\alpha 1 \alpha 2 \alpha 1(IV)$, Expression of Neuroglobin, and Proteinuria. *Am. J. Pathol.* **177**, 84–96 (2010).
109. Girgert, R. *et al.* Integrin 2-deficient mice provide insights into specific functions of collagen receptors in the kidney. *Fibrogenesis Tissue Repair* **3**, 19 (2010).
110. Barker, D. F. *et al.* Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* **248**, 1224–1227 (1990).
111. Jefferson, J. A. *et al.* Autosomal dominant Alport syndrome linked to the type IV collage alpha 3 and alpha 4 genes (COL4A3 and COL4A4). *Nephrol. Dial. Transplant.* **12**, 1595–1599 (1997).
112. Zhou, J. & Reeders, S. T. The alpha chains of type IV collagen. *Contrib. Nephrol.* **117**, 80–104 (1996).
113. Hudson, B. G. The Molecular Basis of Goodpasture and Alport Syndromes: Beacons for the Discovery of the Collagen IV Family. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 2514–2527 (2004).
114. Vogel, W., Gish, G. D., Alves, F. & Pawson, T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol. Cell* **1**, 13–23 (1997).
115. Borza, C. M. *et al.* Inhibition of Integrin 2 1 Ameliorates Glomerular Injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 1027–1038 (2012).
116. Ninomiya, Y. *et al.* Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* **130**, 1219–1229 (1995).
117. Gunwar, S. *et al.* Glomerular basement membrane. Identification of a novel disulfide-cross-linked network of alpha3, alpha4, and alpha5 chains of type IV collagen and its implications for the pathogenesis of Alport syndrome. *J. Biol. Chem.* **273**, 8767–8775 (1998).
118. Byron, A. *et al.* Glomerular Cell Cross-Talk Influences Composition and Assembly of Extracellular Matrix. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 953–966 (2014).

119. Siddiqi, F. S. & Advani, A. Endothelial-Podocyte Crosstalk: The Missing Link Between Endothelial Dysfunction and Albuminuria in Diabetes. *Diabetes* **62**, 3647–3655 (2013).
120. Sison, K. *et al.* Glomerular Structure and Function Require Paracrine, Not Autocrine, VEGF-VEGFR-2 Signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1691–1701 (2010).
121. Eremina, V. Vascular Endothelial Growth Factor A Signaling in the Podocyte-Endothelial Compartment Is Required for Mesangial Cell Migration and Survival. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 724–735 (2006).
122. Abrahamson, D. R. *et al.* Laminin Compensation in Collagen 3(IV) Knockout (Alport) Glomeruli Contributes to Permeability Defects. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 2465–2472 (2007).
123. Wang, C.-Z., Su, H.-W., Hsu, Y.-C., Shen, M.-R. & Tang, M.-J. A Discoidin Domain Receptor 1/SHP-2 Signaling Complex Inhibits $\alpha 2 \beta 1$ -Integrin-mediated Signal Transducers and Activators of Transcription 1/3 Activation and Cell Migration. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2839–2852 (2006).
124. Jiang, R. *et al.* Survival and Inflammation Promotion Effect of PTPRO in Fulminant Hepatitis Is Associated with NF- κ B Activation. *J. Immunol.* **193**, 5161–5170 (2014).
125. Das, S. Discoidin Domain Receptor 1 Receptor Tyrosine Kinase Induces Cyclooxygenase-2 and Promotes Chemoresistance through Nuclear Factor- κ B Pathway Activation. *Cancer Res.* **66**, 8123–8130 (2006).
126. Whitmarsh, A. J. & Davis, R. J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **74**, 589–607 (1996).
127. El Azreq, M.-A. *et al.* Discoidin domain receptor 1 promotes Th17 cell migration by activating the RhoA/ROCK/MAPK/ERK signaling pathway. *matrix* **3**, 4 (2016).
128. Leitinger, B. Discoidin Domain Receptor Functions in Physiological and Pathological Conditions. in *International Review of Cell and Molecular Biology* **310**, 39–87 (Elsevier, 2014).
129. Linehan, W. M., Rubin, J. S. & Bottaro, D. P. VHL loss of function and its impact on oncogenic signaling networks in clear cell renal cell carcinoma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 753–756 (2009).
130. Chen, S.-R. *et al.* The Wilms Tumor Gene, Wt1, Maintains Testicular Cord Integrity by Regulating the Expression of Col4a1 and Col4a2. *Biol. Reprod.* **88**, 56–56 (2013).

8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Lars Christian Rump für die Möglichkeit, die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit in der Experimentellen Nephrologie Düsseldorf durchzuführen.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Lorenz Sellin für die freundliche Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit und seine Unterstützung bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Eva Königshausen für die exzellente Betreuung, Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und Ihre ansteckende Begeisterung für die experimentelle Nephrologie.

Ein großer Dank gilt Frau PD Dr. med. Catherine Meyer-Schwesinger (UK Hamburg-Eppendorf), Frau Dr. Rachel Lennon (University of Manchester), Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Wiech (UK Hamburg-Eppendorf) und Herrn Prof. Dr. med. Donscho Kerjaschki (Medizinische Universität Wien) für die Kooperationen, die zu wichtigen Erkenntnissen in dieser Arbeit führten.

Ohne die detailgenaue Einarbeitung, wertvolle Unterstützung und andauernde Hilfsbereitschaft im Labor von Frau Blanka Duvnjak, Frau Nicola Kuhr, Frau Christina Schwandt und Herrn Dipl.-Biol. Raphael Haase wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen – Danke für Eure Zeit!

Ich bedanke mich bei meinem Laborpartner Herrn Julius Hoffacker, der mich auch in den frühesten Morgenstunden zu motivieren wusste. Ebenfalls bedanke ich mich bei Frau Laura Lennartz, ohne deren Vorarbeit und Einarbeitung mir der Start in das Projekt nicht so leicht gefallen wäre. Ebenfalls ein großes Dankeschön gilt dem gesamten restlichen Team der Experimentellen Nephrologie Düsseldorf, die mich im Rahmen dieser Arbeit unterstützten.

Ohne die Ablenkung in schwierigen Phasen dieser Arbeit und offene Ohren in allen Lebenslagen von Herrn Thorsten Baumann, Herrn Julius Gilles, Herrn Moritz Rommelmann und Herrn Philip Schüppler wäre ich sicher das ein oder andere Mal verzweifelt – Ich bin stolz Euch als Freunde haben!

Ich danke Frau Julia Katharina Anke für den Rückhalt in schwierigen Zeiten, das Verständnis für viele Stunden im Labor, erholsame Urlaube und andere Blickwinkel – Du hast mir viel Kraft gegeben!

Danke an meine Großeltern, die die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr miterleben konnten – Ich hoffe, dass Ihr stolz seid!

Der größte Dank gilt meinen Eltern Christa und Dieter Weigel, die mich mit ihrer Liebe und grenzenlosen Unterstützung auf den richtigen Weg durch mein Leben gebracht haben – Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.