

**Quantifizierung der Endozytose
des Schlitzmembranproteins Nephrin bei
proteinurischen Nierenerkrankungen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Raphael Haase

aus Viersen

Düsseldorf, März 2018

aus dem Institut für Experimentelle Nephrologie
des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. med. Ivo Quack
2. Prof. Dr. William F. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 08. November 2018

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Haase R, Potthoff SA, Meyer-Schwesinger C, Frosch C, Wiech T, Panzer U, et al. (2017) A novel *in vivo* method to quantify slit diaphragm protein abundance in murine proteinuric kidney disease. PLoS ONE 12(6): e0179217.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179217>

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt unterschiedlicher nephrologischer Krankheitsmodelle auf die Funktion und Struktur der glomerulären Schlitzmembran untersucht. Um das Spektrum der Nierenerkrankungen abzudecken, dienten die Doxorubicin-induzierte Nephropathie, die serum-vermittelte Nephrotoxische Nephritis und die durch Streptozotocin verursachte Hyperglykämie als Beispiele. Das Hauptaugenmerk galt dabei Nephrin, einem Transmembranprotein, welches maßgeblich an der Ausbildung und der Funktion der glomerulären Schlitzmembran beteiligt ist.

Durch Anwendung einer in unserer Arbeitsgruppe etablierten Methode konnte gezeigt werden, dass die im Verlauf der Krankheitsmodelle entstehende Proteinurie mit dem Verlust von Nephrin aus der Schlitzmembran einhergeht. Histologisch führt dies zu einer Störung des linearen Nephrin-Verteilungsmusters. An dem Rückgang des membranständigen Nephrins sind endozytische Prozesse beteiligt. Immunhistologische Untersuchungen, welche in Kooperation mit Frau Prof. Dr. med. Meyer-Schwesinger (UKE Hamburg) gemacht wurden, konnten dies demonstrieren. Dies verdeutlicht die entscheidende Bedeutung von Nephrin für die Integrität der Schlitzmembran und die Rolle bei der Entstehung einer Proteinurie. Im Modell der ADR-Nephropathie ist weitergehend ein deutlicher Verlust von Podozyten messbar. Auch im Verlauf der Nephrotoxischen Nephritis ist ein Rückgang von Podozyten messbar, wobei die glomeruläre Schädigung jedoch bis zu Tag 18 in gewissem Maße kompensiert werden kann.

Weitergehend wurde die Rolle der MAP-Kinase p38 bei der podozytären Signaltransduktion der Nephrin Endozytose untersucht. Dabei konnte im langfristigen Verlauf einer STZ-induzierten Hyperglykämie kein protektiver Charakter eines podozytären p38 α -Knockout verzeichnet werden. Einzig unmittelbar nach dem initialen Anstieg des Blutzuckerspiegels zeigte die Knockoutgruppe eine schwach signifikant reduzierte Proteinurie. Zudem konnte ein signifikanter Rückgang der Hyperglykämie-induzierten p38-Phosphorylierung durch den Knockout erzielt werden. Die erhoffte protektive Wirkung auf das Membranprotein Nephrin konnte jedoch nicht bestätigt werden. Dies ist möglicherweise auf den nicht vollständigen podozytenspezifischen p38 α -Knockout oder die verhältnismäßig schwache Schädigung des glomerulären Filters zurückzuführen.

Festzuhalten bleibt, dass Nephrin in Situationen mit vermehrtem zellulärem Stress vom Podozyten endozytiert wird, bevor der Podozyt selbst abstirbt. Ein Wiedereinbau von endozytiertem Nephrin scheint möglich und erste Anhaltspunkte bestehen für einen verstärkten Einbau nach dem Verlust benachbarter Podozyten. Weiterhin scheint p38, vor allem die Isoform p38 α , eine Rolle bei der zugrundeliegenden Signaltransduktion zu spielen.

Summary

In this doctoral thesis the effect of different nephrological diseases on the function and structure of the glomerular slit diaphragm had been investigated. Therefore, three different disease models (doxorubicin-induced nephropathy, serum-induced nephrotoxic nephritis and streptozotocin-induced hyperglycaemia) were used. The main focus was on nephrin, a transmembrane protein, which plays a key role in maintaining the function of the glomerular filter.

By using a novel method, which was established in our Workgroup, we showed that proteinuria is caused by the loss of nephrin from the slit diaphragm. The histologic examination showed a disrupted nephrin expression pattern in glomeruli of treated mice. Collaborative work with Miss Prof. Dr. med. Meyer-Schwesinger (UKE Hamburg) showed that endocytic processes are involved within the loss of nephrin from the slit diaphragm. Therefore, we can conclude that nephrin plays a key role in maintaining the function of the slit diaphragm while a loss of nephrin causes proteinuria. During the early phase of ADR-nephropathy there is also a significant loss of nephrin occurring. In the model of nephrotoxic nephritis a lighter loss of nephrin is also measured which is partly compensated until day 18.

In addition to this study the role of MAP-kinase p38 as a potential member of the endocytic signal pathway has been investigated. No protective effect on proteinuria could be found when p38 α was knocked out in podocytes on day 21. Only short term effects could be observed directly after blood glucose levels increased. At this time point proteinuria was significantly decreased, whereas p38-phosphorylation was decreased in the p38 α -knockout group. Although this observation affirmed our theory, no protective effect on nephrin could be observed. Maybe this is due to the mild nature of the model.

It should be noted that nephrin endocytosis occurs under cellular stress. Maybe this could be some kind of podocyte protection in the early stages of damage. Also a new integration of nephrin after endocytosis seems to be possible. While a simple knockout of p38 α in the podocyte gives not the expected protection it nevertheless is involved in the intracellular signal transduction during podocyte stress and nephrin endocytosis.

Abkürzungsverzeichnis

°

°C · Grad Celsius

μ

μg · Mikrogramm

μl · Mikroliter

μm · Mikrometer

3

3T3-L1 · 3T3-L1 Zelllinie

A

ADR · Adriamycin (Handelsname des Wirkstoffes Doxorubicin)

anti-GBM Serum · Serum aus Schafen, das vor allem Antikörper gegen die Bestandteile der glomerulären Basalmembran enthält

ATP · Adenosintriphosphat

C

CaCl₂ · Calciumchlorid

CHAPS · 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat

CuSO₄ · Kupfersulfat

D

dest. · destilliert

DKFZ · Deutsches Krebsforschungszentrum

dl · Deziliter

DMSO · Dimethylsulfoxid

DTT · Dithiothreitol

E

ECL · enhanced chemiluminescent

EDTA · Ethylendiamintetraessigsäure, Ethylendiamintetraessigsäure

F

FBS · Fetales Kälberserum

G

gKG · Gramm Körpergewicht, gramm Körpergewicht

H

H₂O₂ · Wasserstoffperoxid

I

i.p. · intraperitoneal

i.v. · intravenös

IP · Immunpräzipitation

ITS · Insulin-Transferrin-Selenium

K

KCl · Kaliumchlorid

kDa · Kilodalton

KH₂PO₄ · Kaliumdihydrogenphosphat

M

M · molar[mol/l] , Molar [mol/l]

MAPK · *mitogen-aktivierte Proteinkinase*
MAP-Kinase · *Mitogen-aktivierte Protein-
Kinasen*
mg · *Milligramm*
ml · *Milliliter*
mM · *millimolar, Millimolar [mmol/l]*

N

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ · *Dinatriumhydrogenphosphat
Heptahydrat*
 Na_3VO_4 · *Natriumorthovanadat,
Natriumorthovanadat*
 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ · *tetra-Natriumdiphosphat
Decahydrat*
NaCl · *Natriumchlorid, Natriumchlorid*
NaF · *Natriumfluorid*
NCP · *Natrium-Citratpuffer*
nm · *Nanometer*

P

$\text{p38}\alpha^{\text{fl/fl}}$ · *C57Bl/6 Maus mit gefloxtem p38 α -
Gen*
 $\text{p38}\alpha^{\text{PodKO}}$ · *C57Bl/6 Maus mit p38 α
Knockout, podozyten-spezifische p38 α
knockout Maus*

PA-Gele · *Polyacrylamid-Gele*
PBS · *Phosphatgepufferte Salzlösung*
PCR · *Polymerase-Kettenreaktion
(polymerase chain reaction)*
PMSF · *Phenylmethylsulfonylfluorid*

S

SDS · *Natriumdodecylsulfat*
SPF · *spezifisch pathogen-frei*
STZ · *Streptozotocin*

T

TAE · *TRIS-Acetat-EDTA*
TBST · *Tris-buffered saline mit Tween20*
Tris · *Tris-aminomethan*
Tris-HCl · *Tris - Hydrochlorid*

U

UACR · *Urine Albumin-to-Creatinine Ratio*

X

xg · *relative Zentrifugalbeschleunigung*

Inhaltverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	V
SUMMARY	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
INHALTVERZEICHNIS	IX
EINLEITUNG	1
1. ALLGEMEIN	1
2. DIE SCHLITZMEMBRAN	2
3. FUNKTION DES SCHLITZMEMBRANPROTEINS NEPHRIN	6
4. FUNKTION DER MAPK p38	9
5. <i>IN VIVO</i> – MODELLE	11
5.1. DOXORUBICIN-NEPHROPATHIE	12
5.2. NEPHROTOXISCHE GLOMERULONEPHRITIS	12
5.3. HYPERGLYKÄMIE INDUZIERTER NIERENSCHÄDIGUNG	13
6. PODOZYTENSPEZIFISCHE p38 α -KO MAUS	14
ZIELE DER ARBEIT	16
MATERIAL	17
1. PUFFER UND LÖSUNGEN	17
2. GERÄTE	19
3. MATERIAL	20
METHODEN	23
1. TIERZUCHT UND TIERHALTUNG	23
2. <i>IN VIVO</i> – MODELLE	24
2.1. DOXORUBICIN-NEPHROPATHIE	24
2.2. NEPHROTOXISCHE NEPHRITIS	24
2.3. STREPTOZOTOCIN-DIABETES	24
3. PERFUSION UND ORGANENTNAHME	25

4. PRIMÄRKULTUR	26
4.1. PASSAGIEREN	27
4.2. ERNTE	27
5. BIOTINYLIERUNGSASSAY	28
6. PROTEINANALYSE	30
6.1. MESSUNG DER PROTEINKONZENTRATION	30
6.2. IMMUNPRÄZIPITATION	31
6.3. SDS-PAGE	31
6.3.1 SDS-Polyacrylamid Gele gießen	31
6.3.2 Probenvorbereitung	32
6.3.3 Gele laden	32
6.3.4 Elektrophorese	32
6.4. WESTERN BLOT	33
6.5. IMMUNFÄRBUNG	33
6.6. PROTEINDETEKTION	33
6.7. QUANTIFIZIERUNG	33
7. NUKLEINSÄUREN	34
7.1. DNA-ISOLIERUNG AUS RLT-PROBEN	34
7.2. RNA-ISOLIERUNG AUS RLT-PROBEN UND GENERIERUNG VON CDNA	35
7.3. DNA-ISOLIERUNG AUS MAUSSCHWANZSPITZEN	36
7.4. GENOTYPISIERUNG	36
8. URIN – ANALYSE	38
8.1. VORBEREITUNG	38
8.2. PROBENGEWINNUNG	38
8.3. PROBENVORBEREITUNG	39
8.4. GELELEKTROPHORESE UND COOMASSIE – FÄRBUNG	39
8.5. ALBUMIN- UND KREATININBESTIMMUNG	40
9. IMMUNHISTOLOGIE	40
10. GRAPHISCHE UND STATISTISCHE AUSWERTUNG	42
ERGEBNISSE	42
<hr/>	
1. ÜBERPRÜFUNG DES BIOTINYLIERUNGSASSAYS	42
2. DOXORUBICIN-NEPHROPATHIE	44
3. NEPHROTOXISCHE NEPHRITIS	49
4. STREPTOZOTOCIN INDUZIERTER DIABETES MELLITUS	55
4.1. EINFLUSS DER INDUZIERTEN HYPERGLYKÄMIE AUF DIE NIERENFUNKTION	56
5. ISOLATION DER PRIMÄRPODOZYTEN	57

6. NACHWEIS DES PODOZYTENSPEZIFISCHEN P38α-KNOCKOUTS	58
7. EINFLUSS DES PODOZYTENSPEZIFISCHEN P38α-KNOCKOUT AUF DIE DIABETES-VERMITTELTE NIERENSCHÄDIGUNG	61
7.1. UNTERSUCHUNG AN TAG 4	61
7.2. UNTERSUCHUNG AN TAG 11	64
7.3. UNTERSUCHUNG AN TAG 21	66
<u>DISKUSSION</u>	68
DOXORUBICIN-NEPHROPATHIE	70
NEPHROTOXISCHE NEPHRITIS	71
STREPTOZOTOCIN-DIABETES	72
EINFLUSS DES PODOZYTENSPEZIFISCHEN P38α-KNOCKOUTS AUF DIE HYPERGLYKÄMIE-VERMITTELTE NIERENSCHÄDIGUNG	73
<u>LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS</u>	81
<u>DANKSAGUNG</u>	88
<u>EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG</u>	89
<u>ANHANG</u>	90
BILDRECHTE FÜR VERWENDETE ABBILDUNGEN	90

Einleitung

1. Allgemein

Exkretionsorgane spielen eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase bei dem Großteil aller Lebewesen. Bereits bei Kleinstlebewesen, wie zum Beispiel den Plattwürmern, dienen die sogenannten Protonephridien der Separation und Ausscheidung von überschüssigen Salzen oder Wasser (siehe *Abbildung 1 A*). Dabei wird die gesamte Gewebsflüssigkeit filtriert. Diese Grundfunktion stellt die Basis des Lebens an Land, aber auch in hypo- und hyperosmotischen Gewässern dar. Während sich die Funktionen dieser Systeme bei einfachen Lebewesen auf die bereits benannten weitgehend beschränkt, übernehmen sie bei weiter entwickelten Lebewesen immer mehr Funktionen.

Bei Säugetieren übernimmt die Niere ebenfalls die Rolle der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts. Zusätzlich erfüllt sie entscheidende Aufgaben bei der Regulation des Blutdrucks, der Hormonproduktion, der Regulation des Säure- und Basenhaushalts und der Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten. Dazu filtriert sie bei einem erwachsenen Menschen täglich circa 1500 l Blut und bildet selber 180 l Primärharn, welcher nach weiterer Prozessierung im Tubulussystem letztendlich als 2 - 3 l Endharn ausgeschieden wird (*Purves 2006*). Verantwortlich dafür ist ein hochkomplexes System aus funktionellen Einheiten (*Abbildung 1 C*), die für die Filtration, Rückresorption und Sekretion zuständig sind. Dadurch ist gewährleistet, dass situativ eine optimierte Menge an Wasser, Ionen und harnpflichtigen Substanzen ausgeschieden werden kann.

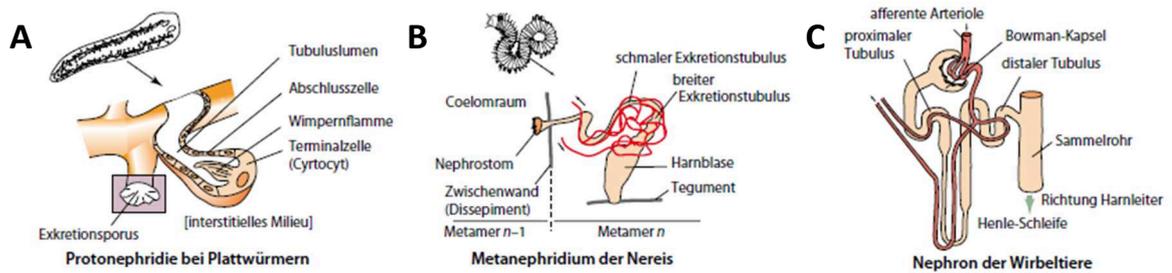


Abbildung 1: Übersicht unterschiedlich entwickelter Exkretionssysteme

A) Einfaches Exkretionssystem bei Plattwürmern Durch die Bewegung der Wimpernflamme wird ein Unterdruck erzeugt, der ein Nachströmen von Coelomflüssigkeit durch den Filter bewirkt. Nachdem der Primärharn das Tubuluslumen passiert hat, erfolgt die Ausscheidung über einen Exkretionsporus.

B) Metanephridien beim Regenwurm Entgegen des Funktionsprinzips bei Protonephridien, wird die Filtration durch den Überdruck des Blutgefäßsystems angetrieben. **C) Nephron der Wirbeltiere** Komplexes System aus Filtrations- und Rückresorptionsapparat. Wie bei den Metanephridien wird der Primärharn per Überdruckfiltration gebildet. Im Tubulussystem und der Henle-Schleife erfolgen Resorption und Sezernierung verschiedenster Stoffe, bevor der Sekundärharn in die Harnblase abfließt. (Quelle: *Richard, Chevalet et al. (2013)*)

2. Die Schlitzmembran

Der entscheidende Filtrationsschritt, welcher zu Beginn der Harnprozessierung steht, erfolgt direkt in den Glomeruli im Nierenkortex (siehe *Abbildung 2 A*). Dort, wo der Kontakt zwischen den blutführenden Arteriolen und der Bowman-Kapsel besteht (siehe *Abbildung 2 B*), muss sichergestellt sein, dass essentielle Blutbestandteile im Blut zurückgehalten werden. Dies geschieht über einen hochselektiven, hydrostatischen Filter aus fenestriertem Kapillarendothel, glomerulärer Basalmembran und Podozyten (vergleiche *Abbildung 2 C*). Besonders wichtig ist diese Filtrationsbarriere für Proteine, die anhand ihrer Molekülmasse, Ladung und Form selektiert werden. Lediglich Bestandteile die kleiner sind als Albumin mit einer Molekülmasse von weniger als 69 kDa, werden frei filtriert und müssen gegebenenfalls nachfolgend im tubulären System wieder resorbiert werden (*Gekle 2005*). Podozyten sitzen als Teil des glomerulären Filters außen auf der Glomerulären Basalmembran und bilden damit die viszerale Abgrenzung zum Bowmannschen Raum. Dieser fängt das Filtrat auf, bevor es über den proximalen Tubulus abgeleitet wird.

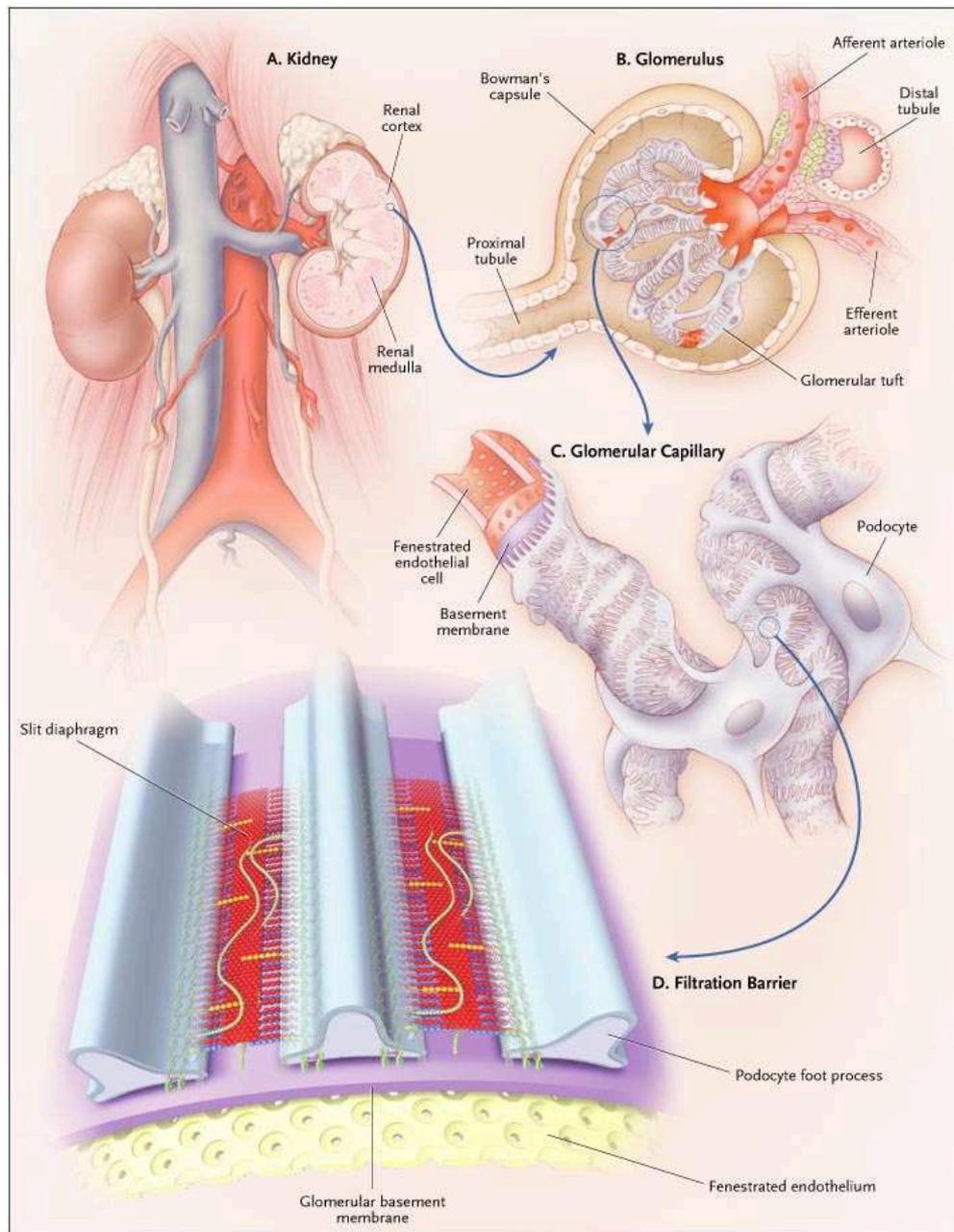


Abbildung 2: Aufbau der Niere und ihrer molekularen Strukturen

A. Niere Lage der Niere und Unterteilung in Kortex und Medulla. **B. Glomerulum** Im Glomerulum findet der entscheidende Filtrationsschritt statt. Über die Ateriolen fließt das Blut an und ab. Der Primärharn sammelt sich in der Bowmannschen Kapsel und fließt über den Proximalen Tubulus ab. **C. Glomeruläre Kapillare** Auf zellulärer Ebene ist der geschichtete Aufbau zu erkennen. Die Fußfortsätze der Podozyten umschlingen in einem engmaschigen Netz das fenestrierte Endothel der Kapillaren. Dazwischen ist die Glomeruläre Basalmembran ausgebildet. **D. Filtrationsbarriere** Zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten verhindert die reißverschluss-ähnliche Schlitzmembran einen ungewollten Verlust größerer Blutbestandteile. (Reproduced with permission from *Tryggvason, Patrakka et al. (2006)*, Copyright Massachusetts Medical Society.)

Der podozytäre Filter bildet nach dem Endothel und der Basalmembran die letzte Filtrationseinheit und besteht aus den einzelnen Fußfortsätzen der Podozyten. Diese Fußfortsätze sind untereinander eng verzahnt und formen so ein flächendeckendes Filtrationsnetz (siehe *Abbildung 3*).

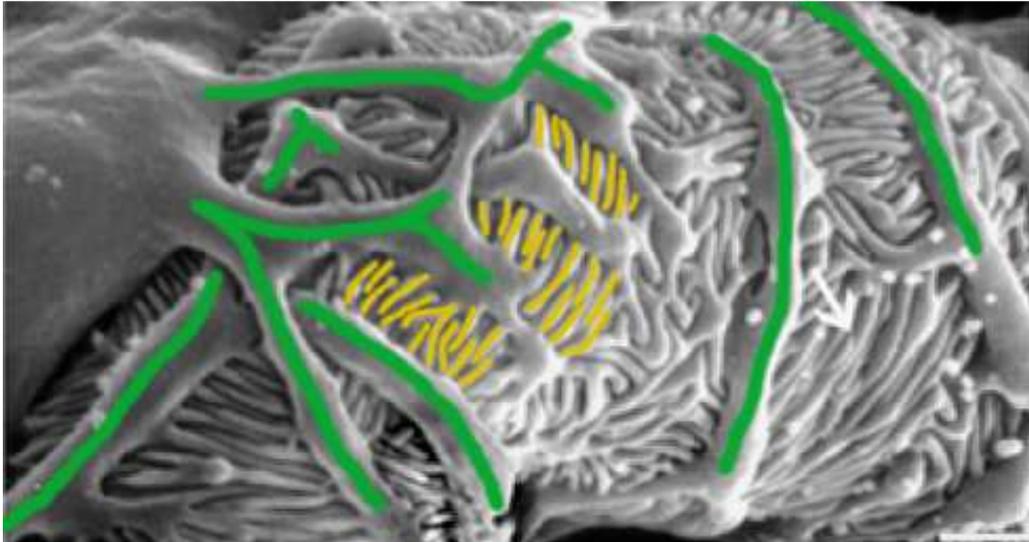


Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme podozytärer Fußfortsätze

Podozytäre Fußfortsätze mehrerer Podozyten umschließen ein Kapillargefäß. Erkennbar sind die primären (beispielhaft grün hervorgehoben) und sekundären (beispielhaft gelb hervorgehoben) Fußfortsätze, die untereinander verzweigt sind. Zwischen den sekundären Fußfortsätzen verschiedener Podozyten befinden sich die Schlitzmembranen. (Abbildung verändert nach *Kriz und Lemley (2015)*)

Während der Zellkörper des Podozyten frei im Kapselraum schwimmt, erstrecken sich die primären Fußfortsätze (siehe *Abbildung 3*, grün) sternförmig entlang der Basalmembran und umspannen so die Kapillaren. Von diesen primären Fußfortsätzen wiederum verzweigen sich die abgehenden sekundären Fußfortsätze unterschiedlicher Podozyten zu einem dichten Netzwerk (siehe *Abbildung 3*, gelb). Sie bilden die äußere zum Kapselraum gerichtete Barriere des glomerulären Filters. Zwischen ihnen erstreckt sich eine einzigartige Struktur (siehe *Abbildung 4*), die sowohl als Bestandteil des glomerulären Filters fungiert, aber auch eine entscheidende Rolle bei der Signalübertragung zwischen den Podozyten einnimmt (*Huber und Benzing 2005*). An der Ausbildung dieser glomerulären Schlitzmembran sind neben Nephrin weitere verschiedene, teilweise exklusiv im Podozyten vorkommende Proteine beteiligt.

Erstmals wurde die Schlitzmembran von *Rodewald und Karnovsky (1974)* beschrieben. Sie ist ein Komplex aus verschiedenen transmembranären Proteinen und weist einen Durchmesser von 30 – 40 nm auf (*Rodewald und Karnovsky 1974*). Während Wasser und kleinste gelöste Teilchen diese Barriere passieren können, werden größere Proteine zurückgehalten (*Pavenstadt, Kriz et al. 2003*). Unregelmäßigkeiten in der

Struktur des glomerulären Filters oder gar ein Fehlen bestimmter Schlitzmembranproteine führen zwangsläufig pathophysiologisch zu einer erhöhten Proteinurie, also der vermehrten Ausscheidung von Proteinen im Urin. Im Weiteren kommt es zum Verlust von Podozyten und somit zum funktionellen Ausfall von Glomeruli. Ebenso können Veränderungen im Podozyten, den glomerulären Epithelzellen und den Mesangialzellen zum Verlust der Filtrationsbarriere führen (Pavenstadt, Kriz et al. 2003). Zwar ist die Anzahl an Filtrationseinheiten in der Regel bei Säugetieren überdimensioniert für die Filtrationsaufgaben, da ausdifferenzierte Podozyten sich jedoch nicht mehr teilen können, kann ein Verlust von Podozyten auf Dauer zu einem vollständigen Verlust der Nierenfunktion führen (Kriz, Gretz et al. 1998).

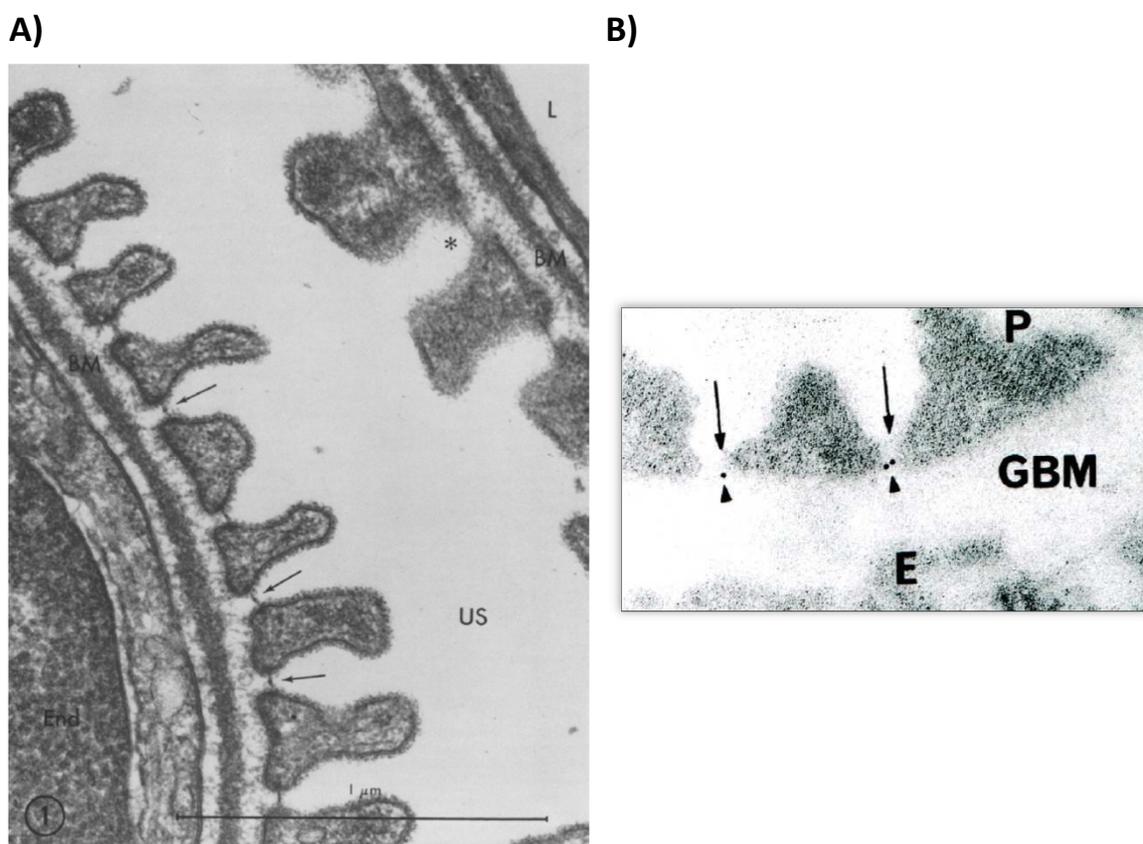


Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme des glomerulären Filters

A) Glomerulärer Filter Abgebildet ist ein Ausschnitt des glomerulären Filters aus murinem Nierengewebe. Zu erkennen sind das Endothel (End), die Glomeruläre Basalmembran (BM), die podozytären Fußfortsätze, sowie die Schlitzmembranen (schwarze Pfeile). Der Filtrationsstrom verläuft vom Endothel zwischen den Fußfortsätzen hindurch, welche auf der Basalmembran aufsitzen. (Quelle: Rodewald und Karnovsky (1974))

B) Schlitzmembran Elektronenmikroskopische Aufnahme des glomerulären Filters nach Immunogold-Färbung mittels anti-Nephrin Antikörper. Im Querschnitt sind das Endothel (E), die glomeruläre Basalmembran (GBM), sowie die podozytären Fußfortsätze hervorgehoben. In den Zwischenräumen der Fußfortsätze (P) sind Nephrin-positive Strukturen anhand von Immunogoldpartikeln erkennbar (Pfeile). (Quelle: Tryggvason (1999))

3. Funktion des Schlitzmembranproteins Nephrin

Bei der Aufrechterhaltung der Podozytenstruktur, der Signalvermittlung, sowie als letzter Teil der Filtrationsbarriere spielt die Schlitzmembran eine essentielle Rolle. 1998 wurde das Gen *NPHS1* erstmals als Schlüsselgen im kongenital nephrotischen Syndrom beschrieben (*Kestila, Lenkkeri et al. 1998*). Das Protein Nephrin ist das Produkt dieses Gens *NPHS1* und ist mittels Western Blot in Nierengewebe durch Immunfärbung spezifisch nachweisbar. In verschiedenen Arbeiten konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass Nephrin-Proteine unterschiedlicher Podozyten eine reißverschlussähnliche Struktur ausbilden (siehe *Abbildung 5*). Dabei sind mehrere Nephrin-Proteine ineinander verzahnt (*Rodewald und Karnovsky 1974, Tryggvason 1999, Wartiovaara, Ofverstedt et al. 2004*).

Durch diese enge Verzahnung wird Nephrin ein hoher Stellenwert im glomerulären Filter als Barriere für vor allem kleinere Proteine beigemessen. Diese können aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer Ladung das Endothel und die Basalmembran ungehindert passieren. Der genaue Mechanismus ist bisweilen noch nicht abschließend geklärt, jedoch ist aktuell akzeptiert, dass Veränderungen im Podozyten und Änderungen in Menge, Struktur und Lage von Nephrin zwangsläufig zu einer Störung des glomerulären Filters und einem erhöhten Proteinverlust führen (*Pavenstadt, Kriz et al. 2003*). Derzeit wird angenommen, dass vor allem eine Größenfiltration ähnlich eines Siebeffekts den Verlust wichtiger Proteine verhindert (*Kriz und Lemley 2017*). Ein mögliches Verstopfen dieses Filters könnte einer Theorie von *Menzel und Moeller (2011)* durch ein elektrisches Potenzial verhindert sein, welches sich entlang der Filtrationsbarriere ausbildet.

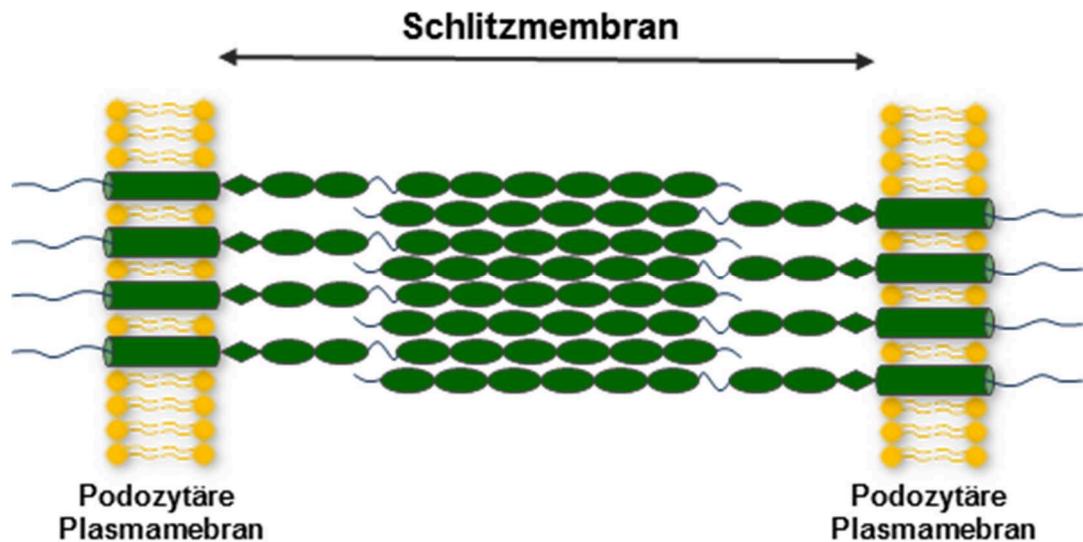


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Nephrin Verteilung in der Schlitzmembran

Nephrin Proteine zweier unterschiedlicher Sekundär-Fußfortsätze bilden eine reißverschlussähnliche Struktur aus, welche den Bereich zwischen den Fußfortsätzen verschließt. Deutlich erkennbar sind die kurzen intrazellulären C-Termini (nach außen zeigend), die Transmembranen Bereiche (zylindrische Formen) sowie die ineinander verzahnten Ig-Domänen der Nephrinmoleküle (mittlere Ketten).

Die besondere Bedeutung von Nephrin wird vor allem deutlich, wenn die Struktur des Proteins verändert ist oder gar das ganze Protein fehlt. So konnten *Lenkkeri, Mannikko et al. (1999)* zeigen, dass allein das Fehlen einzelner freier Cysteine im extrazellulären Teil des Moleküls zu einer deutlichen Proteinurie führt. *Liu, Done et al. (2001)* zeigten darüber hinaus, dass es bei unregelmäßiger posttranslationaler Modifikation zu einem Anstieg von zytologischem Nephrin kommt, ohne dass dieses in die Zellmembran eingebaut wird. Weiterhin konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass bei einer sich schnell entwickelnden, Streptozotocin (STZ) induzierten Hyperglykämie ein über β -Arrestin2 vermittelter Signalweg zu einer Reduktion des Oberflächennephrins führt (*Quack, Woznowski et al. 2011*). Durch die Reduktion des Oberflächennephrins wird der podozytäre Filter durchlässig für Proteine wie Albumin, die in Folge dessen frei filtriert werden. Dadurch kommt es bei den behandelten Mäusen zu einer erhöhten Albuminausscheidung über den Urin (Modell siehe *Abbildung 6*).

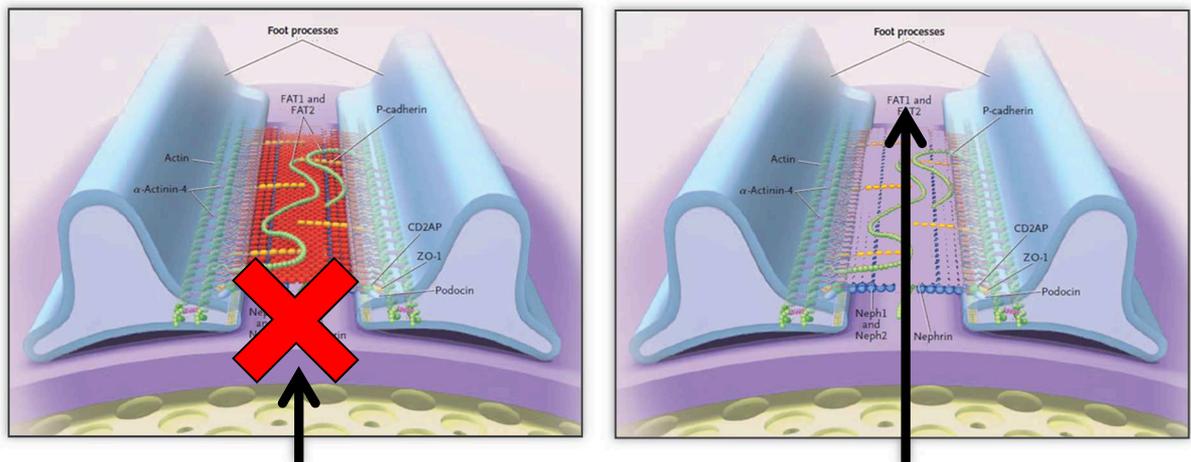


Abbildung 6: Nephrin Endozytose führt zu einer erhöhten Albuminausscheidung

Bei einer intakten Schlitzmembran werden Proteine von einem Molekulargewicht größer als Albumin im Blut zurückgehalten und sind dadurch nur in kleinstmengen im Urin nachweisbar (linkes Bild). Kommt es im Verlauf einer Krankheit zu einer Reduktion des Oberflächennephrins, ist der Filter gestört und deutlich erhöhte Mengen Albumin lassen sich im ausgeschiedenen Urin nachweisen (rechtes Bild). (Abbildung verändert. Reproduced with permission from Tryggvason, Patrakka et al. (2006), Copyright Massachusetts Medical Society.)

Dieser über β -Arrestin2 vermittelte Effekt ist Teil einer Signalkaskade, bei der weitere bislang unbekannte Proteine eine Rolle spielen. Erste, derzeit noch nicht veröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, liefern Anhaltspunkte für eine Beteiligung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) p38. Durch Arbeiten von Frau Dr. med. M. Woznowski (Universitätsklinikum Düsseldorf) konnte gezeigt werden, dass es im Modell der STZ-induzierten Hyperglykämie zu einer signifikant erhöhten p38-Phosphorylierung im Glomerulum kommt (Abbildung 7).

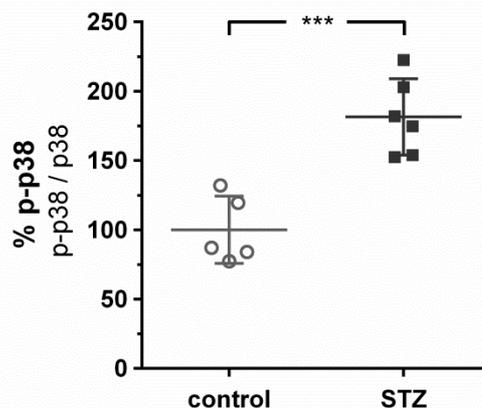


Abbildung 7: Glomeruläre p38-Phosphorylierung im Modell der STZ-induzierten Hyperglykämie

Arbeiten von Frau Dr. med. Woznowski (Universitätsklinikum Düsseldorf) geben erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der MAPK p38 bei der Signaltransduktion im Glomerulum. Nach der Induktion einer

Hyperglykämie mittels Streptozotocin steigt die p38-Phosphorylierung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen signifikant an.

4. Funktion der MAPK p38

Um auf Veränderungen des umgebenden Milieus reagieren zu können, besitzen Zellen die Fähigkeit über diverse Rezeptoren Veränderungen zu detektieren. Diese Informationen werden mittels verschiedener Signalkaskaden innerhalb der Zelle und auch zu anderen Zellen weitergeleitet. Eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Vermittlung solcher Informationen spielt die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Neben den p38 MAP-Kinasen gehören unter anderem die Extrazellulär Signalregulierten Kinasen (ERK) und die c-Jun aminoterminalen Kinasen zu der MAPK-Familie (*Roux und Blenis 2004*). Dabei nehmen JNK und MAPK überwiegend die Rolle der Stressreiz-vermittelnden Proteine ein. Stressreize entstehen beispielsweise durch Zytokine, Hormone und Hitze-/ osmotischer Schock (*Pearson, Robinson et al. 2001*). Vor allem Stressreize der Umgebung, sowie durch Zytokine vermittelte Reize führen zu einer Aktivierung von p38, wobei parallel häufig durch die gleichen Reize ebenfalls der JNK-Signalweg aktiviert wird. Diese Aktivierung ist einer der ersten Schritte um folgend eine zelluläre Antwort einzuleiten.

Die Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgt durch ihnen vorgeschaltete Kinasen. Diese werden als MAP-Kinase-Kinase und MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKK, MAPKKK) bezeichnet. Ihre Aktivierung erfolgt in der Regel direkt durch Rezeptoren, welche den extrazellulären Stimulus in das Zellinnere weiterleiten (siehe *Abbildung 8*). Dabei werden die MAP-Kinasen von den vorgeschalteten Kinasen an Tyrosin und Threonin phosphoryliert. Durch diese Phosphorylierung können die MAPK wiederum ihre Zielproteine an den Aminosäuren Serin und Threonin reversibel phosphorylieren. Voraussetzung für diese Phosphorylierung ist, dass ein Prolin auf das zu phosphorylierende Serin und Threonin folgt. Bei einer Phosphorylierung wird der Transfer einer Phosphatgruppe eines Nukleosidtriphosphates auf bestimmte Aminosäuren des Zielproteins katalysiert. Mit der Übertragung der Phosphatgruppe gehen in der Regel eine Struktur-, Aktivitäts- und Lokalisierungsänderung einher (*Roux 2004*).

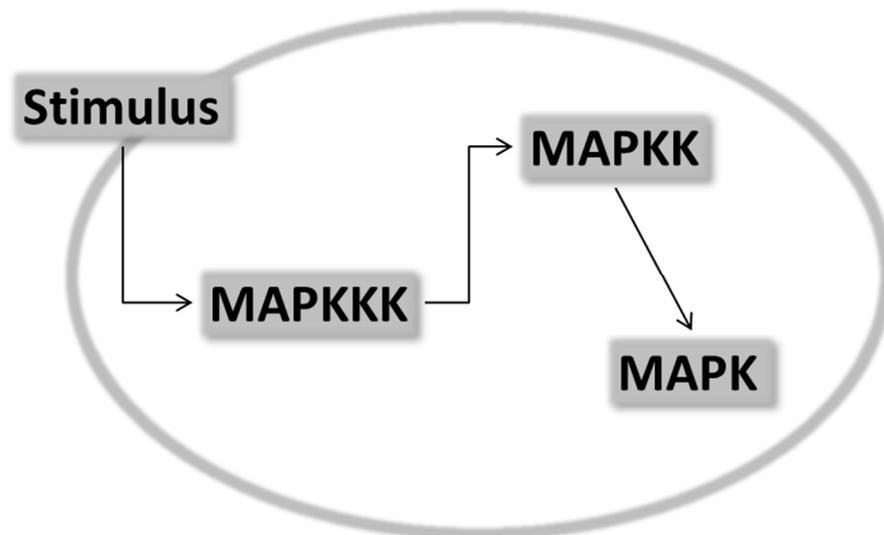


Abbildung 8: Aktivierungsschema mitogen-aktivierter Proteinkinasen

Grobe schematische Darstellung des Signalverlaufs ausgelöst durch einen extrazellulären Stimulus. Die selektive Aktivierung vorgeschalteter Kinasen (MAPKKK und MAPKK) führt schließlich zur Aktivierung bestimmter mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK) und leitet so die Zellantwort ein.

Die MAP-Kinase p38 ist im Grundzustand sowohl zytoplasmatisch, als auch am Nukleus lokalisiert. Es wird diskutiert, ob es nach Aktivierung von p38 wie bei ERK1/2 zu einer Konzentrierung vorwiegend um den Zellkern kommt (*Raingeaud, Gupta et al. 1995*), oder ob p38 weiterhin auch im Zytoplasma verbleibt (*Ben-Levy, Hooper et al. 1998*).

Derzeit sind vier verschiedene p38-Isoformen bekannt. Neben dem prominentesten Vertreter p38 α (MAPK14) existieren noch p38 β (MAPK11), p38 γ (MAPK12 oder ERK6) und p38 δ (MAPK13 oder SAPK4) (*Kyriakis und Avruch 2001*). Die Aktivierung jeder einzelnen MAPK wird durch unterschiedliche Regulatoren und unterschiedliche vorgeschaltete Kinasen bestimmt. Auf diese Weise ist gewährleistet, dass die einzelnen MAP-Kinase-Isoformen unterschiedliche Zellantworten einleiten. Wichtige derzeit bekannte Substrate, welche durch p38-MAP-Kinasen reguliert werden können sind unter anderem MAPK-aktivierte-Proteinkinasen (MAPKAPK) und Transkriptionsfaktoren. Diese regulieren wiederum unter anderem die Expression von Zytokinen (*Guan, Buckman et al. 1998*). Weiterhin spielt die Aktivierung von p38-MAP-Kinasen eine Rolle bei Apoptoseprozessen, aber ebenso auch beim Zellschutz und Zellwachstum (*Takenaka, Moriguchi et al. 1998*).

Studien von *Ono und Han (2000)* sowie *Mace, Miaczynska et al. (2005)* haben gezeigt, dass die p38-Kinasen die Expression von Oberflächenrezeptoren regulieren können. Außerdem spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Endozytose membranständiger Rezeptoren, wie zum Beispiel des μ -Opioid Rezeptors. Eine

Beteiligung von p38 als Stress-Signalprotein in der Niere konnte unter anderem bei einer durch Antikörper gegen die glomeruläre Basalmembran (antiGBM-Serum) induzierten Glomerulonephritis von *Stambe, Atkins et al. (2003)* und *Stambe, Nikolic-Paterson et al. (2004)* gezeigt werden. *Chen, Gibson et al. (2001)* konnten zeigen, dass inflammatorische Signale, die durch TNF α vermittelt werden, zu einer Aktivierung von bestimmten MAPKKs führen, welche eine hohe Spezifität gegenüber p38 besitzen. Dagegen erfolgt durch sie keine Aktivierung des ERK1/2- oder JNK-Signalweg.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen, konnte *in vitro* die Aktivierung von p38 in Podozyten durch gesteigerte Glukosekonzentrationen erzielt werden (interne, derzeit noch nicht veröffentlichte Ergebnisse). Ähnliche Ergebnisse wurden von *Dai, Natarajan et al. (2006)* veröffentlicht. Dies lässt vermuten, dass p38 einen entscheidenden Einfluss auf die Struktur des glomerulären Filters bei der diabetischen Nephropathie haben könnte. Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnte außerdem gezeigt werden, dass bei hyperglykämischen C57Bl/6 Mäusen eine gesteigerte p38-Phosphorylierung im Glomerulum im Vergleich zur Kontrollgruppe auftritt (interne, derzeit noch nicht veröffentlichte Ergebnisse). Damit einhergehend kam es bei den behandelten Tieren zu einer Reduktion des an der Oberfläche exprimierten Nephrens. Dieser Effekt konnte durch die Inhibition von p38 mittels des p38 α/β -spezifischen Inhibitors SB202190 verhindert werden (interne, derzeit noch nicht veröffentlichte Ergebnisse). Auf dieser Grundlage scheinen die MAP-Kinase p38 und speziell die Isoformen p38 α und p38 β von entscheidender Bedeutung bei der podozytären Signalvermittlung, die zu einer Reduktion von Oberflächennephrin führt, zu sein. Dadurch könnte sie von entscheidender Bedeutung bei der Intervention des Hyperglykämie-bedingten Nierenschadens werden. Derzeit ist jedoch unklar, in welchem Ausmaß die MAP-Kinase p38 und welche der beiden Isoformen maßgeblich beteiligt ist.

5. *in vivo* – Modelle

Aufgrund der Komplexität des glomerulären Filters ist die Verwendung von Tiermodellen im Rahmen der ganzheitlichen Betrachtung notwendig. Zum heutigen Zeitpunkt ist es nicht möglich, ein derart umfangreiches System *in vitro* nachzubauen. Um *in vitro* gewonnene Teilaspekte im Kontext einer nephrologischen Erkrankung analysieren zu können, existieren derzeit verschiedene etablierte Tier-Modelle.

Im Rahmen der Untersuchung des Einflusses von Nephrin und p38 bei der Entstehung einer Nierenschädigung, werden hauptsächlich drei verschiedene Modelle zur Anwendung kommen. Die Doxorubicin-vermittelte Nephropathie (*Wang, Wang et al.*

2000), die als Modell für fokal segmentale Glomerulosklerose dient. Weiterhin die nephrotoxische Nephritis (*Panzer, Steinmetz et al. 2007*), welche eine serumvermittelte Entzündungsreaktion bewirkt. Abschließend soll die Rolle von Nephrin und p38 in einem mildereren Krankheitsverlauf, in frühen Stadien eines Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus (*Like und Rossini 1976*), untersucht werden.

5.1. Doxorubicin-Nephropathie

Die Doxorubicin-induzierte Nephropathie (ADR-Nephropathie, nach dem Handelsnamen Adriamycin) dient als etabliertes Modell der beim Menschen auftretenden fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS). Diese zeichnet sich besonders durch fokal auftretende Vernarbungen der Glomeruli aus, welche elektronenmikroskopisch als Veränderungen der Podozytenfortsätze erkennbar sind (*Wang, Wang et al. 2000*). Weiterhin treten morphologische Veränderungen im tubulären System auf. Im Krankheitsverlauf kommt es zu deutlich erhöhten Proteinausscheidungen über die Niere, sowie Hypercholesterolämie, Immunoglobulinurie und gesteigerten Nitrat- und Nitritgehalten im Urin. Interessanterweise findet die Schädigung der Niere auch im Mausmodell nicht gleichzeitig statt, sondern einzelne Glomeruli gehen zugrunde und weitere folgen im Krankheitsverlauf aufgrund der erhöhten Belastung (*Kriz und Lemley 2017*). Ebenfalls ist ein deutlicher Podozytenverlust zu verzeichnen (*Lasagni, Lazzeri et al. 2013*). In der Medizin findet Doxorubicin bei der Chemotherapie als Zytostatikum Verwendung. Es interkaliert in die DNA, wodurch die DNA-Synthese gehemmt wird. Neben der im Tiermodell genutzten nephrotoxischen Nebenwirkung, werden auch Knochenmarksdepression, sowie Hautläsionen und kardiotoxische Begleiterscheinungen beobachtet.

5.2. Nephrotoxische Glomerulonephritis

Bei dem Modell der nephrotoxischen Glomerulonephritis wird mit Hilfe der Injektion eines spezifischen Immunerums gezielt eine primäre Glomerulonephritis ausgelöst. Das Serum, das durch Immunisierung von Schafen gewonnen wird, enthält vor allem Antikörper, die gegen Bestandteile der Basalmembran gerichtet sind (anti-GBM Serum). Dadurch wird eine Entzündungsreaktion in den Glomeruli hervorgerufen. Diese führt im weiteren Verlauf zu einer Schädigung der Glomeruli, einer Verminderung der Filtrationsrate und einer Proteinurie. Der Verlauf der Nephritis beim Menschen ist vergleichbar. Es kommt zu einer Ablagerung von Antikörpern oder Antikörper-Antigen-Komplexen in den Glomeruli. Die dadurch ausgelöste Entzündungsreaktion führt zu einer Proliferation glomerulärer Bestandteile, die elektronenmikroskopisch als stark verdickte

Struktur sichtbar wird. Neben der Proteinurie kommt es im Verlauf der Nephritis zu Ödemen, Hypertonie und Makrohämaturie. Unbehandelt führt die Glomerulonephritis in der Regel zu einer terminalen Niereninsuffizienz.

5.3. Hyperglykämie induzierte Nierenschädigung

Anders als bei den vorangegangenen Modellen wird die Hyperglykämie induzierte Nierenschädigung durch die Gabe von Streptozotocin sekundär erzeugt. Streptozotocin ist eine erstmals 1956 beschriebene antibiotische Substanz aus dem Bodenbakterium *Streptomyces achromogenes* (Vavra, Deboer et al. 1959). Durch seine spezifische, toxische Wirkung gegen die Betazellen im Pankreas, eignet sich STZ zur Induktion eines Diabetes mellitus in verschiedenen Versuchstieren (Rossini, Like et al. 1977). Dabei wird durch einmalige Gabe einer hohen Dosis Streptozotocin oder mehrmaligen Gabe niedriger Dosen Streptozotocin eine Zerstörung der Insulin-produzierenden Beta-Zellen bewirkt.

Die Aufnahme von STZ in die Betazellen erfolgt dabei über die in großem Maße in der Zellmembran von Betazellen befindlichen GLUT2-Rezeptoren (Schnedl, Ferber et al. 1994). Dies ist möglich, da die Grundstruktur von STZ derer von Glukose stark ähnelt (Bansal, Ahmad et al. 1980). Nach der Aufnahme in die Betazellen erfolgt intrazellulär die Abspaltung des Methylnitrosoharnstoffes vom Glukose-Molekül. Der freigesetzte Methylnitrosoharnstoff wirkt alkylierend, wodurch es zu einem verstärkten Übergang von Methylgruppen in die DNA und somit zur Reduktion der Zellteilung kommt (LeDoux, Woodley et al. 1986). Der durch die Reduktion an Betazellen entstehende Insulinmangel und der damit verbundene Fähigkeitsverlust Glukose in die Zellen aufzunehmen, führt letztlich zu einem Anstieg der Glukosekonzentration im Blut. Therapeutisch wird Streptozotocin zur Behandlung von Tumoren der Betazellen als Zytostatikum verwendet.

Ziel der Verwendung dieses Modells ist, die Auswirkung des erhöhten Blutzuckerspiegels als indirektes Stressmodell auf den glomerulären Filter und gezielt auf die Lokalisation von Nephryn im Krankheitsverlauf zu untersuchen. Dies ist von großem Interesse, da es im Verlauf einer Typ 1 als auch einer Typ 2 Diabetes Erkrankung bei anhaltendem erhöhtem Blutzuckerspiegel zu einer Schädigung der Glomeruli kommt (Siegenthaler 2006). Dabei kommt es in frühen Stadien vor allem zu einer Moderaten Albuminurie mit Albuminverlusten von 30 bis < 300 mg/Tag (Herold 2017). Diese kann durch eine geeignete Therapie lediglich teilweise unterdrückt werden. Vor allem die verstärkte Durchblutung der Glomeruli, als auch der durch die Glukose hervorgerufene oxidative Stress stehen im Verdacht einen direkten Einfluss auf die podozytäre Filtrationsleistung zu haben (Eid, Gorin et al. 2009).

Dieser Arbeit vorangehende Analysen, die von Frau Dr. med. Woznowski (Experimentelle Nephrologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) durchgeführt wurden, geben Hinweise auf eine Beteiligung der MAPK p38 an der dabei zugrundeliegenden Signalkaskade. Sie konnte zeigen, dass die p38-Phosphorylierung in den Glomeruli STZ-behandelter C57Bl/6 Mäuse signifikant erhöht ist (*Abbildung 9 A*). Weiterhin konnte die in den STZ-behandelten Tieren hervorgerufene signifikant erhöhte Albuminausscheidung im Urin durch die Gabe des p38-Inhibitors SB 202190 wiederum signifikant reduziert werden (*Abbildung 9 B*). In diesem Zusammenhang soll in dieser Arbeit die pathophysiologische Bedeutung der MAPK p38 weiter untersucht werden.

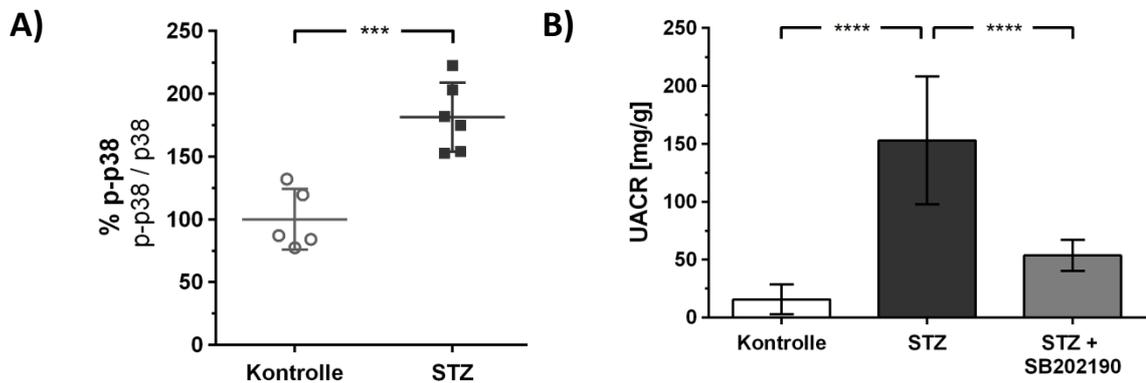


Abbildung 9: Beteiligung der MAPK p38 an der STZ-induzierten Nierenschädigung

A) Glomeruläre p38-Phosphorylierung Dargestellt ist das Verhältnis von phosphoryliertem- zu Gesamt-p38. Ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung ist an Tag 4 der STZ-induzierten Hyperglykämie im Vergleich zu den Kontrollen zu verzeichnen. **B) Albumin-Kreatinin-Ratio im STZ-Modell** Gleichzeitig ist eine durch die STZ-Behandlung signifikant erhöhte Albuminmenge im Urin messbar. Durch Gabe des p38-Inhibitors SB202190 kann dieser Effekt größtenteils unterdrückt werden. Diese Ergebnisse wurden freundlicherweise von Frau Dr. med. Woznowski (Experimentelle Nephrologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

6. Podozytenspezifische p38 α -KO Maus

Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von Isoform-spezifischen p38-Inhibitoren und der durch Inhibition nicht vollständig unterdrückbaren Aktivität, soll eine podozytenspezifische p38 α -knockout Maus (p38 α ^{PodKO}) zur weiteren Aufklärung der Signalvermittlung beitragen. Dieser konditionelle Knockout ist notwendig, da vorangegangene Arbeiten von Adams, Porras et al. (2000) gezeigt haben, dass ein genereller p38 α Knockout pränatal letal ist. Zur Generierung dieses konditionalen Knockouts wird das Cre/loxP-System verwendet (Sauer 1987). Grundlage dieses Systems ist die Cre-Rekombinase, welche unter der Kontrolle eines festzulegenden, gewebsspezifischen Promotors exprimiert wird. Diese erkennt bestimmte Gensequenzen (loxP-Stellen), die vor und nach den gewünschten, zu verändernden Gensequenzen in

das Genom eingebracht werden und schneidet an diesen Stellen die DNA. Je nach Orientierung der loxP-Stellen findet anschließend die Inversion oder Deletion des Genabschnittes statt. In dem in dieser Arbeit verwendeten Modell werden Mäuse auf C57Bl/6 Hintergrund, die das Enzym Cre-Rekombinase unter Abhängigkeit des Podocin-Promotors exprimieren, verwendet (Moeller, Sanden et al. 2003). Podocin ist ein podozytenspezifisches Protein, welches bereits fötal exprimiert wird und erstmals im Jahre 2000 von Boute, Gribouval et al. (2000) beschrieben wurde.

Diese podozytenspezifisch Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen werden mit einer weiteren C57Bl/6 Linie gekreuzt, deren MAPK14 Gen gefloxt ist (Heinrichsdorff, Luedde et al. 2008). Die loxP-Sequenzen, welche einen Teil des p38 α -Gens umspannenden, dienen als Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase. Sie schneidet den Genabschnitt an den beiden loxP-Stellen (Abbildung 10). Aufgrund der gleichen Orientierung der loxP-Sequenzen erfolgt die Exzision des Genabschnittes. Dadurch kommt es zum Verlust der ATP-Bindungsstelle der Kinase-Domäne und somit zum Verlust der Phosphorylierungsfähigkeit des Enzyms. Das Ergebnis ist eine Maus, welche eine spezifisch in Podozyten ausgeschaltete p38 α -Kinase aufweist, während andere Zellen nicht von dem Knockout betroffen sind.

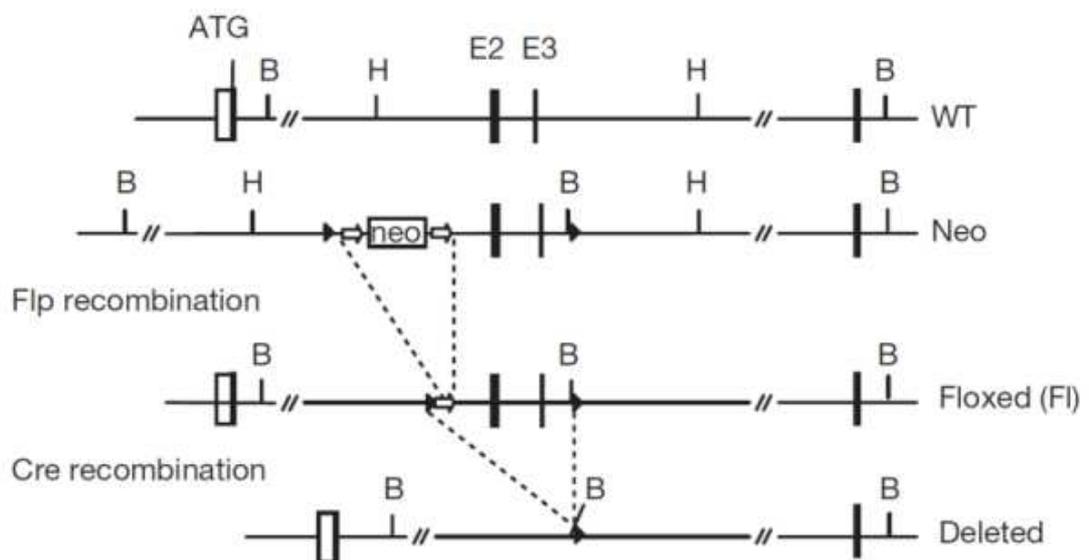


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Cre-Rekombinase Exzision

Einbringen der loxP-Stellen in die Wildtyp-Sequenz von p38 α (wt) vor und hinter dem Exon 2 und Exon 3 enthaltenden Genabschnitt. Nach Expression der Cre-Rekombinase in den gefloxt Zielzellen (Floxed (FI)), kommt es zur Exzision des gefloxt Bereiches und zum Verlust von Exon 2 und Exon 3 (Deleted). Dieser Genabschnitt kodiert unter anderem für die ATP-Bindungsstelle der Kinase-Domäne. Eine Exzision führt somit zum Verlust der Kinaseaktivität. (Heinrichsdorff, Luedde et al. 2008)

Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die nähergehende Analyse pathophysiologischer Vorgänge an der glomerulären Schlitzmembran im Verlauf wichtiger nephrologischer Krankheitsmodelle. Neben der Analyse der Albuminausscheidung über den Urin, soll der molekulare Einfluss auf das Transmembranprotein Nephrin in den Modellen untersucht werden. Dieses ist maßgeblich am Aufbau der Schlitzmembran beteiligt und somit mitverantwortlich für deren Funktionsfähigkeit. Da Nephrin seine entscheidende Bedeutung an der Zelloberfläche des Podozyten erfüllt, soll mit Hilfe eines speziell entwickelten Perfusionsprotokolls nachgewiesen werden, welches Verhältnis zwischen oberflächlich gebundenem Nephrin und Gesamtnephrin vorherrscht. Dazu werden die Versuchsgruppen im Verlauf der Krankheitsmodelle zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Weiterhin soll immunhistologisch verifiziert werden, ob eine mögliche Reduktion von oberflächlich exprimierten Nephrin auf Endozytose zurück zu führen ist.

Theorie: Gesteigerte Endozytose von Nephrin schädigt die Integrität der Schlitzmembran und führt so zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Filters. Daraus resultiert eine Proteinurie.

- 1) Korreliert die Höhe der Proteinurie mit dem Ausmaß der Endozytose von Nephrin
 - a. im akuten Modell: Nephrotoxische Nephritis?
 - b. im chronischen Modell: Doxorubicin-Nephropathie?
- 2) Wie verhält sich die Oberflächenexpression von Nephrin bei abnehmender Proteinurie?

Die medizinisch bedeutsamste proteinurische Nierenerkrankung ist die diabetische Nephropathie. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass bei Hyperglykämie die MAPK p38 eine regulatorische Rolle bei der Endozytose von Nephrin spielt. Die pharmakologische Hemmung der MAPK p38 mindert die Endozytose *in vitro* und *in vivo* signifikant. Durch die Generierung podozytenspezifischer Knockout-Mäusen bestand nun die Möglichkeit, die Aktivität der MAPK p38 α gezielt zu supprimieren und somit die Bedeutung der Endozytose für die Funktion des gesamten Filters zu untersuchen.

- 3) Wie verändert der podozytenspezifische Knockout von p38 α die Endozytose von Nephrin?
- 4) Welche Auswirkung hat diese Modulation der Aktivität von p38 im Podozyten auf die Gesamtfunktion des glomerulären Filters?

Material

1. Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
2X Laemmli-Puffer	90 mM Tris-HCl pH 6.8 0,1 M DTT 18% Glycerin 3,6% SDS 1,8% Bromphenolblau
2X Trypsin-EDTA	1:5 verdünnt mit PBS (Biochrom) aus 10X Trypsin
5X Orange G Ladepuffer	15% Glyzerin 15% Ficoll400 0,25% Orange G in TAE
CHAPS-Lysispuffer	50 mM NaCl 50 mM NaF 20 mM CHAPS 20 mM Tris-HCl pH 7.5 15 mM Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O 3 mM ATP 2 mM Na ₃ VO ₄ 0,25 mM PMSF 0,1 mM EDTA 1 Tablette Complete Mini
Destaining Solution	30% Methanol 10% Essigsäure
ECL-Homemade Reagenz A	2,5 mM Luminol 0,4 mM <i>p</i> -Cumarinsäure 0,1 M Tris-HCl pH 8.5 1,4% DMSO
ECL-Homemade Reagenz B	0,1 M Tris 0,018% H ₂ O ₂
Fixing Solution	50% Methanol 10% Essigsäure
Laufpuffer SDS-PAGE	190 mM Glyzin 24 mM Tris 3,5 mM SDS
Narkoselösung	80% 0,9% NaCl-Lösung 10% Ketamin 10% Xylazin
Natrium-Citratpuffer	0,1 M Natriumcitrat pH 4.5

PBS	137 mM NaCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7.4
PBS + Dynabeads	16 x 10 ⁶ Dynabeads/ml in PBS (Biochrom)
PBSCM	1 mM MgCl ₂ 0,1 mM CaCl ₂ in PBS
PBSCM + Biotin	0,5 mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin in PBSCM
PBSCM + Dynabeads	16 x 10 ⁶ Dynabeads/ml in PBSCM
PBSCM + Glyzin	100 mM Glyzin in PBSCM
PBSCM + Kollagenase A	1,5 mg/ml Kollagenase A in PBSCM
Primärpodozyten-Medium	300 ml 3T3-L1 Überstand 204 ml DMEM 102 ml Ham's F-12 30 ml FBS 6 ml Penicillin-Streptomycin 6 ml ITS 100x
SDS-PAGE Puffer A (Trenngel)	360 mM Tris-HCl 1140 mM Tris Base 0,4% SDS pH 8.8
SDS-PAGE Puffer B (Sammelgel)	484 mM Tris-HCl 16 mM Tris Base 0,4% SDS pH 6.9
Staining Solution	50% Methanol 7,5% Essigsäure 1,5% Coomassie Brilliant Blue G250 0,025% CuSO ₄ · 5H ₂ O
TAE-Laufpuffer	40 mM Tris-Acetat 2 mM Na ₂ EDTA · 2H ₂ O pH 8.5
TBST	0,130 M NaCl 0,013 M Tris-HCl 0,13% Tween20 pH 7.5
Transferpuffer	240 mM Glyzin 31 mM Tris 20% Methanol

Triton-Lysispuffer	150 mM KCl 20 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 1% Triton® X-100 1 mM Na ₃ VO ₄ 0,044 mM PMSF 1 Tablette Complete Mini® pH 8.0
--------------------	---

2. Geräte

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
Agarosegel-Kammer	Biometra	
Agarosegel-Netzteil	Biometra	
Contour Blutzuckermessgerät	Bayer	SN 2041120
Contour Sensoren zur Blutzuckerbestimmung	Bayer	PZN-6690980
DynaMag™-2	Invitrogen Dynal AS	123.21D
Feinwaage	Sartorius AG	R 160 p - *D1
Gelelektrophorese Kammer	Mini Trans-Blot® Cell	
Imager	Alpha Innotech	FluorChem® FC 2
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Axiovert 40 CFL
Mauswaage	A&D Company, Limited	HL-400
Nanodrop	Peqlab	Spectrophotometer NanoDrop 2000c
Paraffin-Gießstation	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	EG1120
PCR Mastercycler	Eppendorf AG	
Perfusor	Harvard Apparatus	70-2209
Plattenreader	Beckman Coulter GmbH	DTX 880 Multimode Detector
Rotor	Thermo Fisher Scientific	75006475
SDS-PAGE / Western Blot Netzteil	Biorad	PowerPac™ Universal Power Supply
Tischzentrifuge	Eppendorf AG	Centrifuge 5417R
Tissue Ruptor	Qiagen	
Waage	Bizerba SE & Co. KG	SL 31

Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific	Thermo Scientific™ Heraeus™ Multifuge 4KR
------------	--------------------------	---

3. Material

Produkt	Hersteller	Artikelnummer	
10% neutral gepuffertes Formalin v/v	Richard-Allan Scientific	5705	
10X PCR Mix	Qiagen	1005479	
Agarose	ROTH	2267.4	
Albumin bovine serum protease free	VWR	422361V	
Amersham™ Protran™ 0.45 µm Nitrocellulose Membran	GE Healthcare	10600002	
Antikörper	Nephrin	Progen Biotechnik GmbH	GP-N2
	p38	Cell Signaling	6890
	phospho-p38	Cell Signaling	9211
	β-Aktin	Sigma	A5316
	Synaptopodin	Progen Biotechnik GmbH	65194
	Streptavidin-HRP	Thermo Fisher Scientific	2216
	donkey anti guinea pig-HRP	Millipore	AP193P
	donkey anti rabbit-HRP	Santa Cruz	SC 2004
	goat anti mouse-HRP	Dako	P0447
Aqua ad injectabilia	Braun Melsungen AG		
ATP	Sigma	A7699	
Bromphenol Blau	Sigma	B-5525	
Calciumchlorid	Sigma	C-3306	
CHAPS hydrate	Sigma-Aldrich	C3023	
Collagenase A (0,2295 U/mg)	Roche	10103578001	
Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11–245 kDa)	New England Biolabs	P7712	
Complete Mini	Roche	11836153001	
Coomassie Brilliant Blue G 250	ICN Biomedicals Inc.	190343	
Dako Antibody Diluent	Dako	S0809	
Dako Waschpuffer	Dako	K8007	

di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Merck	6574.1000
DMEM Medium	Biochrom	FG 1445
dNTP-Mix		
5 mM dATP		
5 mM dCTP	peqLab Biotechnologie	20-2011
5 mM dGTP		
5 mM dTTP		
Doxorubicin Hydrochlorid (Doxorubicin)	Sigma	D1515
Dynabeads Untouched Mouse T Cells Kit	Invitrogen	11413D
Easystrainer™ 100 µm	Greiner Bio-One GmbH	542000
EDTA	Sigma	E5134
Essigsäure	ROTH	6755.2
EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Fisher Scientific	21335
FBS (Lot: 0214 X)	Biochrom	S 0015
Ficoll® 400	Pharmacia Biotech	17-0400-01
Filtropur S 0.45	Sarstedt	83.1826
Fine Bore Polythene Tubing 0,28 mm ID; 0,61 mm OD	smiths portex	800/100/100
Fine Bore Polythene Tubing 0,58 mm ID; 0,96 mm OD	smiths portex	800/100/200
Glycerin	Sigma	G5516
Glyzin	ROTH	0079.4
Ham's F12 Medium	Biochrom	FG 0815
Hämalaunlösung	ROTH	T8653
Heparin-Natrium-25000	ratiopharm	
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche	11796828001
ImmPRESS™ Reagent Anti-Rabbit IgG	Vector Laboratories	MP-7401
Injekt® 10 ml	Braun	4606108V
Insulin-Transferrin-Selenium 100x	gibco	41400-045
Isotonische Kochsalzlösung NaCl 0,9	Fresenius Kabi Deutschland GmbH	B101153 Rev.01
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich	12636
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-deHaën	30407
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich	12636

Ketavet 100 mg/ml	zoetis	PZN-3151811
Liquid DAB+ Substrat	Dako	K3468
Luminol	Sigma	A4685
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck	1.05833.1000
Methanol	VWR	20847.307
Natriumchlorid	AppliChem	A2942,1000
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich	S-4641
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich	201154
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich	S6508
Omnifix®-F	Braun	9161406V
Orange G	Fluka	75380
Paraffin Pastillen	Merck KGaA	1.07164.2504
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH	L 1825
p-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich	C-9008
Penicillin-Streptomycin (Lot: 0510 X)	Biochrom GmbH	A 2213
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	23225
ProSieve QuadColor Protein Marker 4.6 - 300 kDa	Biozym	830537
Protein A Sepharose CL-4B	GE Healthcare	17-0963-03
Proteinmarker	New England BioLabs	P7706S / P7708S
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen	74134
Rompun 2%	Bayer	
Roti®-Mount	ROTH	HP68.01
Rotiphorese® Gel 30	ROTH	3029.1
Salzsäure	Merck	1.09057
SDS	biomol	04051.1
Spritzenpumpe 11PLUS	Harvard Apparatus	PY2 70-2209
Sterican® ø0,45 x 12 mm 26 G x ½"	Braun	4665457
Sterican® ø0,30 x 12 mm 30 G x ½"	Braun	4656300
Streptozocin	Sigma	S0130
SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific	37074

Target Retrieval Solution	Dako	S1700
TEMED	ROTH	2367.1
tetra-Natriumdiphosphat Decahydrat	Sigma-Aldrich	221368
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck	A374705
TRIS	ROTH	4855.2
Triton® X-100	Sigma-Aldrich	T9284
Trypsin / EDTA Lösung	Merck KGaA	L2143
Tween® 20	Merck KGaA	8.17072.1000
Whatman® gel blotting paper, Grade GB003	GE Healthcare	10426892
Xylol	VWR	28975.325
Zellkultur-Flasche T25 Nunc™ EasyFlask™ 25 cm ²	Thermo Fisher Scientific	169900
Zellkultur-Flasche T75 Nunc™ EasyFlask™ 75 cm ²	Thermo Fisher Scientific	156800
Zellkultur-Schale ø10 cm	Corning Incorporated	430167
Zellkultur-Schale ø6 cm	Corning Incorporated	430166

Methoden

1. Tierzucht und Tierhaltung

Die Tierzucht und Tierhaltung erfolgte in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Chronische Versuche wurden entsprechend des unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2012.A099 genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt. Reine Organentnahmen konnten unter der internen Projektnummer O68/08 realisiert werden. Die Befähigung zum tierexperimentellen Arbeiten wurde am 05.08.2013 durch erfolgreichen Abschluss eines FELASA B-zertifizierten Kurs der Kategorie B am DKFZ-Heidelberg erlangt.

Wildtyp C57Bl/6 oder BALB/c Tiere wurden von der Firma JANVIER LABS (Frankreich) bezogen. Nach Lieferung der Tiere wurde eine 10-tägige Akklimatisierungsphase eingehalten, bevor die Tiere in einen Versuch aufgenommen wurden.

Die Zucht der podozytenspezifischen p38 α knockout Linie erfolgte intern in der ZETT unter spezifisch pathogen-freien Bedingungen (SPF). Zuchtpaare wurden bis auf Ausnahmen immer aus einem Cre-Rekombinase positiven, geflochten Männchen und

einem Cre-Rekombinase negativen, geflochtenen Weibchen gebildet. Das Absetzen der Jungtiere erfolgte mit circa 4 Wochen. Zeitgleich wurde die Schwanzspitzen-Biopsierung für die Genotypisierung, sowie die Markierung mittels Ohrlochung durchgeführt. Erst für die Durchführung der Versuche wurden die Mäuse in konventionelle Versuchsräume verbracht. Die Haltung der Tiere erfolgte in Eurostandard Typ II oder Eurostandard Typ II L Käfigen der Firma Techniplast entsprechend der Haltungsempfehlungen des Herstellers.

2. *in vivo* – Modelle

2.1. Doxorubicin-Nephropathie

Zur Induktion einer Doxorubicin vermittelten Nephropathie wurde 6 Wochen alten, männlichen BALB/c Tieren einmalig 10 µg/gKG Doxorubicin gelöst in Aqua ad injectabilia intravenös (i.v.) injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt das entsprechende Volumen Aqua ad injectabilia. Zur Überwachung der Nierenfunktion wurden die Mäuse in gleichmäßigen Abständen an den Tagen 1, 3, 5 & 7 in metabolischen Käfigen gehalten, um Sammelurin zu gewinnen. Aufbauend auf den Erkenntnissen von *Wang, Wang et al. (2000)* wurde der frühestmögliche Zeitpunkt mit der höchsten Albuminausscheidung für die finale Organentnahme ausgewählt. Entsprechend erfolgte die Organentnahme an Tag 7 anhand des in 3. *Perfusion und Organentnahme* detailliert beschriebenen Protokolls.

2.2. Nephrotoxische Nephritis

Das Modell der Nephrotoxischen Nephritis wurde an männlichen C57Bl/6 Mäusen im Alter von 8 – 10 Wochen untersucht. Die Induktion erfolgte mittels einer einmaligen intraperitonealen (i.p.) Injektion von wahlweise 100 oder 800 µl anti-GBM Serum, welches freundlicherweise von Prof. Dr. med. Wiech (Pathologie, UKE Hamburg) zur Verfügung gestellt wurde. Das Injektionsvolumen richtet sich nach der Induktionseffizienz und wurde chargenabhängig ausgetestet. Die Organentnahme erfolgte 24 Stunden nach der Injektion, um kurzfristige Effekte charakterisieren zu können. Zur Untersuchung langfristiger Effekte erfolgte die Organentnahme 18 Tage nach der Injektion. Sammelurine wurden über Nacht an Tag 1, 7, 14 und 18 im Versuchsverlauf gewonnen, um die Albuminausscheidung charakterisieren zu können.

2.3. Streptozotocin-Diabetes

Um in einem Vorversuch den Einfluss einer durch Streptozotocin induzierten Hyperglykämie auf die Niere zu untersuchen, wurden männliche C57Bl/6 Mäuse im Alter

von 11-12 Wochen einmalig mit Streptozotocin behandelt. Die Gabe erfolgte mittels intraperitonealer Injektion. Die Dosis von 180 µg/gKG wurde mit Hilfe einer Injektion von 10 µl/gKG einer 18 µg/µl STZ-Lösung erzielt. Als Lösungsmittel dient ein 0,1 M Natriumcitratpuffer pH 4,5. Um eine höhere Reproduzierbarkeit zu erreichen, wurden vorbereitete Aliquots des Natrium-Citratpuffers, sowie das Streptozotocin unmittelbar vor dem Spritzen der Tiere aufgetaut. Unmittelbar danach wurde das Streptozotocin im Puffer gelöst und intraperitoneal injiziert. Laut der Untersuchung von *Lee, Kim et al. (1993)* kann auf diese Weise die höchstmögliche Stabilität gewährleistet und das STZ effektiv eingesetzt werden. Neben der konstanten Kontrolle des Blutzuckerspiegels mittels Contour Blutzuckermessgerät (Bayer Pharma AG), wurde das Körpergewicht gemessen und Urin gesammelt, um die Schädigung des Glomerulären Filters zu untersuchen.

Nachdem der zeitliche Verlauf der frühen glomerulären Schädigung charakterisiert werden konnte, wurden 12 Wochen alte p38α^{fl/fl} und p38α^{PodKO} Mäusen je einmalig mit 180 µg/gKG STZ in Natrium-Citratpuffer (18 µg/µl) behandelt. Je nach Versuchsdauer wurden die Mäuse an unterschiedlichen Tagen für circa 5 Stunden zur Urinsammlung in metabolischen Käfigen gehalten. Zur Kontrolle des Krankheitsverlaufs wurde der Blutzuckerspiegel mit Hilfe eines Contour Blutzuckermessgeräts gemessen. Ab einem Blutzuckerspiegel über 250 mg/dl werden die Tiere als hyperglykäm eingestuft. Werte oberhalb des Messbereichs des Gerätes werden von dem Blutzuckermessgerät als „HIGH“ angezeigt und wurden für die Auswertung gleich dem höchsten messbaren Wert (600 mg/dl) gesetzt. Die Organentnahme erfolgte 4 Tage, 11 Tage, und 21 Tage nach der Injektion.

3. Perfusion und Organentnahme

Zu Beginn der Organentnahme wurden die Mäuse gewogen und gewichtsabhängig wurde die Narkose mittels 10 µl/gKG Narkoselösung eingeleitet. Als Kontrolle der erfolgreichen Narkotisierung dienten fehlenden Zwischenzehreflexe. Nach Abschluss aller notwendigen Vorbereitungen wurden die Tiere durch eine zervikale Dislokation erlöst. Die Präparation erfolgte unmittelbar im Anschluss, um ein Gerinnen des Blutes weitgehend zu verhindern. Dazu erfolgte zunächst ein Einschnitt kaudal in die Bauchhaut. Durch spreizende Scherenbewegungen wurde die Ablösung der Hautschichten von den Bauchmuskeln durchgeführt. Danach wurde die Haut Richtung apikal bis auf Höhe des Sternums aufgetrennt und durch je einen Richtung lateral führenden Schnitt mittig entlastet. Anschließend erfolgten auf gleiche Weise der

Einschnitt und die Entlastung der Bauchmuskeln zur Eröffnung der Peritonealhöhle (Abbildung 11 A).

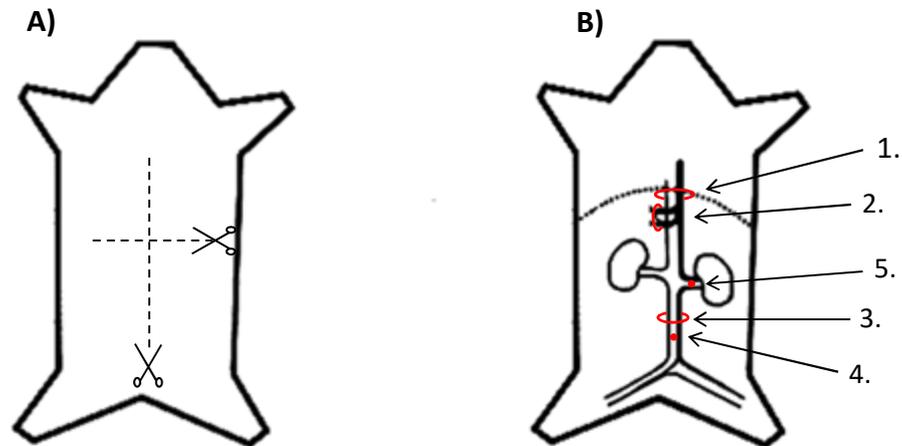


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Perfusionsvorbereitung

A) Schnittmuster des Bauchfells und des Peritoneums zur Exposition der inneren Organe Die gestrichelten Linien demonstrieren die Schnittlinien zur Offenlegung des Peritonealraumes. Zuerst werden auf diese Weise die Hautschichten durchtrennt und anschließend der Peritonealraum eröffnet. **B) Übersicht der Ligationsstellen und der Inzisionsorte** 1., 2. und 3. markieren die drei Ligationsorte, 4. zeigt die Stelle, an der der Perfusions Schlauch eingeführt wird. An Stelle 5. wird ein Entlastungsschnitt zum Abfluss des Blutes und Perfusates gesetzt. (Abbildung verändert nach Liu, Fan et al. (2013))

Die Sicht auf das Retroperitoneum wurde durch beiseiteschieben der peritonealen Organe freigelegt. Folgend wurde eine Ligatur um die auf diese Weise exponierte Vena cava inferior zwischen Zwerchfell und Mesenterialgefäßen, unterhalb des kaudalen Nierenpols, vorbereitet. Ebenso wurde eine Ligatur um die Mesenterialgefäße gelegt. Anschließend wurden zügig die Vena cava inferior kaudal knapp unterhalb der 3. Ligatur inzidiert und der Perfusions Schlauch in die Vene eingeführt (siehe *Abbildung 11 B*). Die Ligaturen wurden geschlossen und ein Entlastungsschnitt in der Vena renalis platziert, um das Perfusat abfließen lassen zu können. Die Perfusion wurde bei einem konstanten Volumenfluss von 1 ml/Minute gestartet und kurz danach auf 2 ml/Minute erhöht. Je nach weiterem Versuchsaufbau wurden unterschiedliche Perfusionspuffer nacheinander durch luftblasenfreies Wechseln der Perfusorspritzen perfundiert.

4. Primärkultur

Entsprechend des in 3. *Perfusion und Organentnahme* beschriebenen Vorgehens wurden 5 Wochen alte $p38\alpha^{fl/fl}$ und $p38\alpha^{PodKO}$ Mäuse unter möglichst keimreduzierten Bedingungen mit 5 - 10 ml sterilem PBS (Biochrom) und anschließend 5 ml PBS + Dynabeads perfundiert. Die Nieren wurden vorsichtig entnommen und in einer

sterilen 10 cm Zellkulturschale mittels Rasierklinge zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebeproben in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml steril-filtrierter Kollagenase A-Lösung (1,5 mg/ml in PBS (Biochrom)) versetzt. Durch eine 30 minütige Inkubation bei 37°C wurde das Gewebe weiter aufgeschlossen, um im folgenden Schritt die enthaltenen Glomeruli isolieren zu können. Die Isolierung erfolgte gleichermaßen wie in *3. Perfusion und Organentnahme* dargestellt bis zu einer augenscheinlich absoluten Reinheit. Die so gewonnenen Glomeruli wurden in 5 ml Primärkultur-Medium aufgenommen und in kollagenisierten T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach einer dreitägigen, möglichst erschütterungsfreien Inkubation bei 37°C und 5% CO₂, wurde an Tag 4 das Auswachsen der Podozyten aus den Glomeruli mikroskopisch überprüft. Anschließend wurden die Zellen passagiert.

4.1. Passagieren

Dazu wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS (Biochrom) gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 1,5 ml Trypsin-EDTA überschichtet und durch Inkubieren bei 37°C für 5 Minuten von der Kulturflaschenoberfläche abgelöst. Durch Zugabe von circa 8 ml Primärkultur-Medium wurde die Trypsinierung durch das enthaltene FBS unterbrochen. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugengefäß überführt und 4 Minuten bei 500 xg zentrifugiert. Nach Absaugen des Medium, wurde das Zellpellet wiederum vorsichtig in 10 ml Primärkultur-Medium resuspendiert. Mit Hilfe eines großen Magneten konnten die verbleibenden Dynabeads fixiert und so von den ausgewachsenen Podozyten getrennt werden. Die Zellsuspension wurde anschließend in neuen Zellkulturflaschen ausgesät und erneut bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

4.2. Ernte

Um die Primärpodozyten weiter untersuchen zu können, wurde zu bestimmten Zeitpunkten das Medium auf Eis abgesaugt und die Podozyten wurden zweimal mit 10 ml PBS (Biochrom) gewaschen. Anschließend wurden entweder 450 µl 1%-Triton-Lysispuffer pro T75 Zellkulturflasche für die Proteinlyse zugegeben oder 600 µl RLT-Lysispuffer pro T25 Zellkulturflasche für die weitergehende RNA-Isolierung. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Schabers abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die RLT-Proben wurden sofort bei -20°C weggefroren. Die Lyse der Zellen mit Triton-Lysispuffer für die proteinbiochemische Analyse erfolgte für 30 Minuten auf Eis. Nicht solubilisierte Proteine wurden durch zweimalige Zentrifugation bei 20817 xg und 4°C für 30 Minuten entfernt und der Lysat-Überstand für die weitere Analyse in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

5. Biotinylierungsassay

Für den Biotinylierungsassay wurde nach der in 3. *Perfusion und Organentnahme* beschriebenen Vorbereitung, im ersten Schritt der Perfusionsbereich mit 10 ml PBSCM von Blut freigespült. Anschließend erfolgte die Biotinylierung der Oberflächenproteine mittels Perfusion von 5 ml PBSCM + Biotin und das Quenchen unspezifisch gebundenen Biotins durch 10 ml PBSCM + Glyzin Perfusion. Im Vorfeld zu dieser Arbeit, konnte von Frau Dr. med. Woznowski und Herrn Dr. med. Potthoff in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass sich Oberflächenproteine im Glomerulum auf diese Weise markieren lassen (*Abbildung 12*). Diese Methode ist im Allgemeinen vor allem bei der Betrachtung von Membranrezeptoren gut etabliert. Biotin ist ein wasserlösliches B-Vitamin, das unter anderem als Co-Enzym für Carboxylasen dient. Durch die verknüpfte Natriumsulfonat-Gruppe ist das verwendete Sulfo-NHS-LC-Biotin membran-impermeabel. Dadurch werden bei der Perfusion lediglich extrazelluläre primäre Amine von Membranproteinen kovalent markiert.

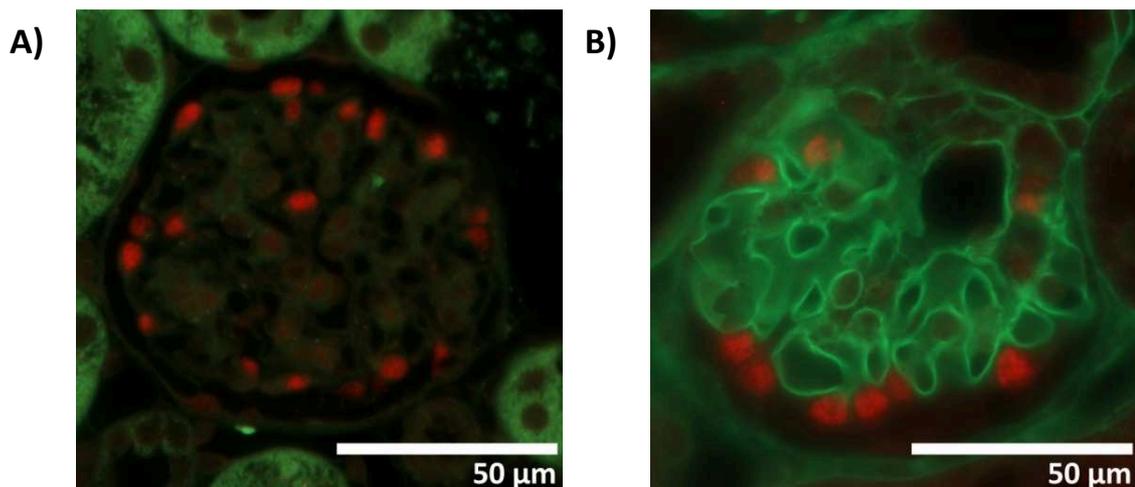


Abbildung 12: Histologische Untersuchung der Biotin-Perfusion

A) Kontroll-Perfusion ohne Biotin Dargestellt ist die mikroskopische Aufnahme eines gegen wt-1 (rot) und mit Streptavidin gefärbten murinen Nierenschnitts. Die Probe dient als Kontrolle und wurde im Vorfeld nur mit PBS perfundiert. **B) Biotin-perfundierter Nierenschnitt** Entgegen der Kontrolle, weist das dargestellte Glomerulum zusätzlich zu der spezifischen wt-1-Färbung (rot) deutliche Streptavidin-Bindung (grün) auf. Die Niere wurde zusätzlich zur PBS Perfusion mit Biotin perfundiert. Anschließend wurden die Nierenschnitte mit anti-wt1 und Streptavidin gefärbt. (Quelle: *Haase, Potthoff et al. (2017)*)

Bei den mit PBS perfundierten Kontrollen konnte eine spezifische Färbung der Podozytenkerne in immunhistologischen Nierenschnitten von Mäusen durch den wt-1-Antikörper gezeigt werden. Der Nachweis von Biotin durch eine Streptavidin-Färbung blieb im Glomerulum aus. Dahingegen wiesen Schnitte der Biotin-perfundierten Nieren

neben den wt-1 gefärbten Regionen deutliche Färbung linearer Strukturen im Glomerulum auf. In den nicht-glomerulären Bereichen der Nierenschnitte ist lediglich eine schwache Hintergrundfärbung erkennbar. Aufgrund der Eigenschaft des modifizierten Biotins, die Zellmembran nicht passieren zu können, konnten so Oberflächenproteine mit direktem Kontakt zu den glomerulären Kapillaren kovalent markiert werden.

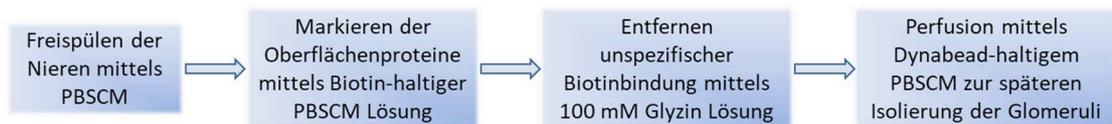


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Perfusionsablaufs

Zu Beginn der Perfusion wurden die Nieren mittels Calcium- und Magnesium-haltigem PBSCM blutleer gespült. Anschließend folgte die Markierung der Oberflächenproteine mittels Biotin-haltigem PBSCM. Unspezifische Biotin-Bindung wurde daraufhin durch Perfusion mit 100 mM Glyzin in PBSCM entfernt. Im letzten Schritt folgte die Perfusion mittels Dynabead-haltigem PBSCM. Die metallische Partikel lagern sich aufgrund ihrer Größe in den Glomeruli an und ermöglichen dadurch die spätere Isolierung mittels Magneten.

Die auf diese Weise markierten Nieren wurden für die spätere Aufreinigung der Glomeruli in einem zusätzlichen Perfusionsschritt mit 5 ml PBSCM + Dynabeads perfundiert. Bei diesen Beads handelt es sich um im Durchmesser 4,5 µm große metallische Partikel, die sich aufgrund ihrer Größe in den glomerulären Kapillaren festsetzen. Sie erleichtern die Aufreinigung der Glomeruli von den restlichen Nierenkompartimenten. Nach der Perfusion wurden die Nieren vorsichtig entnommen, auf Eis mit einer Rasierklinge zerkleinert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zum Aufschluss des Nierengewebes wurde je 1 ml PBSCM + Kollagenase A den Nieren zugegeben. Durch die Inkubation der Reaktionsansätze im Wasserbad bei 37°C für 40 Minuten erfolgten der proteolytische Abbau von Kollagen und die Freisetzung der Glomeruli.

Nach dem Überführen der Proben auf Eis wurde die Gewebssuspension zusammen mit 40 ml PBSCM durch ein 100 µm Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugengefäß gespült. Durch Zentrifugation bei 500 xg für 5 Minuten wurden die Glomeruli gesammelt. Der Überstand konnte so vorsichtig auf einem Magneten abgesaugt, das Pellet in 1,5 ml PBSCM resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Mit Hilfe eines Magneten wurden die Glomeruli an der Reaktionsgefäßwand fixiert, so dass der Puffer mit dem restlichen Nierengewebe abgenommen werden konnte. Die Reaktionsgefäße wurden aus dem Magnet entfernt, die Glomeruli in frischem Puffer resuspendiert und

wieder mittels Magneten fixiert. Diese Waschprozedur wurde wiederholt, bis die Proben eine Reinheit von 95 - 100% Glomeruli aufwiesen und mikroskopisch keine tubulären Fragmente mehr erkennbar waren. Durch Zentrifugation bei 6800 xg für 5 Minuten konnten die Glomeruli gesammelt werden. Der Überstand wurde vorsichtig und vollständig abgenommen und das Pellet in 300 µl CHAPS-Lysispuffer resuspendiert. Mit Hilfe eines Tissue Ruptors wurden die Proben ca. 30 Sekunden auf Eis homogenisiert. Die Lyse der Glomeruli erfolgte im Anschluss für 30 Minuten auf Eis. Nicht solubilisierte Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 20817 xg für 30 Minuten pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde anschließend einmal wiederholt.

6. Proteinanalyse

6.1. Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Hierzu wurde eine BSA-Standardreihe (siehe *Tabelle 1*) mit dem zuvor verwendeten Lysispuffer hergestellt. Anschließend wurden die Standardreihe und die 1:2 verdünnten Proben in einer 96 well Platte aufgetragen und mit dem BCA-Reagenz entsprechend des Herstellerprotokolls versetzt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit Hilfe eines Plattenreaders die Absorption bei 562 nm gemessen. Mit Hilfe der Standardreihe konnte im Folgenden die Konzentration der einzelnen Proben berechnet werden.

Tabelle 1: Pipettierschema der Standardreihe für 1:2 verdünnte Proben

	Konzentration [µg/ml]	Volumen [µl]	H ₂ O [µl]	Lysispuffer [µl]	BSA [µl]	
1	0	250	125	125	0	
2	25	250	100	100	50	aus 3
3	125	325	81,25	81,25	162,5	aus 4
4	250	325	81,25	81,25	162,5	aus 5
5	500	325	81,25	81,25	162,5	aus 7
6	750	175	21,875	21,875	131,25	aus 7
7	1000	340	0	170	170	2 mg/ml BSA

Die Proteinkonzentration und das Probenvolumen aller zeitgleich untersuchten Proben wurde im Anschluss an die Messung durch Verdünnung der Proben angepasst. Dadurch konnten ein gleiches Gesamtvolumen und die gleiche Proteinmenge bei allen Proben sichergestellt werden.

6.2. Immunpräzipitation

Von den so vorbereiteten Proben, die für die Immunpräzipitation eingesetzt werden sollten, wurden im nächsten Schritt jeweils 40 µl abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit dem gleichen Volumen 2X Laemmli-Probenpuffer versetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation dieser Ansätze bei 95°C für 5 Minuten. Die Proben wurden bis zur gelelektrophoretischen Analyse bei -20°C gelagert. Der restliche Teil der Lysatproben wurde für die Immunpräzipitation jeweils mit 5 µl anti-Nephrin Antikörper und 100 µl Lysispuffer versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfrator.

Am nächsten Morgen wurden die Ansätze mit jeweils 30 µl Protein A Sepharose versetzt und für weitere 3 Stunden bei 4°C auf dem Überkopfrator inkubiert. Anschließend erfolgte das Waschen der Sepharose-Beads je dreimal mit je 1 ml Lysispuffer. Dazu wurden die Proben bei 4°C für 3 Minuten bei 1000 xg zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Sepharose-Pellet in 1 ml frischem Lysispuffer sanft resuspendiert. Danach wurden die Sepharose-Beads durch Zentrifugation bei 20817 xg für 1 Minute bei 4°C gesammelt und der Puffer vorsichtig abgenommen. Im letzten Schritt wurden die so generierten Proben mit 40 µl 2X Laemmli versetzt und 5 Minuten bei 95°C inkubiert.

6.3. SDS-PAGE

6.3.1 SDS-Polyacrylamid Gele gießen

Um die Polyacrylamidgele gießen zu können, wurden die Trägerplatten (mit integrierten 0,75 mm dicken Spacern) und Deckelplatten in Gießgestellen zusammengestellt. Die notwendigen Reagenzien für das Trenngel (siehe *Tabelle 2*) wurden vorsichtig miteinander vermischt und zwischen die Glasplatten gegossen. Anschließend erfolgte das Überschichten des Trenngels mit 100% Isopropanol, um die Oberflächenspannung herabzusetzen und einen geraden Abschluss des Trenngels zu erhalten. Nach dem Auspolymerisieren für circa 30 Minuten wurde das Isopropanol abgegossen und Isopropanolreste wurden mit Aqua dest. weggespült. Überschüssiges Aqua dest. wurde mit Hilfe eines Papiertuchs vorsichtig entfernt. Das Sammelgel wurde über das Trenngel gegossen und der Kamm für die Probenaschen luftblasenfrei oben in das Sammelgel eingeführt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels für 30 Minuten, erfolgten der Zusammenbau der Gelelektrophorese-Apparatur und das vorsichtige Entfernen des Kammes aus dem Gel. Durch Spülen der Geltaschen mit Laufpuffer wurden beim Gießen entstandene Verunreinigungen entfernt, bevor die Proben geladen wurden.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Benötigte Puffer zur Herstellung eines 10%igen Trenngels mit zugehörigem Sammelgel. Die Kombination der Puffer und Reagenzien erfolgte in der dargestellten Reihenfolge.

Trenngel 10%	
1. Aqua dest.	750 µl
2. Puffer A	2250 µl
3. Rotiphorese 30	1500 µl
4. 10% APS	45 µl
5. TEMED	7,5 µl

Sammelgel	
1. Aqua dest.	567,5 µl
2. Puffer B	832,5 µl
3. Rotiphorese 30	267,5 µl
4. 10% APS	20 µl
5. TEMED	2,5 µl

6.3.2 Probenvorbereitung

Die mit Laemmli-Probenpuffer versetzten Proben wurden 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Die anschließende Zentrifugation bei 20817 xg für 30 Minuten bei Raumtemperatur diente der Entfernung nicht solubilisierter Proteine aus den Proben.

6.3.3 Gele laden

Jeweils gleiche Probenvolumina wurden in die Probentaschen geladen. Für die Lysate betrug das Ladevolumen 15 µl, während für die IP-Proben nur 10 µl geladen wurden. Die Proteinmenge variierte dabei bei den verschiedenen Versuchsansätzen dadurch zwischen 0,5 µg – 5 µg Protein/Tasche.

6.3.4 Elektrophorese

Die anschließende Elektrophorese wurde bei 70 V für 30 Minuten für das Sammelgel und 20 mA/Gel für knapp 90 Minuten für das Trenngel durchgeführt. Die angelegte Stromstärke wurde gestoppt, sobald die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

6.4. Western Blot

Anschließend wurden die Gele aus den Glasplatten entnommen, das Sammelgel abgetrennt und die Trenngele in 4°C kalten Transferpuffer überführt. Nach 10 Minuten erfolgte der Zusammenbau der equilibrierten Gele mit den in Transferpuffer angefeuchteten Nitrocellulosemembranen, den Filterpapieren und Blotschwämmen in der Blot-Apparatur. Der Proteintransfer wurde im Tank-Blot Verfahren bei 200 mA/Blotkammer (max. 2 Polyacrylamidgele) für 2,25 Stunden durchgeführt.

6.5. Immunfärbung

Nach dem Transfer wurden die Nitrocellulose-Membranen kurz in TBST gewaschen, um überschüssigen Transferpuffer zu entfernen. Anschließend erfolgte das Blocken der Membranen mit 5% BSA in TBST für eine Stunde bei 37°C. Überschüssige Blockierungslösung wurde durch kurzes Waschen in TBST entfernt und die Membranen anschließend in die primären Antikörperlösungen überführt. Um eine gleichmäßige Färbung zu ermöglichen, erfolgte die Inkubation mit Primärantikörper über Nacht bei 4°C unter sanften schwenken. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen der Membranen für 5 Minuten mit TBST entfernt. Die Färbung der Membranen mittels HRP-gekoppelter Sekundärantikörperlösung erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken. Abschließend erfolgte wiederum das Entfernen von unspezifisch gebundenem Antikörper durch dreimaliges Waschen für 5 Minuten mit TBST.

6.6. Proteindetektion

Die so vorbereiteten Membranen wurden mit ECL-Entwicklerlösung bedeckt und eine Minute bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht inkubiert. Mit Hilfe einer CCD-Kamera wurden Abbilder der Lumineszenz nach 10, 20, 40, & 60 Sekunden bei Verwendung der SuperSignal ELISA Entwicklerlösung erstellt. Für Aufnahmen mit der ECL „Homemade“-Entwicklerlösung wurden Belichtungszeiten von 30, 60 & 120 Sekunden gewählt.

6.7. Quantifizierung

Die im TIFF-Format verlustfrei gespeicherten Aufnahmen konnten mittels der Software AlphaView SA Version 3.3.1 der Firma Cell Biosciences, Inc quantifiziert werden. Dazu wurde die Pixeldichte der einzelnen Banden densitometrisch erfasst. Die Messbereiche aller Banden eines Blots wurden dazu eng um die Banden gewählt und wiesen alle die gleiche Größe auf (siehe *Abbildung 14*). Die schwächsten 10 Pixel einer jeden Region wurden als Hintergrund von dem ermittelten Wert automatisch

subtrahiert und die Ergebnisse in Microsoft Excel exportiert. Anschließend wurden die so gewonnenen densitometrischen Daten nach der von *Degasperi, Birtwistle et al. (2014)* beschriebenen „normalisation by sum“-Methode normiert. Dieses Vorgehen erwies sich als praktikabelste Methode, um einen hohen Normierungserfolg zwischen den Einzelversuchen einer Versuchsreihe zu erzielen. Das Ziel ist Intensitätsunterschiede, durch Division aller Einzelwerte eines Blots durch deren Summe, auszugleichen. So können allgemeine Abweichungen, die während des Western Blot oder der Antikörperfärbung zwischen den Einzelversuchen entstehen, minimiert werden. Zur besseren Veranschaulichung werden die Ergebnisse der Western Blots als fold change angegeben. Dazu wird die in den einzelnen Versuchen als Kontrolle dienende Gruppe gleich 100% gesetzt. Die anderen Gruppen werden entsprechend relativ zur Kontrollgruppe dargestellt.

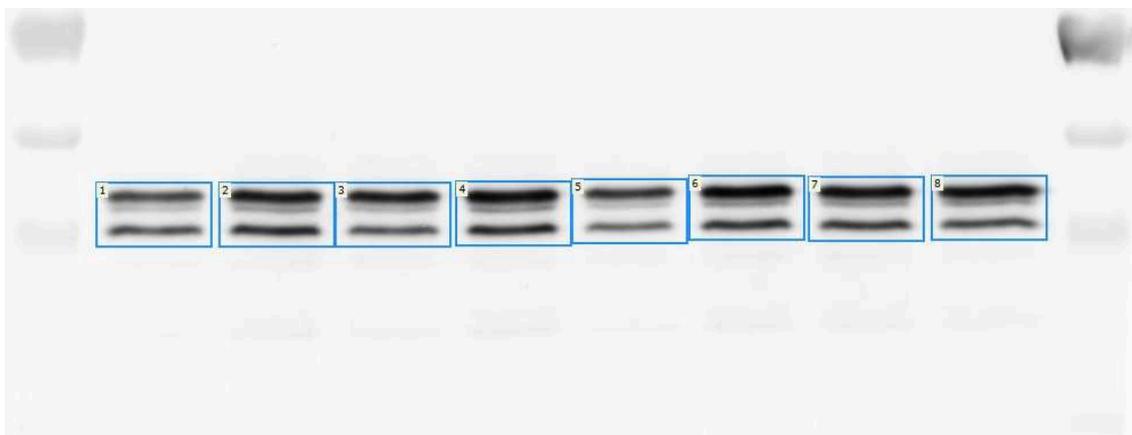


Abbildung 14: Beispielhafte Darstellung der densitometrischen Messbereiche

Dargestellt ist ein Western Blot mit aufgetrennten Glomerulilysaten, welcher mit anti-p-p38 und anti-Kaninchen Antikörpern gefärbt und mit SuperECL-Entwicklerlösung entwickelt wurde. Beispielhaft sind die densitometrischen Messbereiche um die Proteinbanden dargestellt. Die drei Einzelbanden der p38-Isoformen werden hier zu einem Ergebnis zusammengefasst, da die Gesamtphosphorylierung untersucht werden sollte.

7. Nukleinsäuren

7.1. DNA-Isolierung aus RLT-Proben

Für die Genotypisierung der Primärpodozyten wurden 240 µl der RLT-Proben mittels High Pure PCR Template Preparation Kit von der Firma Roche entsprechend des Herstellerprotokolls aufgereinigt. Die aufgereinigte DNA wurde anschließend mit 130 µl RNase-freiem Aqua dest. eluiert.

7.2. RNA-Isolierung aus RLT-Proben und Generierung von cDNA

Die Isolierung der RNA aus den RLT-Proben der Primärpodozyten erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Mini-Plus Kit der Firma Qiagen entsprechend des Herstellerprotokolls. Durch einen angeschlossenen gDNA Wipeout konnte sichergestellt werden, dass die RNA Proben frei von genomischer DNA sind. Dazu wurden die Reaktionsansätze nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 3: Pipettierschema gDNA Wipeout

Reaktionsansatz für einen gDNA Wipeout zur Elimination sämtlicher genomischer DNA in den RNA-Proben.

Reagenz	Volumen [μ l]
RNase freies H ₂ O	10,5
RNA-Probe	1,5 (500 – 750 ng)
gDNA Wipeout Puffer (7X)	2,0

Die Ansätze wurden 3 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden zu den Reaktionsansätzen die Reagenzien für die Reverse Transkription zur Synthese der cDNA zugegeben. Die Bestandteile der Ansätze für die cDNA Synthese sind in *Tabelle 4* zusammengefasst. Anschließend wurden die Reaktionsansätze im Thermocycler für 25 Minuten bei 42°C und für 3 Minuten bei 95°C inkubiert.

Tabelle 4: Reverse Transkription

Bestandteile der Reaktionsansätze zur Synthese der cDNA aus den aufgereinigten RNA-Proben nach dem gDNA Wipeout.

Reagenz	Volumen [μ l]
Reaktionsansatz aus gDNA Wipeout	
Quantiscript RT-Puffer (5X)	4,0
RT-Primer-Mix	1,0
Quantiscript Reverse Transkriptase	1,0

Zur Kontrolle des erfolgreichen gDNA Wipeouts und der Reversen Transkription wurden von jeder Probe je 0,5 μ l der RNA-Probe, der RNA-Probe nach dem Wipeout und der cDNA Probe mittels GAPDH-PCR überprüft. Die Reaktionsansätze sind entsprechend denen in *Tabelle 5* zusammengesetzt. Die PCR-Reaktion erfolgte gleichermaßen des in *Tabelle 7* beschriebenen Reaktionsprogramms. In diesem Versuch betrug die

Temperatur für die Primer-Hybridisierung jedoch 58°C und die PCR wurde mit 40 Zyklen ausgeführt. Die Kontrolle eines erfolgreichen Umschreibens der RNA in cDNA ist in *Abbildung 15* dargestellt.

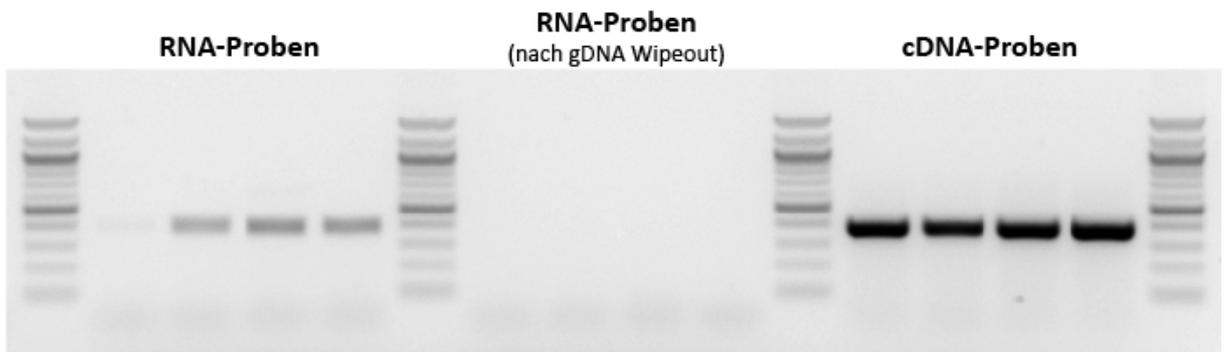


Abbildung 15: Ethidiumbromid-Agarosegel nach GAPDH Kontroll-PCR

Beispiel der elektrophoretisch aufgetrennten GAPDH Kontroll-PCR einer RNA-Isolierung mit Umschreiben in cDNA. Die RNA-Proben weisen deutliche GAPDH-PCR-Produkte auf, die nach dem Entfernen der gDNA-Reste nicht mehr nachweisbar ist. Erst nach dem Umschreiben der RNA-Proben in cDNA lassen sich wieder GAPDH-Produkte amplifizieren.

7.3. DNA-Isolierung aus Mausschwanzspitzen

Die Isolierung der genomischen DNA aus Mausschwanzspitzen zur Genotypisierung der konditionalen Knockout-Mäuse erfolgte mittels High Pure PCR Template Preparation Kit der Firma Roche. Das Vorgehen entsprach dem Herstellerprotokoll für die Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen und unterschied sich lediglich in dem Elutionsvolumen, welches auf 150 µl herabgesetzt war.

7.4. Genotypisierung

Für die Genotypisierung der aufgereinigten DNA Proben mittels PCR wurden die Reaktionsansätze nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 5: Pipettierschema Genotypisierungs-PCR

Tabellarische Zusammenfassung der für je 20 µl PCR-Ansatz eingesetzten Reagenzien.

Reagenz	Volumen [µl]
H ₂ O-HPLC	15,28 - 16,78
10x PCR Puffer	2,0
dNTP-Mix	0,4
Forward-Primer	0,1
Reverse-Primer	0,1
Hot-Star Taq Polymerase	0,12
DNA-Probe	0,5 - 2,0

Als Forward- beziehungsweise Reverse-Primer dienen die in *Tabelle 6* aufgelisteten Primer. Die Reaktion wurde mit Hilfe eines Thermocyclers unter den in *Tabelle 7* zusammengefassten Reaktionsparametern durchgeführt.

Tabelle 6: Primersequenzen Genotypisierung

Basensequenzen der für die Genotypisierungs-PCR verwendeten Primer

Primer	Basensequenz
mouse geno_p38_FP1	CTACAGAATGCACCTCGGATG
mouse geno_p38_RP1	AGAAGGCTGGATTTGCACAAG
mouse geno_p38_KO	CCAGCACTTGGAAGGCTATTC

Im Anschluss wurden die Proben mit 5X Orange G Ladepuffer versetzt und auf einem 2%igen Agarose-Ethidiumbromidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand der Größe der PCR-Produkte konnte so beurteilt werden, ob die Deletion durch die Cre-Rekombinase stattgefunden hat oder ob es sich um ein Wildtyp-Tier handelt.

Tabelle 7: PCR-Zyklen

Übersicht der bei der Genotypisierungs-PCR durchgeführten Reaktionsschritte. Angegeben sind Temperatur und Dauer jedes Schrittes. Die Schritte „Denaturierung“, „Primer-Hybridisierung“ und „Polymerisation“ wurden 35 Mal hintereinander wiederholt.

	Dauer	Temperatur	
Initial-Denaturierung	15 Min	95°C	
Denaturierung	30 Sek	95°C	} 35 Zyklen
Primer-Hybridisierung	30 Sek	62°C	
Polymerisation	30 Sek	72°C	
Final-Polymerisation	5 Min	72°C	

8. Urin – Analyse

8.1. Vorbereitung

Vor Beginn eines jeweiligen Versuches wurden alle Mäuse langsam an mehreren aufeinander folgenden Tagen an die metabolischen Käfige gewöhnt. Dadurch sollte die Stressbelastung für die Mäuse aufgrund der unbekannteren und unbequemen Umgebung auf ein Minimum reduziert werden. Vor allem Stress induzierte Verfälschungen der Versuchsergebnisse sollten so verhindert werden. Während des gesamten Aufenthalts in den metabolischen Käfigen, hatten die Tiere freien Zugang zu Futter und Trinkwasser.

8.2. Probengewinnung

Nach Abschluss dieser Eingewöhnungszeit wurden die Mäuse zu ausgewählten Zeitpunkten für mehrere Stunden in metabolischen Käfigen gehalten. Dabei kann durch die spezielle Konstruktion der Käfige der Urin vom Kot und anderem groben Schmutz getrennt und in einem Sammelgefäß aufgefangen werden (vergleiche *Abbildung 16*).

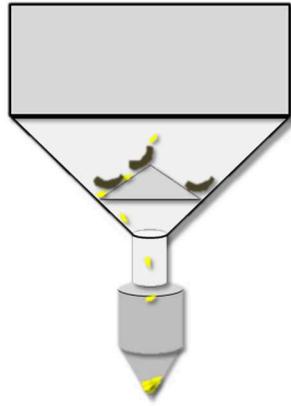


Abbildung 16: Funktionsprinzip der Kot- und Urintrennung in den metabolischen Käfigen

Mittels eines Trichters werden sämtliche Ausscheidungen des Versuchstiers, welches auf einem Gitter oberhalb des Trichters sitzt, aufgefangen. Durch eine eingesetzte, über der Austrittsöffnung platzierte Pyramide, werden feste, größere Partikel zurückgehalten. Flüssigkeiten können am Rand, zwischen Trichterwand und Pyramide hindurchfließen und gelangen so in den Probenauffangbehälter.

8.3. Probenvorbereitung

Anschließend wurde der gesammelte Urin 5 Minuten bei 400 xg zentrifugiert, um Verunreinigungen zu entfernen. Das dabei entstandene Pellet wurde bei einigen Teilversuchen direkt mit 70 µl 2X Laemmli versetzt und 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurde der Überstand erneut 1 Minute bei 20817 xg zentrifugiert. Der so gereinigte Urin wurde nachfolgend für die qualitative (siehe 8.4 Gelelektrophorese und Coomassie – Färbung) und quantitative Analyse (siehe 8.5 Albumin- und Kreatininbestimmung) portioniert und bei -20°C kurzzeitig gelagert.

8.4. Gelelektrophorese und Coomassie – Färbung

Für die qualitative Analyse wurde der zu untersuchende Mausurin im Verhältnis 1:1 mit 2X Laemmli Puffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden kurz auf Eis abgekühlt und nicht solubilisierbare Bestandteile durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 20817 xg abgetrennt. Ein BSA-Standard und je 1 µl Urin jeder Probe wurden mittels 10% SDS-PAGE bei 100 V für das Sammelgel und 25 mA/Gel für das Trenngel aufgetrennt. Die PA-Gele wurden folgend für eine Stunde in Fixing-Solution inkubiert und 3-5 Minuten in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Anschließend erfolgte die Entfärbung der unspezifisch gefärbten Bereiche durch wiederholtes Inkubieren der Gele in Destaining-Solution bis deutliche Proteinbanden erkennbar waren. Abschließend wurden die Ergebnisse der Coomassie-gefärbten PA-Gele mittels CCD-Imager fotografisch festgehalten.

8.5. Albumin- und Kreatininbestimmung

Die Bestimmung der Albuminkonzentration wurde extern von der Firma CellTrend GmbH, Luckenwalde durchgeführt. Die Kreatininmessung erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf. Zur Normierung der Albuminausscheidung wurde die Albuminkonzentration auf den Kreatiningehalt bezogen. Daraus ergibt sich für jede Maus die Albuminausscheidung pro ausgeschiedenem Kreatinin (Albumin-Kreatinin-Ratio, UACR, $\frac{\text{Albumin [mg]}}{\text{Kreatinin [g]}}$).

9. Immunhistologie

Die Konservierung des Nierengewebes zur histologischen Analyse erfolgte unmittelbar nach der Perfusion der Nieren mit PBS. Dazu wurden die Nierenpole über Nacht in 10% neutral gepuffertem Formalin inkubiert. Nach dieser Fixierung folgten die Entwässerung und Paraffinierung des Gewebes. Dabei wurden die Proben nacheinander jeweils 60 Minuten in Ethanolverdünnungen steigender Konzentration inkubiert. Darauf folgte die Inkubation in Xylol und anschließend in flüssigem Paraffin. Der Ablauf ist in *Abbildung 17* schematisch dargestellt. Abschließend wurden die Gewebeproben mit flüssigem Paraffin in Formen gegossen und zum Aushärten auf eine Kühlplatte gestellt.

Die Schnitte und Färbungen zur Untersuchung einer möglichen Co-Lokalisierung von Nephryn und einem Marker für das frühe Endosom (EEA1) wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. med. Catherine Meyer-Schwesinger und Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Wiech am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

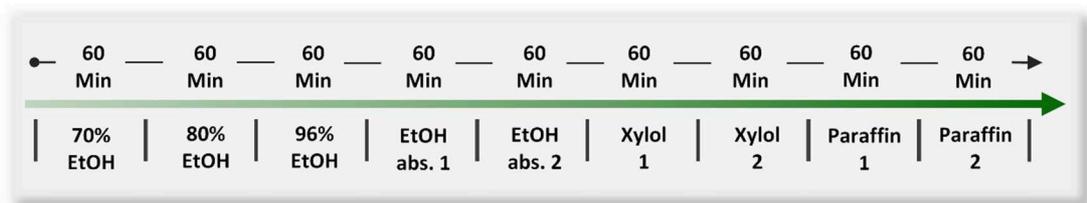


Abbildung 17: Schematischer Ablauf der Gewebeprozessierung für die Einbettung in Paraffin

Zeitlicher Überblick der Reihenfolge der unterschiedlichen Entwässerungsschritte. Jeder Inkubationsschritt wurde über 60 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde durch kurzes Abtropfen die Verschleppung der Gemische/ Reagenzien reduziert.

Die Färbungen zur Bestimmung der p38-Verteilung bei $p38\alpha^{fl/fl}$ und $p38\alpha^{PodKO-}$ Mäusen konnten intern durchgeführt werden. Dazu wurden von den in Paraffin konservierten Nierenpolen mittels Mikrotom 3-4 μm dünne Schnitte angefertigt. Diese

wurden nach Aufziehen auf Objektträger bei Raumtemperatur entparaffiniert und gewässert. Dazu wurden die Schnitte nacheinander zweimal je 5 Minuten in 100% Xylol inkubiert. Anschließend folgten je dreiminütige Inkubationsschritte zweimal in 100% Ethanol, in 96% Ethanol, in 80% Ethanol und in 70% Ethanol. Abschließend wurden die Schnitte zweimal in Aqua dest. inkubiert (siehe *Abbildung 18*).



Abbildung 18: Schematischer Ablauf der Entparaffinierung als Vorbereitung der immunhistologischen Färbung

Reihenfolge und Inkubationszeiten der Entparaffinierungsreihe. Nacheinander wurden die Nierenschnitte in den verschiedenen Lösungen entsprechend der angegebenen Zeiten inkubiert. Beim Überführen der Schnitte wurde durch kurzes Abtropfen sichergestellt, dass möglichst wenig Inkubationslösung verschleppt wird.

Im Anschluss an die Entparaffinierung erfolgte die Antigendemaskierung mittels Target Retrieval Solution pH 6.1 im Wasserbad bei 96°C für 10 Minuten und das Abkühlen bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Die Schnitte wurden zweimal in Aqua dest. gewaschen und 10 Minuten in 3% H₂O₂ bei Raumtemperatur inkubiert, um endogene Peroxidasen zu blockieren. Es folgte ein erneuter, zweimaliger Waschschritt mit Aqua dest.. Die weitere Blockierung erfolgte durch eine 20-minütige Inkubation der Schnitte in der im ImmPRESS™ Kit enthaltenen, gebrauchsfertigen Blockier-Lösung. Über Nacht wurde die Inkubation mit dem 1:400 verdünnten rb-anti-p38 Antikörper bei 4°C durchgeführt.

Am nachfolgenden Tag wurden die Schnitte zweimal 5 Minuten in Dako-Waschpuffer gewaschen, bevor die 30-minütige Inkubation in ImmPRESS™ Reagent Anti-Rabbit IgG bei Raumtemperatur folgte. Die Schnitte wurden erneut zweimal 5 Minuten mit Dako-Waschpuffer gewaschen und 5 Minuten mit Liquid DAB+ Substrat bei Raumtemperatur inkubiert. Die DAB-Lösung wurde mit Aqua dest. abgewaschen und die Schnitte für 40 Sekunden in Hämalaun-Lösung inkubiert. Unter fließendem Wasser erfolgte die Färbung für 10 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte dehydriert und mittels Roti®-Mount für die Mikroskopie eingedeckelt.

10. Graphische und statistische Auswertung

Die Überprüfung der Ergebnisse auf ihre statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test oder einseitigem ANOVA durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt. Die graphisch dargestellten Ergebnisse zeigen jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung. Jede einzelne in den Graphen dargestellte statistische Auswertung bezieht sich auf die zu Beginn und zu Ende einer Klammer befindlichen Versuchsgruppen in einem Graphen. Zur Veranschaulichung der statistischen Ergebnisse werden in den Graphen die in *Tabelle 8* zusammengefassten Symbole verwendet.

Tabelle 8: Bedeutung der verwendeten statistischen Kürzel in Graphen

Kürzel	Bedeutung
ns	nicht signifikant
*	$0,01 < p < 0,05$
**	$0,001 < p < 0,005$
***	$0,0001 < p < 0,0005$
****	$p < 0,0001$

Die graphische Darstellung der Messwerte, sowie die statistische Auswertung erfolgten in GraphPad Prism 6 (v6.01). Die Verteilung der Ergebnisse wurde zusätzlich zu den Erwartungen entsprechend des Versuchsaufbaus soweit möglich mittels Q-Q-Plot überprüft. Für normalverteilte Ergebnisse wurde zur Überprüfung der Signifikanz der ungepaarte t-Test mit Welch's Korrektur in Anlehnung an *Ruxton (2006)* angewendet. Nicht-normalverteilte Ergebnisse wurden mit Hilfe des Mann-Whitney Tests überprüft.

Ergebnisse

1. Überprüfung des Biotinylierungsassays

Die Überprüfung der Funktionsfähigkeit des in den folgenden Modellen verwendeten Biotinylierungsassays erfolgte an männlichen C57Bl/6 Mäusen im Alter von 6–8 Wochen. Dazu wurden abwechselnd Tiere mit PBSCM oder 0,5 mg/ml Biotin in PBSCM perfundiert. Das Vorgehen entsprach dem in *5 Biotinylierungsassay* beschriebenen Protokoll. Nach der Perfusion der Tiere und der Aufreinigung der Glomeruli mit anschließender Lyse, wurde die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt. Die Proteinkonzentration und das Probenvolumen wurden angeglichen und

ein Teil der Probe wurde als Lysat-Kontrolle abgenommen. Nach der Affinitätsreinigung der restlichen Probe mittels Streptavidin-Chromatographie, konnten die Proben aus den aufgereinigten Fraktionen und den Lysat-Kontrollen mittels Western Blot und anschließender Immunfärbung nachgewiesen werden. *Abbildung 19* zeigt die entscheidenden Abschnitte des Western Blots der Lysate und der affinitätsgereinigten Fraktionen. Sowohl in den Lysaten der Kontrollen, als auch bei den Biotin-perfundierten Tieren ließen sich auf diese Weise die Zielproteine gleichermaßen nachweisen. Während die Oberflächenproteine Nephrin und Podocalyxin in den affinitätsgereinigten Proben der mit Biotin perfundierten Tiere nachgewiesen werden konnten, waren zytoplasmatische Proteine wie ERK und β -Aktin nicht detektierbar. In den affinitätsgereinigten Proben der Kontrolltiere konnte keines der Zielproteine nachgewiesen werden.

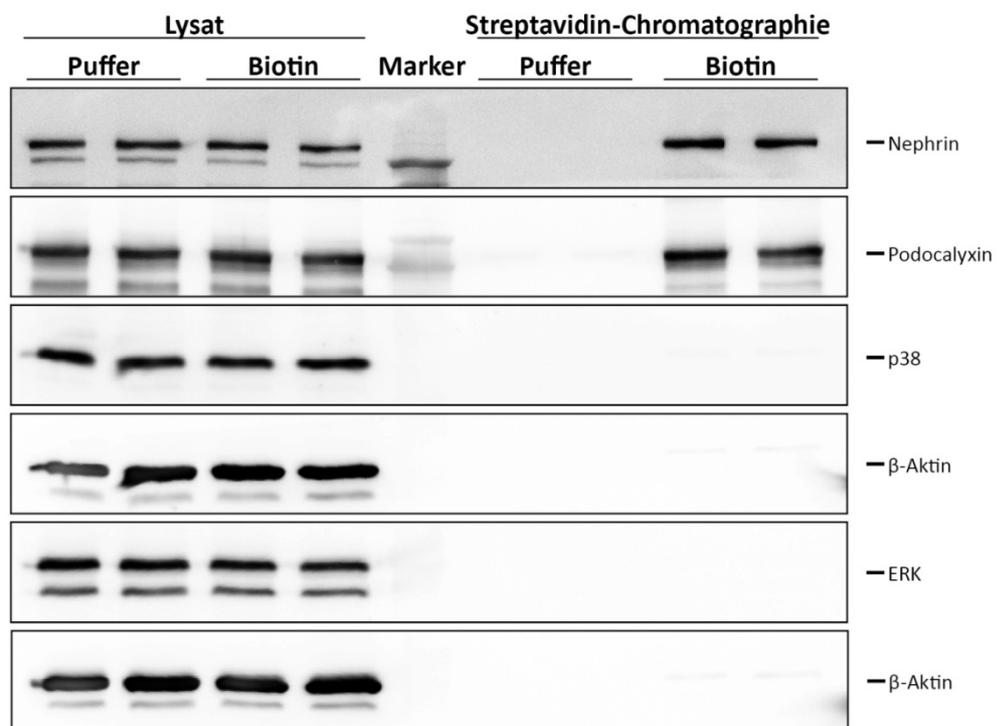


Abbildung 19: Überprüfung des Biotinylierungsassays durch Nachweis unterschiedlicher membranständiger und zytoplasmatischer Proteine

6 – 8 Wochen alte männliche C57Bl/6 Mäuse wurden mittels PBSCM in An- beziehungsweise Abwesenheit von Biotin perfundiert. Die Lysate aus isolierten Glomeruli wurden mit Hilfe einer Streptavidin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Im Western Blot erfolgte der Nachweis ausgewählter membranständiger und zytoplasmatischer Proteine in den Glomerulilysaten und in den aufgereinigten Proben. Alle Proteine konnten in den Lysatproben beider Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Während zytoplasmatische Proteine in den affinitätsgereinigten Fraktionen nicht nachweisbar waren, konnten Membranproteine aus den Biotin-perfundierten Glomeruli spezifisch detektiert werden. (Abbildung verändert übernommen aus *Haase, Potthoff et al. (2017)*)

2. Doxorubicin-Nephropathie

Im Modell der Doxorubicin-Nephropathie wiesen die untersuchten BALB/c Mäuse zu Beginn des Versuchs keine Unterschiede in Bezug auf Körpergewicht und Albuminurie auf. Ziel des Modells war es, den Verlauf der Proteinurie und die molekulare Veränderung der Schlitzmembran bei einer fokal segmentalen Glomerulosklerose zu untersuchen. Während im Verlauf der Krankheit das Körpergewicht auch an Tag 7 keinen signifikanten Unterschied zu den zu Beginn des Versuchs erhobenen Werten aufweist (ADR: Tag 1 $22,73 \pm 1,126$ (n = 9), Tag 7 $22,18 \pm 1,435$ (n = 9), $p = 0,0708$, *Abbildung 20 A*), zeigen die mit Doxorubicin behandelten Tiere einen signifikanten Anstieg der Albuminausscheidung bereits ab Tag 3 (siehe *Abbildung 20 B*). Die Stärke der Albuminurie steigt im Mittel bis auf knapp das 3000-fache des Ausgangswertes an Tag 7 an (Tag 7: Kontrolle $23,57 \pm 0,43$ (n = 7), ADR $22,18 \pm 0,48$ (n = 9), $p = 0,0475$, *Abbildung 20 B*).

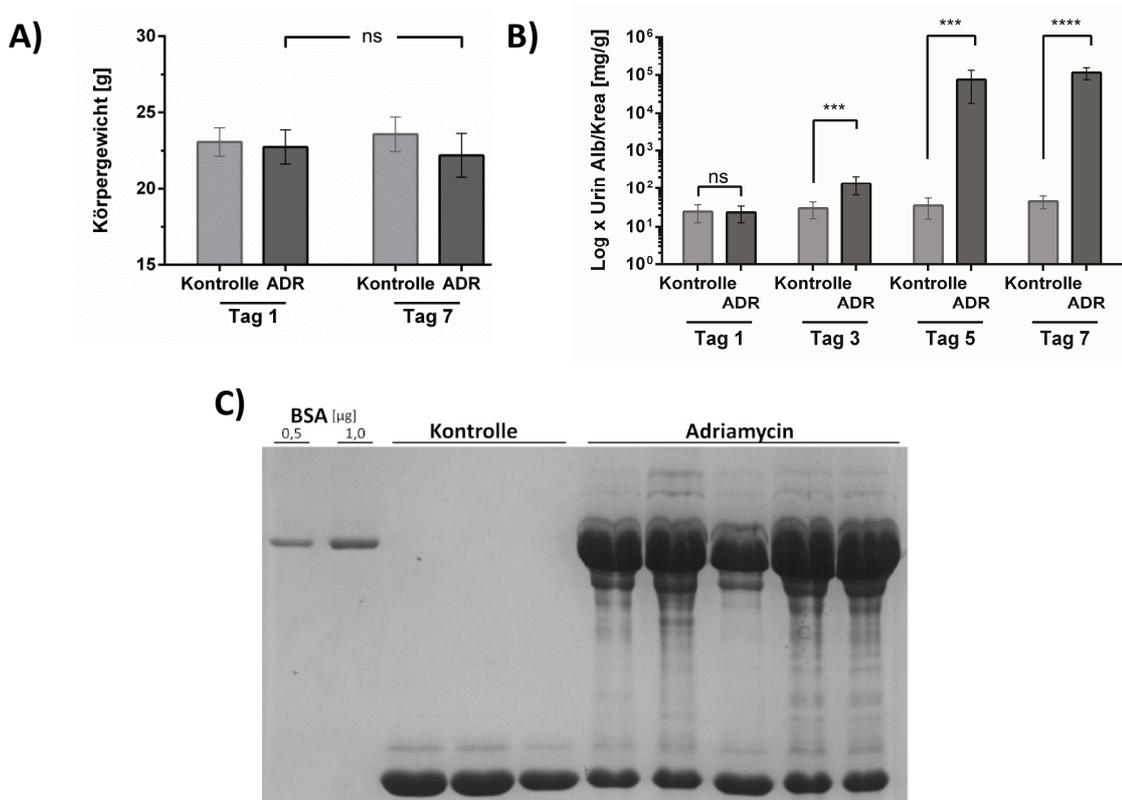


Abbildung 20: Kontrolle des Körpergewichts und Verlauf der Albuminausscheidung nach Doxorubicin-Behandlung

A) Körpergewicht bei Kontrollen und ADR-behandelten BALB/c Tieren Im Versuchsverlauf kommt es zu keiner signifikanten Veränderung des Körpergewichtes durch die ADR-Behandlung (ADR: Tag 1 $22,73 \pm 1,126$ (n = 9), Tag 7 $22,18 \pm 1,435$ (n = 9), $p = 0,0708$). **B) UACR bei Kontrollen und ADR-behandelten Tieren** Zu Beginn des Versuchs weisen alle Versuchstiere gleiche Mengen an ausgeschiedenem Albumin [mg]/Kreatinin [g] auf. Nach der Doxorubicin-Injektion steigt die Albuminausscheidung bei den ADR-behandelten Tieren bis Tag 7 kontinuierlich an. Signifikante

Unterschiede zu der Kontrollgruppe sind bereits ab Tag 3 zu erkennen. Tag 1: Kontrolle $21,77 \pm 4,23$ (n = 9), ADR $22,74 \pm 2,87$ (n = 12), $p = 0,8513$; Tag 7: Kontrolle $45,27 \pm 6,257$ (n = 7), ADR 129292 ± 18443 (n = 11), $p = < 0,0001$. (Ergebnis teilweise veröffentlicht in *Haase, Potthoff et al. (2017)*) **C) Coomassie-Gel der Urinproben von ADR-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe** Aufgetrennt wurden jeweils 1 μ l des gewonnenen Sammelurins der Kontrolltiere, sowie der ADR-behandelten Tiere. Als Referenz wurden 0,5 μ g und 1 μ g BSA ebenfalls aufgetrennt. Nach Färbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue weisen die ADR-behandelten Tiere eine sichtbare Proteinbande in Höhe der BSA-Referenz auf. Die Intensität der Albuminbanden bei den ADR-behandelten Tieren deutet auf eine Albuminausscheidung von mehr als 1 μ g/ μ l hin. (Abbildung abgeändert veröffentlicht in *Haase, Potthoff et al. (2017)*)

Die ausgeschiedene Proteinmenge wird optisch vor allem im Coomassie-Gel der Urinproben sichtbar (*Abbildung 20 C*). Während die Sammelurine der Kontrolltiere an Tag 7 keine Albuminbande erkennen lassen, ist ausgeschiedenes Albumin im Sammelurin der ADR-behandelten Tiere nachweisbar. Bei 1 μ l aufgetragenem Urin übersteigen die Proben optisch die maximale Referenzmenge von 1 μ g BSA.

Die histologische Untersuchung der Nieren dieser Versuchstiere zeigt Unterschiede der Nephrinteilung im Glomerulum (*Abbildung 21*). Während die Kontrollen einen scharfen, linearen Färbungsverlauf aufweisen, zeigen die Proben ADR-behandelter Tiere eine eher diffuse Färbung. Es kommt zu deutlichen Zerstreuungen und Unterbrechungen der Nephrintfärbung.

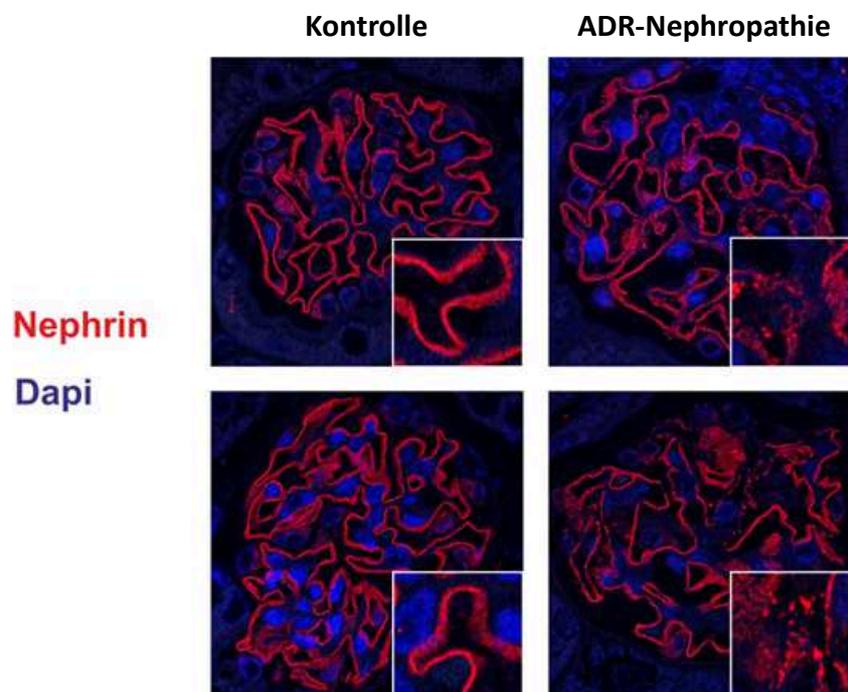


Abbildung 21: Immunhistologische Nephrin-Färbung muriner Glomeruli

Zusammenstellung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen der repräsentativen Nierenfärbungen ADR-behandelter Mäuse und entsprechender Kontrollen. Die Aufnahmen zeigen Glomeruli an Tag 7 des Versuchsverlaufs. Rot angefärbt ist Nephrin. In Blau sind die Zellkerne mittels DAPI angefärbt. Jedes Bild

zeigt die Glomeruli-Aufsicht, sowie einen Detailbereich mit besonders markanter Nephrintfärbung. Im Gegensatz zu dem linearen Färbemuster der Nephrintfärbung bei den Kontrolltieren, weisen die ADR-behandelten Tiere an Tag 7 ein deutlich diffuses Muster auf. Diese Färbungen wurde freundlicherweise von Prof. Dr. med. Wiech (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) angefertigt.

Auch bei der weitergehenden biochemischen Analyse der isolierten Glomeruli mittels Western Blot, ist ein Einfluss der ADR-Nephropathie auf Nephtrin erkennbar. In den Glomeruli ADR-behandelter Tiere zeigt sich eine signifikante Reduktion des an der Oberfläche exprimierten Nephtrins. Im Vergleich zu den Kontrollen ist der Anteil um 53% signifikant reduziert (Kontrolle $100,0 \pm 4,34$ (n = 6), ADR $46,74 \pm 8,79$ (n = 8), $p = 0,0003$, *Abbildung 22 A*). Gleichzeitig ist auch die Gesamtmenge an Nephtrin um 71% signifikant reduziert ($100,0 \pm 5,76$ (n = 6), ADR $28,61 \pm 7,32$ (n = 8), $p < 0,0001$, *Abbildung 22 B*).

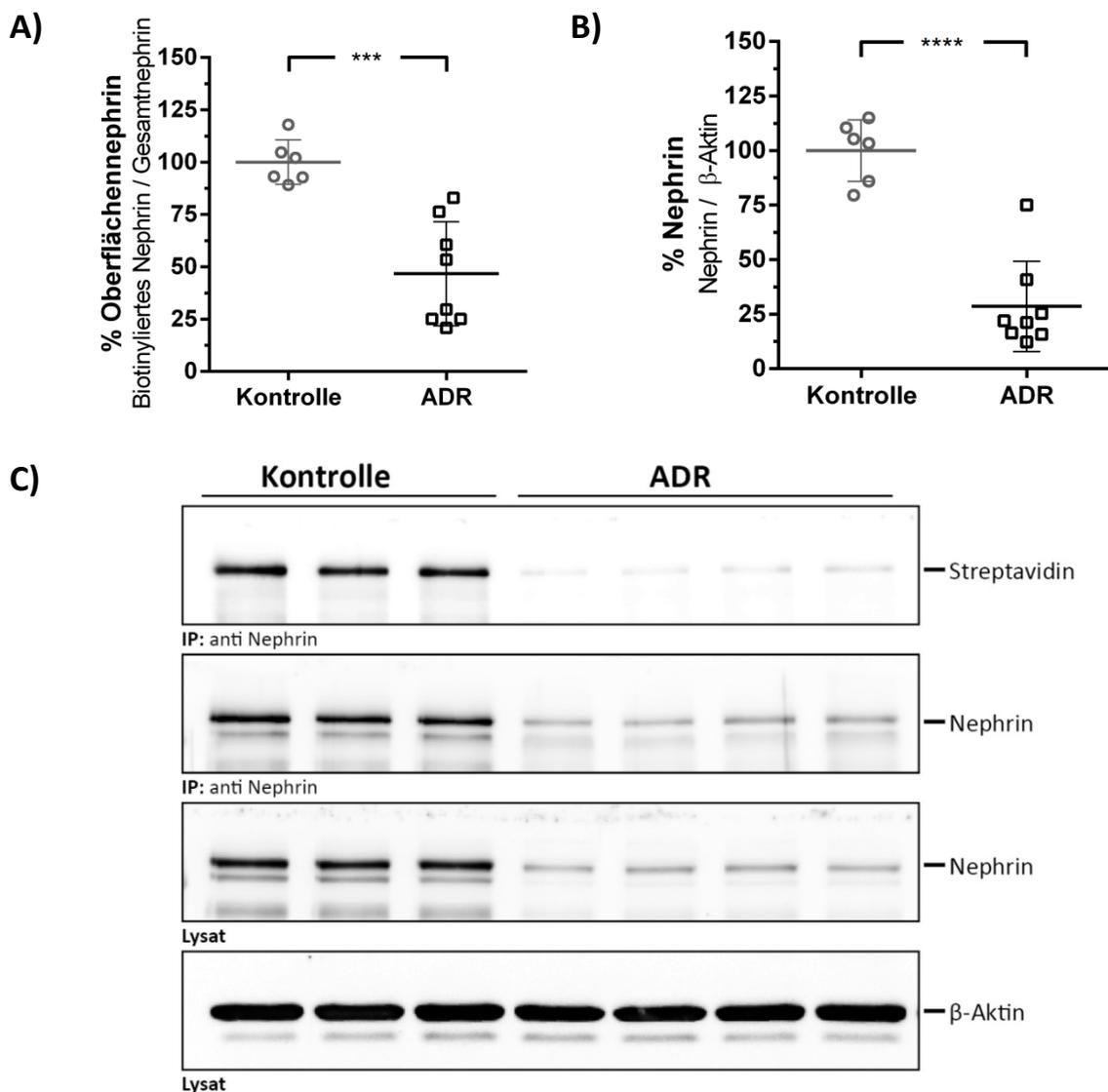


Abbildung 22: Einfluss der Doxorubicin-Behandlung auf Nephtrin

A) Anteil des Oberflächennephtrins bei behandelten- und Kontroll-Tieren Der Graph zeigt Unterschiede im Anteil des an der Oberfläche exprimierten Nephtrins bei behandelten- und Kontroll-Tieren. Nephtrin IPs aus Glomerulilysaten wurden mittels Western Blot analysiert und densitometrisch ausgewertet. Eine signifikante Abnahme des Oberflächennephtrins zum Zeitpunkt der Organentnahme ist bei den

behandelten Tieren zu verzeichnen. Kontrolle $100,0 \pm 4,34$ ($n = 6$), ADR $46,74 \pm 8,79$ ($n = 8$), $p = 0,0003$. **B) Gesamtnephrin im Doxorubicin-Modell** Gesamtnephrin Messung bei behandelten- und Kontrolltieren in Glomerulilysaten mittels Western Blot. Die densitometrische Analyse zeigt eine signifikante Reduktion des Gesamtnephrins bei den behandelten Tieren. Die Messwerte wurden mittels β -Aktin als Ladekontrolle korrigiert und auf den Wildtyp bezogen. Kontrolle $100,0 \pm 5,76$ ($n = 6$), ADR $28,61 \pm 7,32$ ($n = 8$), $p = < 0,0001$. **C)** Repräsentative Ausschnitte der Western Blots der IP und der Lysate zum Nachweis von Oberflächen- und Gesamtnephrin. (Abbildungen A-C verändert veröffentlicht in *Haase, Potthoff et al. (2017)*)

Die weitergehende immunhistologische Betrachtung der Glomeruli (*Abbildung 23*) mit Fokus auf die Nephrin- und EEA1-Verteilung zeigt, dass es zu einer Überlagerung dieser Signale in den Glomeruli der ADR-Gruppe kommt. Dahingegen weist die Kontrollgruppe keine derartige Überlagerung im Glomerulum auf.

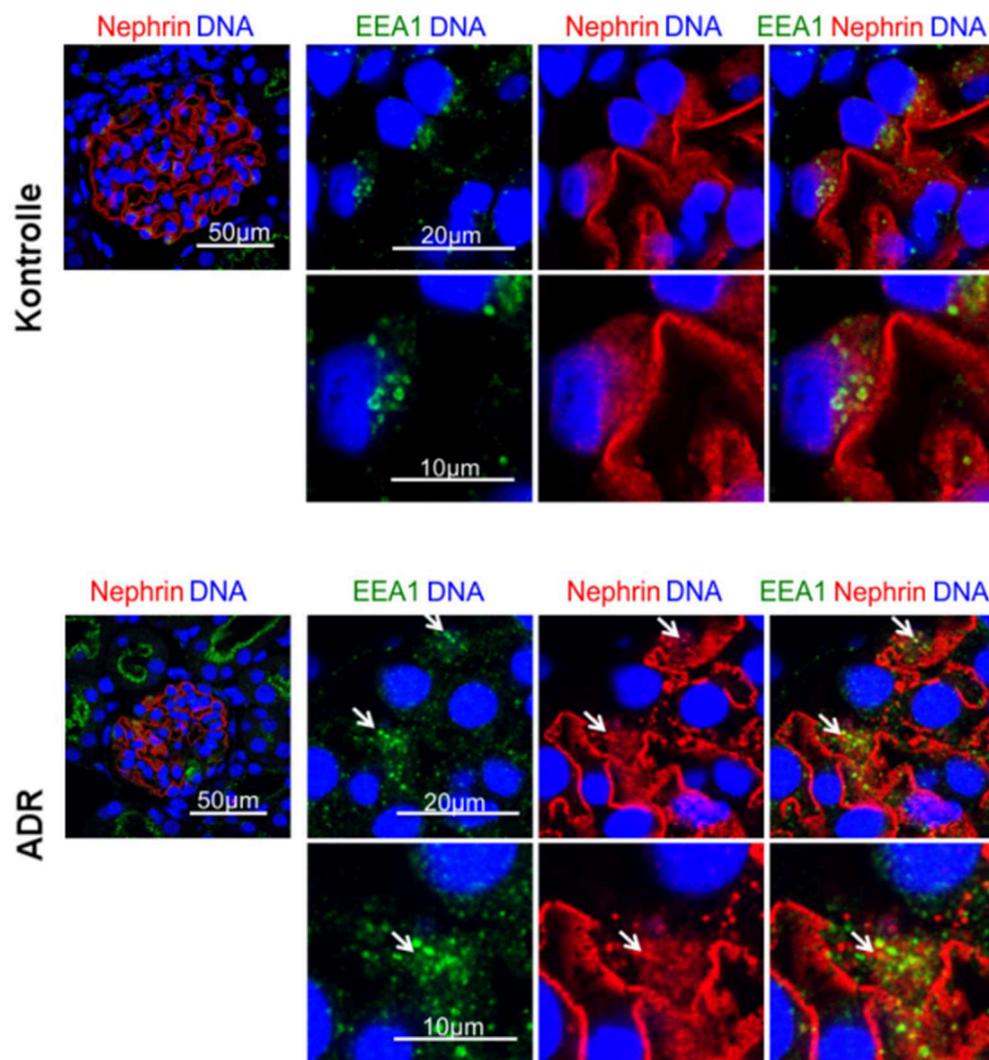


Abbildung 23: Nephrin- und EEA1-Färbung an murinen Nierenschnitten im ADR-Modell

Dargestellt sind repräsentative Nierenschnitte der Kontroll- und ADR-Mäuse an Tag 7 im ADR-Modell. Die Ausschnitte zeigen glomeruläre Strukturen in der Übersicht, sowie vergrößerte Teilbereiche. Angefärbt wurden Nephrin (rot) und EEA1 (grün). Die Kontrollen weisen keine Überlagerung der Nephrin- und EEA1-

Signale auf. Dahingegen kommt es bei der ADR-behandelten Versuchsgruppe zu Überlagerungen der Signale (weiße Pfeile). Diese Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. med. Meyer-Schwesinger (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) angefertigt und in *Haase, Potthoff et al. (2017)* abgeändert veröffentlicht.

Weiterhin scheint die Größe der Glomeruli der ADR-behandelten Tiere im Vergleich zu den Glomeruli der Kontrolltiere reduziert zu sein. Die Analyse des podozytären Zytoskelett-Markers Synaptopodin in *Abbildung 24 A* zeigt im Western Blot eine spezifische Bande bei 135 kDa. Wie auch bei der biochemischen Betrachtung von Nephryn, kommt es durch die ADR-Behandlung zu einer signifikanten Reduktion von Synaptopodin. Dabei ist die Menge an Synaptopodin in den Glomerulilysaten der ADR-behandelten Tiere um 85% signifikant reduziert ($100,0 \pm 10,20$ ($n = 6$), ADR $15,62 \pm 2,66$ ($n = 8$), $p = 0,0003$, *Abbildung 24*).

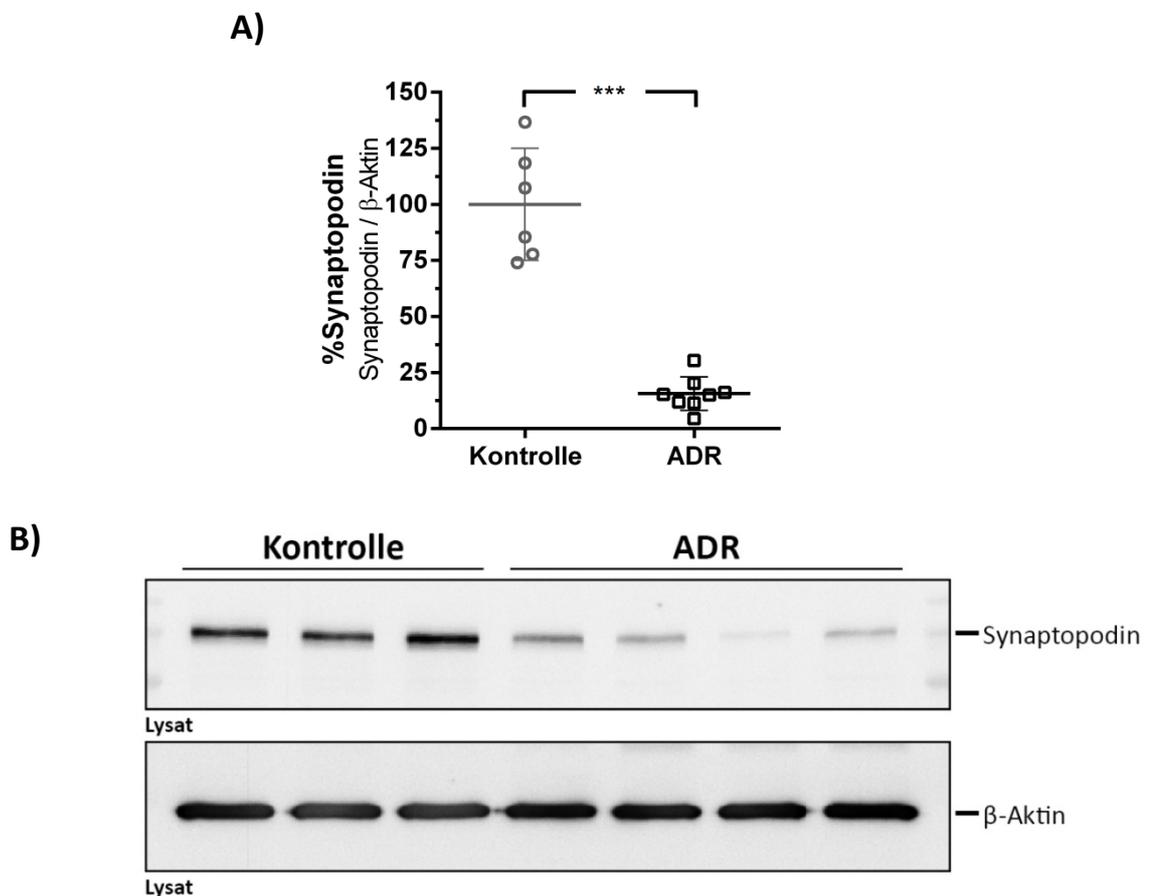


Abbildung 24: Western Blot zum Nachweis von Synaptopodin in Glomerulilysaten

A) Densitometrische Auswertung der Synaptopodin Expression Vergleich der Synaptopodin Expression bei den Kontrollen und den ADR-behandelten Tieren. Die ADR-behandelte Versuchsgruppe weist eine um 84% reduzierte Synaptopodin Expression im Vergleich zur Kontrolle auf. Die Messwerte wurden mittels β -Aktin als Ladekontrolle korrigiert und auf den Wildtyp bezogen. Kontrolle $100,0 \pm 10,20$ ($n = 6$), ADR $15,62 \pm 2,66$ ($n = 8$), $p = 0,0003$. **B) Repräsentative Western Blot Ausschnitte** Dargestellt sind die aufgetrennten Glomerulilysate von ADR-behandelten Tieren und den zugehörigen Kontrollen. Der obere Ausschnitt zeigt den Nachweis von Synaptopodin, während der untere Ausschnitt die Ladekontrolle mit β -

Aktin darstellt. Eine spezifische Bande lässt sich für Synaptopodin bei 135-140 kDa ausmachen. Die Ladekontrolle zeigt eine gleichmäßige geladene Porteinmenge bei allen aufgetragenen Proben.

3. Nephrotoxische Nephritis

Bei dem Modell der Nephrotoxischen Nephritis sind bereits 24 Stunden nach der Injektion des Immunerums erste Auswirkungen auf die Nierenfunktion zu erkennen. Die Analyse der Albuminausscheidung 12 – 24 Stunden nach der Injektion zeigt signifikant erhöhte Werte bei den antiGBM-Serum behandelten Tieren (Kontrolle 17,65 (n = 4), NTN 280,4 (n = 6), $p = 0,0095$, *Abbildung 25*). Die Albuminausscheidung pro Gramm Kreatinin ist um das 15-fache im Vergleich zu den Kontrollen erhöht.

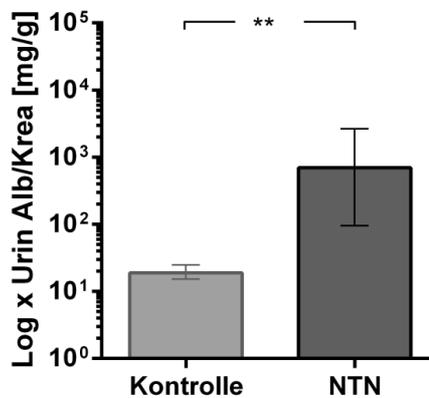


Abbildung 25: Albuminausscheidung an Tag 1 nach Seruminjektion

Albuminausscheidung normiert auf den Kreatiningehalt im Sammelurin 24 Stunden nach Injektion des nephrotoxischen Serums. Die behandelten Tiere weisen eine um das 15-fache signifikant erhöhte Albuminausscheidung im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Kontrolle 17,65 (n = 4), NTN 280,4 (n = 6), $p = 0,0095$. (Ergebnis veröffentlicht in *Haase, Potthoff et al. (2017)*)

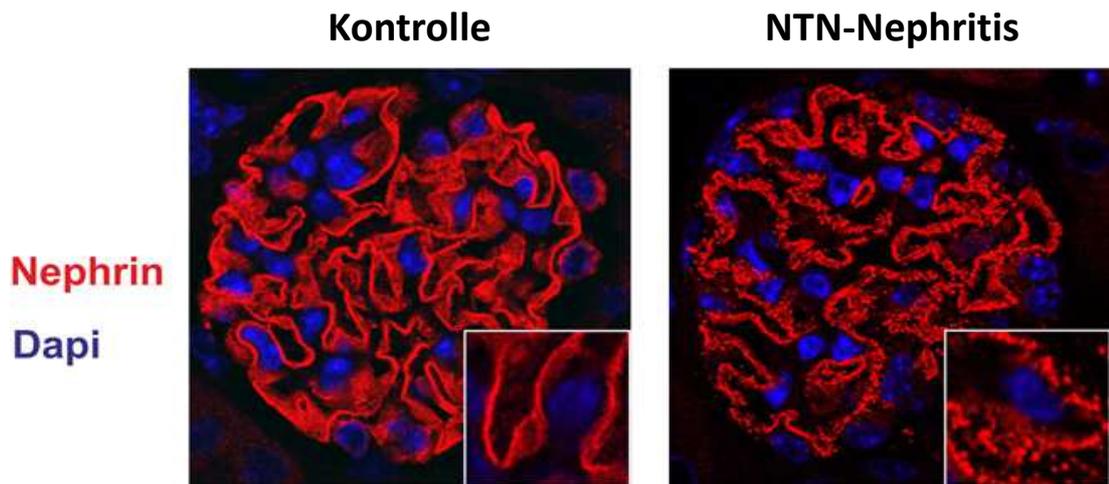


Abbildung 26: Immunhistologische Untersuchung der Nephtrinverteilung im Glomerulum
 Abgebildet sind Immunhistologische Färbungen muriner Nierenschnitte an Tag 7 im ADR-Modell. Die Kontrolle zeigt ein gleichmäßiges lineares Nephtrin-Färbemuster. Dahingegen ist die Nephtrinverteilung im Glomerulum des ADR-behandelten Tieres deutlich unterbrochen. Der untere rechte Bildabschnitt zeigt repräsentativ einen vergrößerten Ausschnitt aus der Übersicht. In Blau sind die Zellkerne mittels DAPI-Färbung dargestellt. Diese Aufnahmen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. Wiech (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) angefertigt.

Histologisch zeigt die Untersuchung der glomerulären Strukturen und speziell der Nephtrinfärbung bei den Kontrolltieren ein lineares Nephtrin-Verteilungsmuster. Dahingegen ist die Nephtrinverteilung 24 Stunden nach der Injektion des antiGBM-Serums auffällig unterbrochen. Das lineare Verteilungsmuster weicht einer eher granulären Verteilung (*Abbildung 26*). Die Vergrößerungen zeigen bei den antiGBM-behandelten Tieren eine körnige Nephtrinfärbung.

Darüberhinausgehend weisen die Versuchsgruppen molekular keinen Unterschied an Gesamtnephtrin in den Glomerulilysaten auf (Kontrolle $100,0 \pm 10,29$ ($n = 4$), NTN $97,32 \pm 10,78$ ($n = 6$), $p = 0,8619$, *Abbildung 27 B*). Der an der Oberfläche exprimierte Nephtrin-Anteil ist bei den antiGBM-behandelten Tieren 24 Stunden nach der Injektion jedoch signifikant um 57% reduziert (Kontrolle $100,0 \pm 14,71$ ($n = 4$), NTN $43,47 \pm 5,18$ ($n = 6$), $p = 0,0248$, *Abbildung 27 A*).

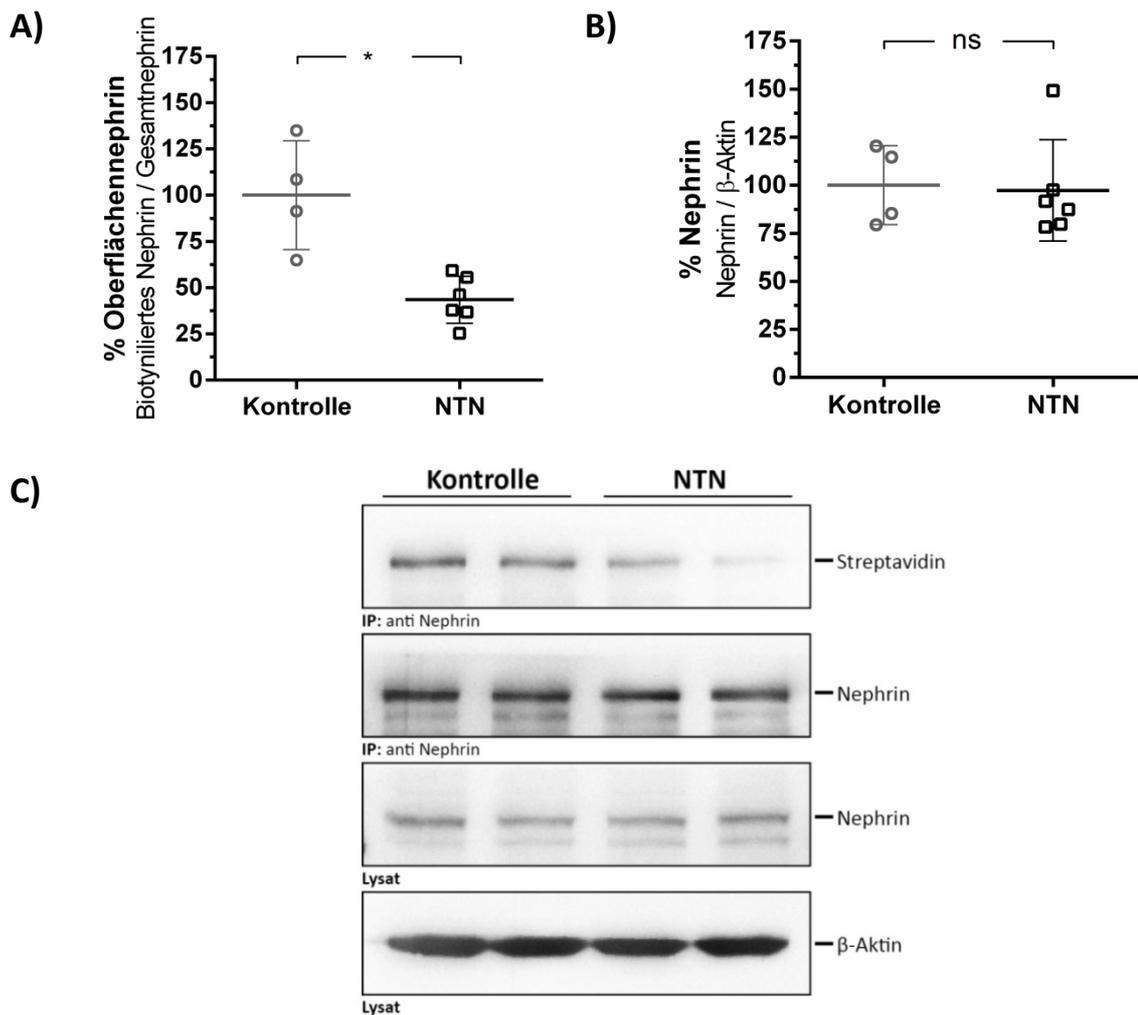


Abbildung 27: Einfluss auf Nephrin 24 Stunden nach Seruminjektion

A) Anteil membranständigen Nephrens nach NTN-Serum Behandlung Bei den NTN-behandelten Tieren ist eine signifikante Reduktion des an der Oberfläche exprimierten Nephrens zu verzeichnen. Die Reduktion beträgt 57% des bei der Kontrollgruppe gemessenen Oberflächenephrens. Kontrolle $100,0 \pm 14,71$ (n = 4), NTN $43,47 \pm 5,18$ (n = 6), $p = 0,0248$. **B) Gesamtnephrin nach NTN-Serum Behandlung** 24 Stunden nach der NTN-Injektion sind keine signifikanten Unterschiede zwischen der behandelten und der unbehandelten Versuchsgruppe festzustellen. Die Messwerte sind auf β-Aktin als Ladekontrolle bezogen und auf die Expression der Kontrollen normiert. Kontrolle $100,0 \pm 10,29$ (n = 4), NTN $97,32 \pm 10,78$ (n = 6), $p = 0,8619$. **C) Repräsentative Western Blots** der Versuchsreihe sind ausschnittsweise dargestellt. Die Proben der Immunpräzipitation wurden mittels anti-Nephrin Antikörper und Streptavidin gefärbt. Zur Bestimmung des Gesamtnephrens wurden die Lysatproben mittels anti-Nephrin und anti-β-Aktin Antikörper gefärbt. (Abbildungen A-B verändert übernommen aus Haase, Potthoff et al. (2017))

Bei der immunhistologischen Betrachtung der Nephrin- und EEA1-Verteilung in den Glomeruli, zeigen sich ebenfalls Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Während es in der Kontrollgruppe nur zu wenigen Überlagerungen der beiden Signale kommt, zeigt die ADR-behandelte Versuchsgruppe eine erhöhte Anzahl an Überlagerungen (Abbildung 28). Diese sind mittels weißer Pfeile markiert. Gleichzeitig ist das gestörte Nephrin Verteilungsmuster bei den ADR-behandelten Tieren erkennbar.

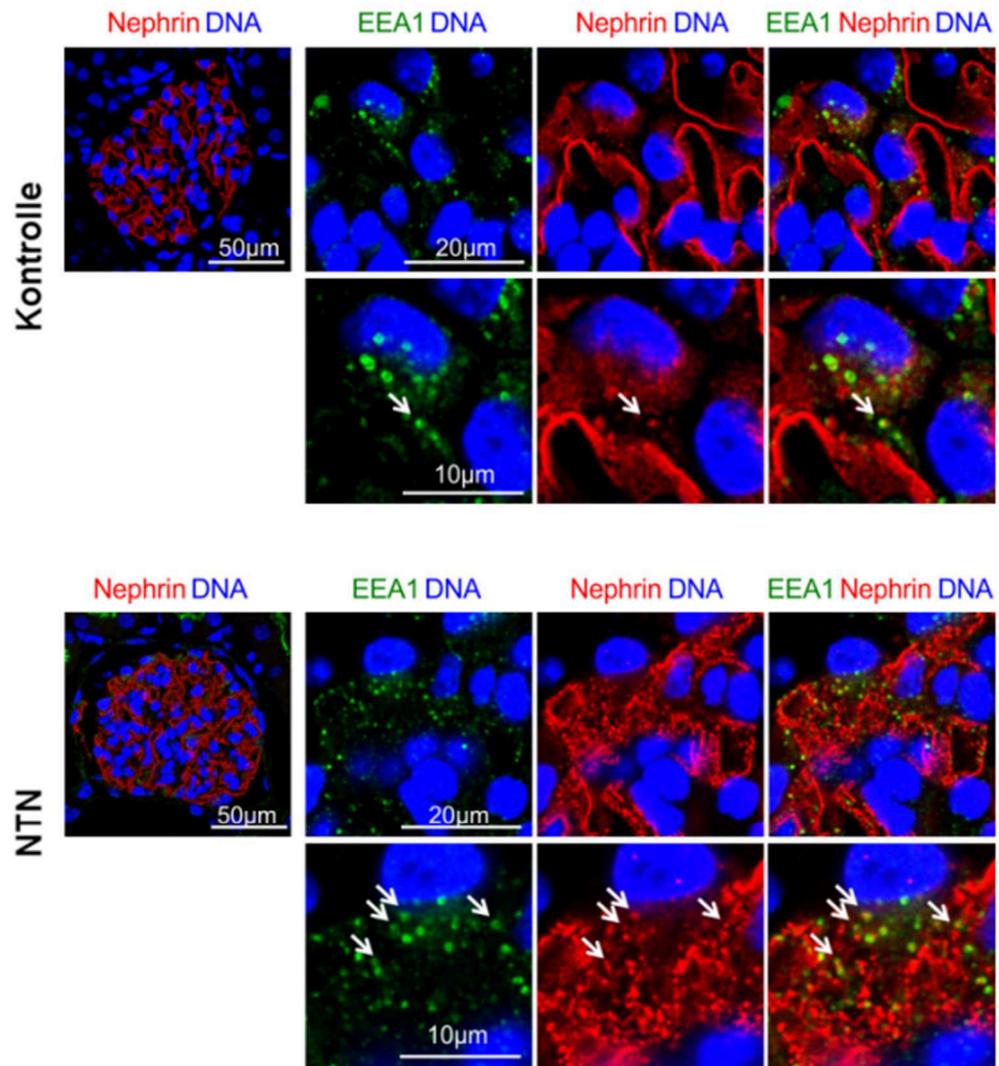


Abbildung 28: Nephrin- und EEA1-Färbung an murinen Nierenschnitten im NTN-Modell

Dargestellt sind repräsentative Nierenschnitte der Kontroll- und NTN-Mäuse 24 Stunden nach der Injektion des NTN-Serums. Die Ausschnitte zeigen glomeruläre Strukturen in der Übersicht, sowie vergrößerte Teilbereiche. Angefärbt wurden Nephrin (rot) und EEA1 (grün). Während es bei den Kontrollen nur vereinzelt zu einer Überlagerung von Nephrin und EEA1 Signalen kommt, weisen die NTN-behandelten Tiere eine erhöhte Menge an Überlagerungen auf (weiße Pfeile). Diese Färbungen wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. med. Meyer-Schwesinger (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) angefertigt. (Abbildungen verändert übernommen aus Haase, Potthoff et al. (2017))

Die längerfristige Analyse serum-behandelter Tiere über einen Zeitraum von 18 Tagen zeigt eine linear verlaufende Reduktion der Albuminausscheidung im Urin bei den behandelten Tieren (Abbildung 29). Dabei nimmt die Ausscheidung nach der Injektion über den Beobachtungszeitraum um insgesamt 92% ab, während keine Veränderung bei den Kontrolltieren messbar ist.

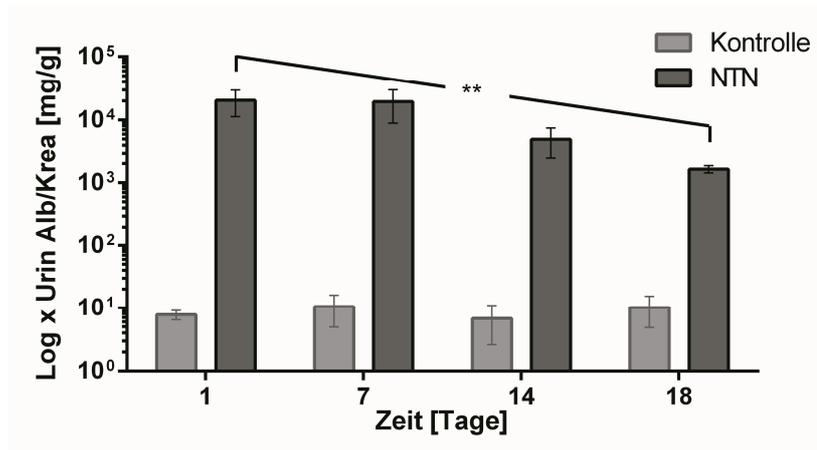


Abbildung 29: Verlauf der Albuminausscheidung innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 18 Tagen nach Nephritis-Induktion

Albuminausscheidung normiert auf den Kreatiningehalt im Urin an Tag 1, 7, 14, 18 nach Nephritisinduktion. Verglichen werden behandelte Tiere mit den unbehandelten Kontrolltieren im Alter von 8–10 Wochen. Bereits einen Tag nach Injektion des Serums zeigen die behandelten Tiere eine erhöhte Albuminausscheidung. Kontrolle $7,76 \pm 0,66$ ($n = 4$), NTN 20379 ± 5302 ($n = 3$). Diese nimmt während des Beobachtungszeitraums signifikant linear ab ($p = 0,029$). (Abbildung abgeändert veröffentlicht in Haase, Potthoff et al. (2017))

Die anschließende Nierenentnahme und biochemische Untersuchung der Glomerulilysate zeigt im Western Blot eine signifikante Reduktion von Nephrin um 25% (Kontrolle $100,0 \pm 5,01$ ($n = 4$), NTN $75,09 \pm 2,72$ ($n = 3$), $p = 0,0094$, *Abbildung 30 A*) und eine signifikante Reduktion von Synaptopodin um 74% (Kontrolle $100,0 \pm 16,92$ ($n = 4$), NTN $26,43 \pm 6,85$ ($n = 3$), $p = 0,0165$, *Abbildung 30 B*) im Vergleich zu den Kontrolltieren. Bei der Untersuchung des Oberflächennephrin konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden. Jedoch zeigte sich eine tendenziell erhöhte Menge an biotinyliertem Nephrin (Kontrolle $100,0 \pm 14,06$ ($n = 4$), NTN $126,2 \pm 10,47$ ($n = 3$), $p = 0,1952$, *Abbildung 31*).

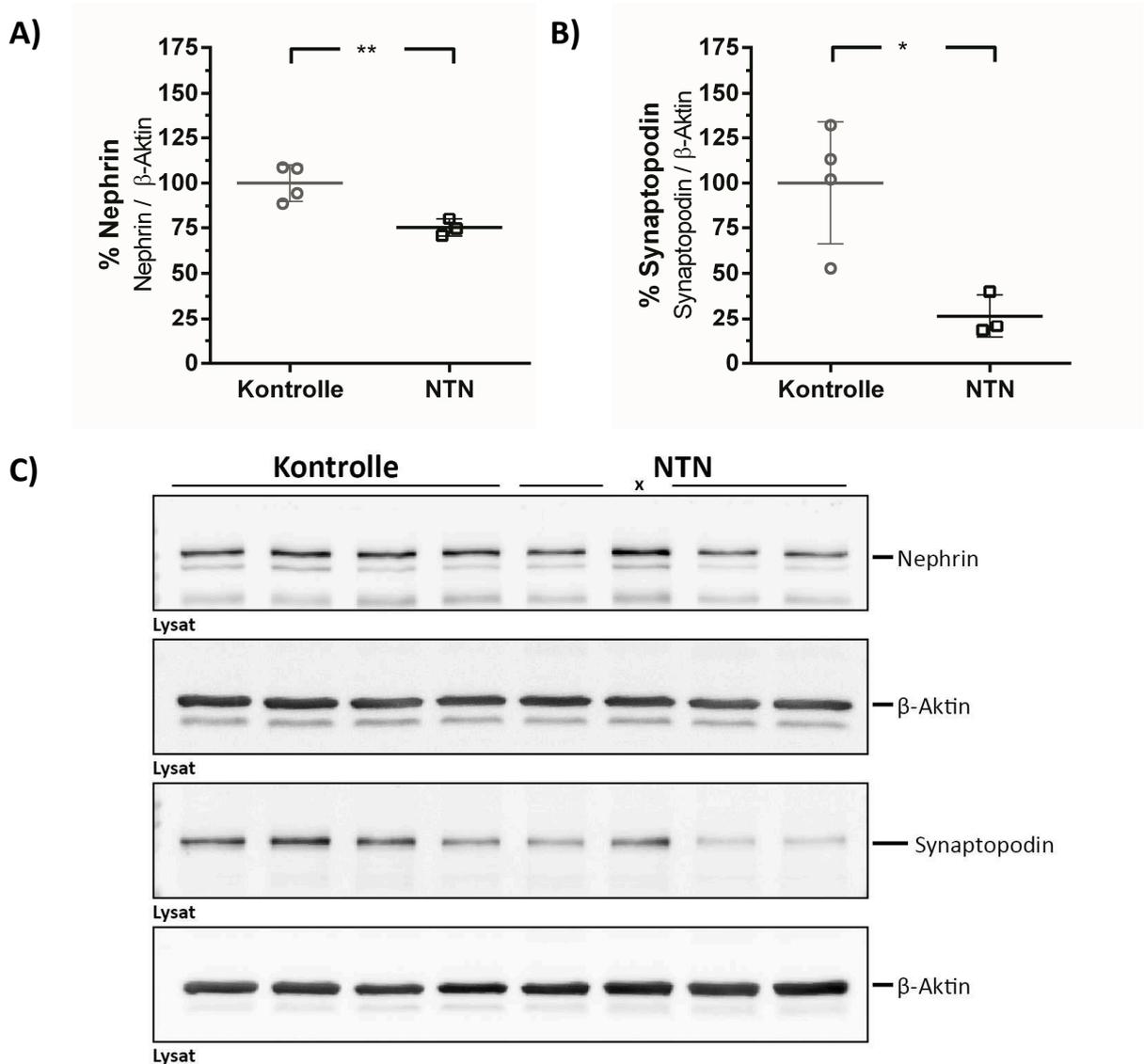


Abbildung 30: Einfluss der Nephrotoxischen Nephritis auf podozytäre Marker im Glomerulum

Veränderungen podozytärer Marker in Glomerulilysaten von Behandelten- und Kontrolltieren an Tag 18 nach Serum-Injektion. **A) Einfluss der Nephrotoxischen Nephritis auf glomeruläres Nephrin** Die behandelten Tiere weisen im Vergleich zu den Kontrolltieren an Tag 18 nach Injektion des Serums signifikant weniger Nephrin auf. Die Messwerte sind mittels β -Aktin als Ladekontrolle korrigiert und auf die Expression des Wildtyp normiert. Kontrolle 100,0 \pm 5,01 (n = 4), NTN 75,09 \pm 2,72 (n = 3), p = 0,0094. **B) Synaptopodinanteil bei den untersuchten Versuchsgruppen** In den untersuchten Glomerulilysaten der behandelten Tiere konnte signifikant weniger Synaptopodin nachgewiesen werden als bei der Kontrollgruppe. Die Messwerte sind mittels β -Aktin als Ladekontrolle korrigiert und auf die Expression des Wildtyps normiert. Kontrolle 100,0 \pm 16,92 (n = 4), NTN 26,43 \pm 6,85 (n = 3), p = 0,0165. **C) Zusammenfassung der Western Blots zum Nachweis von Nephrin und Synaptopodin** NTN 2 (markiert durch ein „x“) ist aufgrund mangelnder Nephritis-Induktion nicht in die Versuchsauswertung mit eingeflossen. β -Aktin dient als Ladekontrolle und wurde auf den gleichen Membranen nachgefärbt. Die bei dem β -Aktin Nachweis erkennbare zweite Bande ist ein Artefakt der zuvor auf gleicher Membran durchgeführten anti-p38-Färbung. (Ergebnisse A und C abgeändert veröffentlicht in *Haase, Potthoff et al. (2017)*)

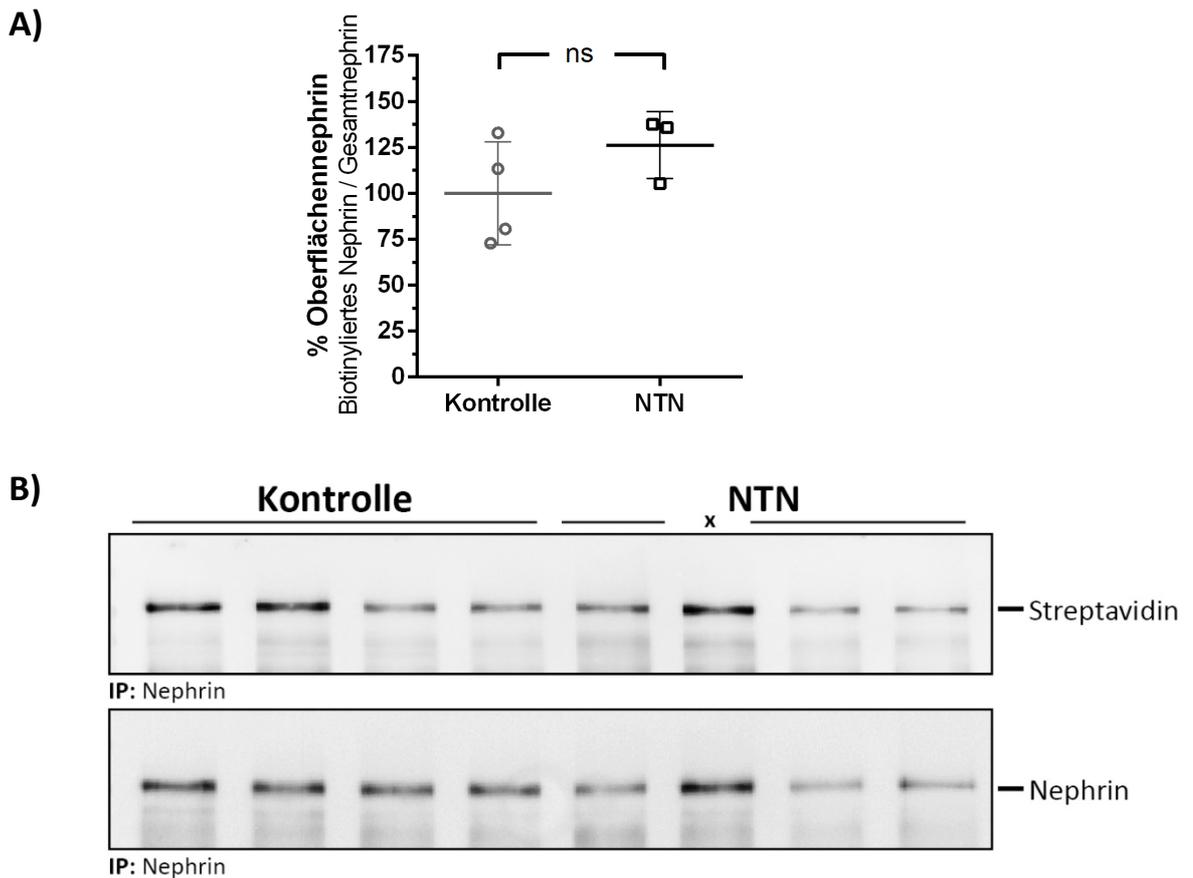


Abbildung 31: Biochemische Untersuchung des Oberflächennephrin an Tag 18 im Modell der nephrotoxischen Nephritis

A) Densitometrische Auswertung Analyse des an der Zelloberfläche exprimierten Nephrins in Bezug auf das Gesamtnephrin. Bei der NTN-Gruppe konnte tendenziell mehr Nephrin an der Zelloberfläche gemessen werden, als bei der Kontrollgruppe. Kontrolle $100,0 \pm 14,06$ ($n = 4$), NTN $126,2 \pm 10,47$ ($n = 3$), $p = 0,1952$. **B) Repräsentative Ausschnitte der Western Blots** Ausschnitte der Western Blots zum Nachweis von Streptavidin und Gesamtnephrin in den Nephrin-IP Proben aus Glomerulilysaten. Probe NTN 2 wurde aufgrund fehlgeschlagener Nephritis-Induktion nicht bei der Auswertung des Versuches berücksichtigt (gekennzeichnet mit „x“). (Abbildung A-B abgeändert publiziert in *Haase, Potthoff et al. (2017)*)

4. Streptozotocin induzierter Diabetes mellitus

Zur Validierung der Induktionsfähigkeit einer Hyperglykämie durch Streptozotocin wurden männliche C57Bl/6 Mäuse über einen Zeitraum von 15 Tagen untersucht. Hauptaugenmerk wurde auf den Blutzuckerspiegel, die Albuminausscheidung und das allgemeine Befinden der Tiere gelegt. Als Referenz diente die zum gleichen Zeitpunkt beobachtete Kontrollgruppe, welche lediglich eine Injektion des Puffers ohne Streptozotocin erhielt.

4.1. Einfluss der induzierten Hyperglykämie auf die Nierenfunktion

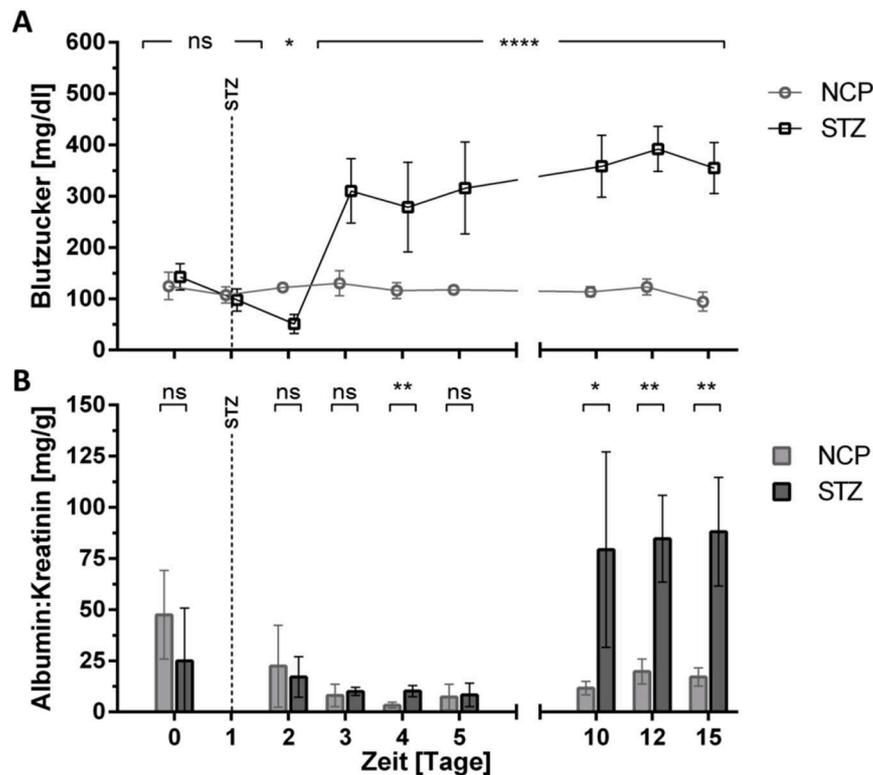


Abbildung 32: Einfluss der Hyperglykämie auf die Albuminausscheidung

Dargestellt sind die Entwicklung des Blutzuckerspiegels und der Albuminausscheidung im Sammelurin bei C57Bl/6 Mäusen im Zeitraum von 15 Tagen. **A) Zeitlicher Verlauf des Blutzuckerspiegels bei STZ-behandelten Tieren (STZ) im Vergleich zu Puffer-behandelten Kontrolltieren (NCP)** 48 Stunden nach Injektion steigt der Blutzuckerspiegel bei den STZ-behandelten Tieren auf Werte größer 250 mg/dl an. Bis zum Versuchsende bleibt er konstant signifikant erhöht. **B) Albuminausscheidung im Sammelurin normiert auf Kreatinin** Nach der Injektion kommt es zu einem leichten Abfall des Albumingehalts im Urin in beiden Gruppen. An Tag 4, 10, 12 & 15 konnte in der Gruppe der STZ-behandelten Tiere (STZ) eine signifikant erhöhte Albuminmenge im Vergleich zu der Kontrollgruppe (NCP) gemessen werden. Tag 4: NCP $3,3 \pm 0,66$ (n = 5), STZ $10,18 \pm 1,24$ (n = 5), $p = 0,0026$; Tag 10: NCP $11,62 \pm 1,48$ (n = 5), STZ $79,36 \pm 21,36$ (n = 5), $p = 0,0336$; Tag 12: NCP $19,74 \pm 2,73$ (n = 5), STZ $84,66 \pm 9,49$ (n = 5), $p = 0,016$; Tag 15: NCP $17,10 \pm 1,97$ (n = 5), STZ $88,12 \pm 11,88$ (n = 5), $p = 0,0035$.

Nach einer einmaligen intraperitonealen Injektion von 180 $\mu\text{g/gKG}$ STZ stieg der Blutzuckerspiegel bei den behandelten Mäusen nach 48 Stunden signifikant auf Werte über 250 mg/dl an (Tag 3: STZ $310,4 \pm 62,64$ mg/dl, *Abbildung 32 A*). Bis zum Ende des Versuchs blieb der Blutzuckerspiegel der behandelten Tiere im Vergleich zu der Kontrollgruppe konstant signifikant erhöht. Die Albuminausscheidung im Urin sank allgemein bis Tag 3 ab, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und STZ-Gruppe messbar waren. Während die Albuminausscheidung bei den Kontrolltieren im Gegensatz zu den STZ-behandelten Tieren an Tag 4 weiter sank, konnte eine zu diesem Zeitpunkt signifikant höhere Albuminausscheidung bei der STZ-behandelten

Gruppe gemessen werden (Tag 4: NCP $3,3 \pm 0,66$ (n = 5), STZ $10,18 \pm 1,24$ (n = 5), $p = 0,0026$, *Abbildung 32 B*). Im weiteren Verlauf stieg die Albuminausscheidung der STZ-behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren immer weiter bis auf das 4- bis 7-fache an. Die Albuminausscheidung lag an Tag 10 im Mittel bei 79 mg Albumin/g Kreatinin, an Tag 12 bereits bei 85 mg Albumin/g Kreatinin und an Tag 15 bei 88 mg Albumin/g Kreatinin. Damit unterscheidet sie sich an Tag 4 und ab Tag 10 signifikant von der Kontrollgruppe.

5. Isolation der Primärpodozyten

Zu Beginn der weiterführenden Analyse des Einflusses von p38 auf die Hyperglykämie vermittelte Albuminurie wurden die neu eingeführten podozytenspezifischen p38 α -knockout Mäuse charakterisiert. Von den Mäusen, die äußerlich keine besonderen Stigmata aufwiesen, wurden Glomeruli aus Nieren von männlichen p38 $\alpha^{fl/fl}$ - und p38 α^{PodKO} -Mäusen isoliert und kultiviert. Die aus den Glomeruli (grüner Kreis *Abbildung 33*) ausgewachsenen Podozyten dienen als Ausgangsmaterial für die Protein-/ DNA-/ RNA-Analysen.

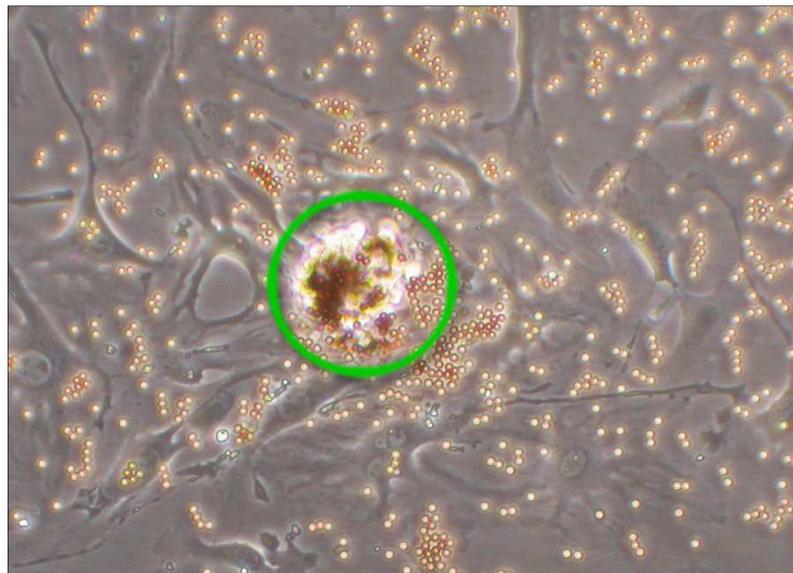


Abbildung 33: Isolierte Glomeruli nach 5-tägiger Kultivierung

Dargestellt ist die lichtmikroskopische Aufsicht (100x) auf ein Glomerulum (grün umrandet) an Tag 5 nach der Organentnahme. Sowohl freie, als auch noch im Glomerulum eingeschlossene Dynabeads sind als gelb-kupferne Punkte erkennbar. Zellen, die aus dem Glomerulum entwachsen sind, erscheinen dicht gedrängt um glomeruläre Strukturen auf dem kollagenisierten Boden der Kulturflasche.

6. Nachweis des podozytenspezifischen p38 α -Knockouts

Beispielhaft sind die Ergebnisse des murinen, männlichen Geschwisterpaares #75 & #76 der podozytenspezifischen p38 α Knockout Linie (p38 α ^{PodKO}) nach der Podozytenisolierung im Alter von 5 Wochen dargestellt. Die Genotypisierung der isolierten Primärpodozyten zeigt, dass die ausgewählten Proben loxP-positiv sind (beispielhaft in *Abbildung 34* dargestellt). Die Proben weisen eine einzelne Bande in Höhe der homozygoten loxP-Kontrolle (fl/fl Kontrolle) auf. Es erscheint keine Bande in Höhe der wt-Kontrolle. Die Genotypisierung hinsichtlich des Knockouts zeigt, dass Probe #75 eine einzelne Bande bei 411 bp entsprechend der Knockout-Kontrolle aufweist. Es treten keine weiteren Banden auf. Bei Probe #76 treten entsprechend der wt-Kontrolle keine PCR-Produkte auf.

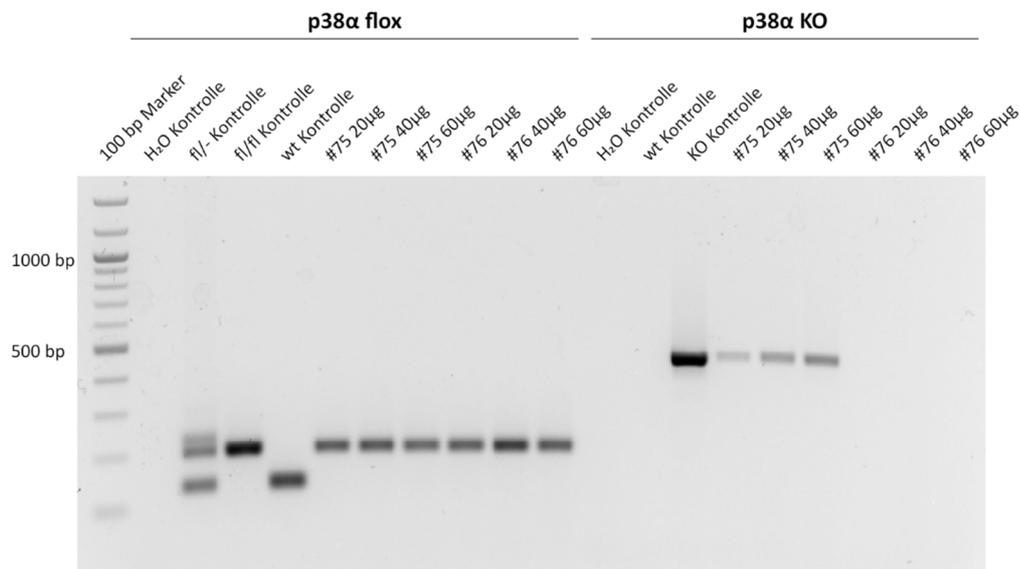


Abbildung 34: Primärpodozyten-Genotypisierung hinsichtlich loxP und p38 α ^{PodKO}

Die Genotypisierung der Primärpodozyten im Hinblick auf die loxP Stellen und p38 α ^{PodKO} lieferte die auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennten Banden. Aufgetragen sind die H₂O-, fl/- und fl/fl-Kontrollen, sowie die Proben #75 und #76 für den loxP-Nachweis. Außerdem sind die H₂O-, fl/-, fl/fl-Kontrollen sowie die Proben #75 und #76 für den p38 α ^{PodKO}-Nachweis aufgetragen. Die Mengenangaben beziehen sich auf die für die PCR eingesetzte DNA-Menge.

Die zur weiteren Kontrolle durchgeführte Genotypisierung, bei der zusätzlich zu den Primern zum Nachweis des Knockouts weitere Primer zur Identifikation möglicher Wildtyp-Sequenzen eingesetzt wurden, ist in *Abbildung 35* dargestellt. Beide untersuchten Proben weisen ein Wildtyp-Produkt mit der Größe von 789 bp auf, wohingegen nur die Probe #75 die schon in *Abbildung 34* dargestellte Knockout-Bande zeigt. Das Wildtyp-Produkt der Proben ist etwas größer als das der Wildtyp-Kontrolle und erscheint bei Probe #76 schwächer als bei Probe #75.

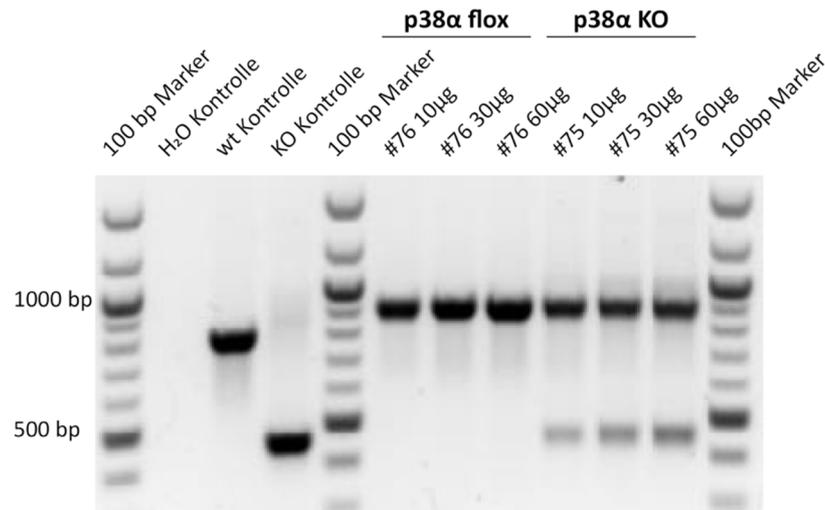


Abbildung 35: Primärpodozyten-Genotypisierung zum Nachweis des p38 α Knockouts, sowie von p38 α Wildtyp-DNA

Abgebildet ist eine Aufnahme der Genotypisierungs-PCR Produkte aufgetrennt auf einem 1,5%igen TAE-Agarosegel. Aufgetragen sind der 100bp-Marker, H₂O-, wt- und KO-Kontrollen sowie die Proben der Mäuse #75 und #76 der p38 α -Linie. Aufgetrennt wurden pro Versuchstier jeweils drei verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen, ursprünglich für die PCR eingesetzten Nukleinsäuremengen.

Auf Proteinebene konnte der Nachweis von p38 α in den Primärpodozyten im Western Blot durchgeführt werden. Das Ergebnis ist in *Abbildung 36* und *Abbildung 37* dargestellt. *Abbildung 36* zeigt Ausschnitte der aufgetrennten Zelllysate der bereits in *Abbildung 34* und *Abbildung 35* verwendeten Tiere #75 und #76 der p38 α -Knockout-Linie.

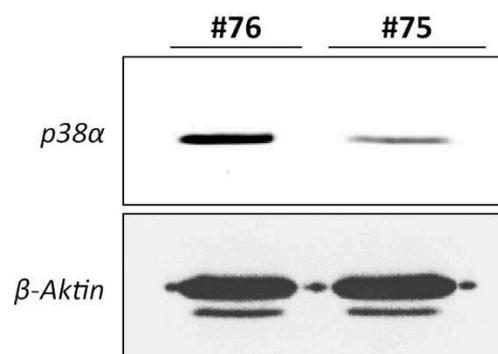


Abbildung 36: Western Blot der Primärpodozytenlysate zum Nachweis des p38 α ^{PodKO}

Dargestellt ist der zu den in *Abbildung 35* und *Abbildung 36* gehörige Western Blot der Primärpodozytenlysate. Aufgetrennt wurden je 15 μ g Protein/Geltasche. Die Blots wurden mit rb-anti-p38 α (Cell Signaling #9228) und ms-anti- β -Aktin (Sigma A5316), sowie den entsprechenden HRP-markierten Sekundärantikörpern gefärbt. β -Aktin diente dabei als Ladekontrolle. Die Entwicklung erfolgte mittels SuperECL-Reagenz. Bei Maus #75 konnte eine Reduktion von p38 α um 71% densitometrisch gemessen werden.

Dabei weist Probe #75 im Vergleich zu #76 eine schwächere p38 α -Bande bei gleich starkem β -Aktin Signal auf. Die Kontrolle mittels β -Aktin bestätigt die im Vorfeld durchgeführte Proteinbestimmung und Proteinmengenanpassung. Auch die Wiederholung dieser Analyse mittels Primärpodozyten aus anderen männlichen p38 $\alpha^{fl/fl}$ - und p38 α^{PodKO} -Mäusen bestätigte das Ergebnis. Die densitometrische Analyse ist in *Abbildung 37* zusammengefasst. Es ergibt sich eine signifikante Reduktion der p38 α Expression in den p38 α^{PodKO} -Tieren um 52%.

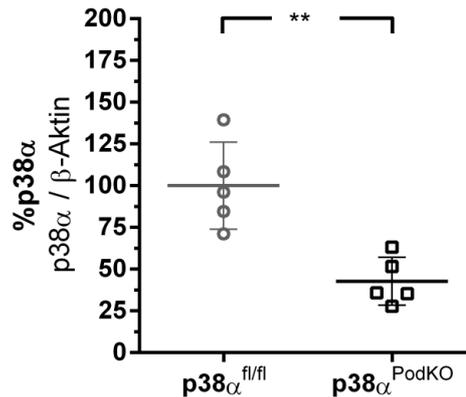


Abbildung 37: Densitometrische Analyse der p38 α -Expression in Wildtyp- und KO-Primärpodozyten

Dargestellt ist die p38 α -Expression in isolierten Primärpodozyten aus p38 $\alpha^{fl/fl}$ - und p38 α^{PodKO} -Mäusen. Die densitometrischen Messwerte sind auf β -Aktin als Ladekontrolle bezogen und auf die Expression des Wildtyps normiert. p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 \pm 11,64 (n = 5), p38 α^{PodKO} 42,77 \pm 6,43 (n = 5), p = 0,0046.

Dieses Ergebnis wird weiterhin durch immunhistologische Untersuchungen gestützt. Dazu wurde mangels geeignetem p38-Antikörper, die Menge an Gesamt-p38 in murinen Nierenschnitten speziell in den Glomeruli untersucht. Während die ausschließlich mit Hämalaun gegengefärbten Kontrollfärbungen keine p38-Färbung aufweisen, zeigen die p38-gefärbten Schnitte spezifisch gefärbte Bereiche (siehe *Abbildung 38*). Dabei weisen die Glomeruli der p38 α^{PodKO} -Tiere deutliche weniger gefärbte Bereiche auf, als die der p38 $\alpha^{fl/fl}$ -Kontrollen. Dargestellt sind je zwei repräsentative Glomeruli pro Gruppe.

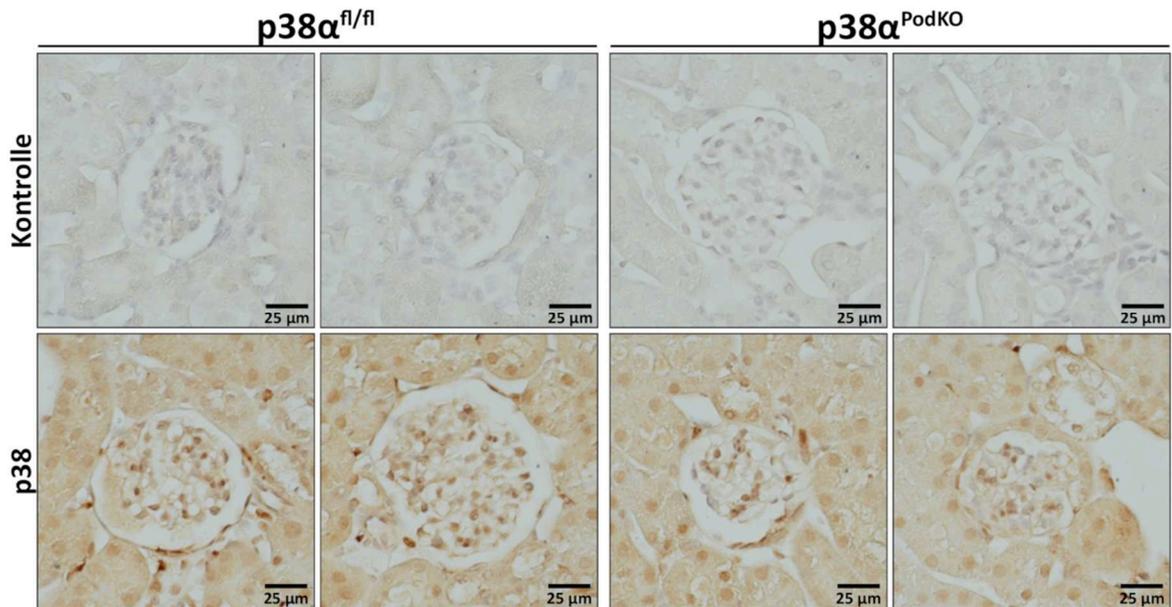


Abbildung 38: Immunhistologische Untersuchung der p38-Verteilung an Nierenschnitten aus p38 $\alpha^{fl/fl}$ - und p38 α^{PodKO} -Mäusen

Lichtmikroskopische Aufnahmen von Immunfärbungen zur Untersuchung der MAPK p38-Verteilung an murinen Nierenschnitten. Dargestellt sind die Kontrollfärbungen ohne Primärantikörper (Kontrolle), sowie die anti-p38 Färbungen bei p38 $\alpha^{fl/fl}$ - und p38 α^{PodKO} -Tieren. Die chromogene Färbung wurde mittels DAB-Substrat realisiert, wodurch p38-positive Bereiche als braune Strukturen erkennbar werden. Durch die Gegenfärbung mit Hämalaun werden die Zellkerne als blaue Strukturen erkennbar.

7. Einfluss des podozytenspezifischen p38 α -Knockout auf die Diabetes-vermittelte Nierenschädigung

7.1. Untersuchung an Tag 4

In Anlehnung an den Versuchsaufbau von Frau Dr. med. Woznowski, wurde die Untersuchung der Auswirkung einer STZ-induzierten Hyperglykämie zuerst an Tag 4 untersucht. Bei Betrachtung der Albuminurie konnte eine um 37% signifikant reduzierte Albuminausscheidung bei den p38 α^{PodKO} -Tieren gemessen werden. Dabei wiesen sie 43 mg/g Kreatinin im Vergleich zu den p38 $\alpha^{fl/fl}$ -Kontrollen mit 68 mg/g Kreatinin auf (p38 $\alpha^{fl/fl}$ 67,50 \pm 7,30 (n = 5), p38 α^{PodKO} 43,32 \pm 2,33 (n = 5), p = 0,0266, *Abbildung 39*).

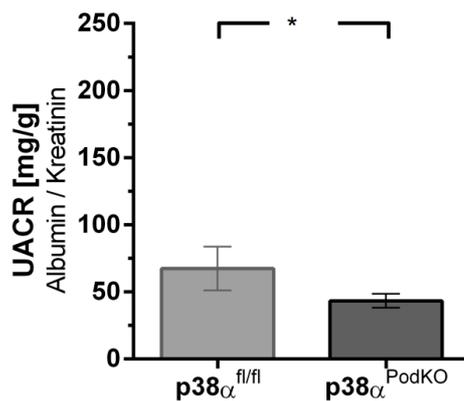


Abbildung 39: Albuminausscheidung an Tag 4 nach STZ-Injektion bei p38 $\alpha^{fl/fl}$ und p38 α^{PodKO}
 Signifikante Reduktion der Albuminausscheidung im Sammelurin bei den p38 α^{PodKO} -Versuchstieren gegenüber der p38 $\alpha^{fl/fl}$ -Kontrollgruppe. Die Albumin-Messwerte sind auf die Kreatininausscheidung normiert. p38 $\alpha^{fl/fl}$ 67,50 ± 7,30 (n = 5), p38 α^{PodKO} 43,32 ± 2,33 (n = 5), p = 0,0266.

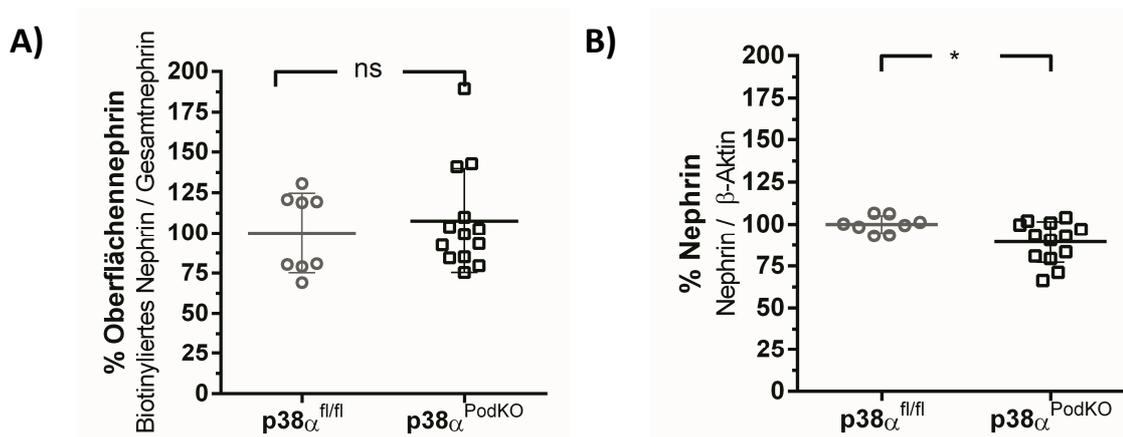


Abbildung 40: Veränderung der Nephrin Expression und Verteilung an Tag 4 nach STZ-Injektion

A) Oberflächennephrin an Tag 4 bei p38 $\alpha^{fl/fl}$ und p38 α^{PodKO} Die Messung des an der Oberfläche exprimierten Nephrins zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 ± 8,73 (n = 8), p38 α^{PodKO} 107,7 ± 8,94 (n = 13), p = 0,5474. **B) Nephrin Gesamtexpression an Tag 4 bei p38 $\alpha^{fl/fl}$ und p38 α^{PodKO}** Eine schwach signifikante Reduktion des Gesamtnephrin um 11% konnte bei der p38 α^{PodKO} -Gruppe gemessen werden. p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 ± 1,80 (n = 8), p38 α^{PodKO} 89,47 ± 3,37 (n = 13), p = 0,0133.

Die molekulare Betrachtung des glomerulären Filters konnte keinen signifikanten Unterschied bei der Menge an Oberflächennephrin aufzeigen (p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 ± 8,73 (n = 8), p38 α^{PodKO} 107,7 ± 8,94 (n = 13), p = 0,5474, *Abbildung 40 A*). Die Messung der Nephrin-Expression zeigte dagegen eine bei der p38 α^{PodKO} -Gruppe um 11% signifikant verminderte Expression (p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 ± 1,80 (n = 8), p38 α^{PodKO} 89,47 ± 3,37 (n = 13), p = 0,0133, *Abbildung 40 B*).

Die Analyse des glomerulären p38 lieferte die in *Abbildung 41* dargestellten Ergebnisse. Diese umfasst die Gegenüberstellung der Gesamtexpression und der Phosphorylierung von glomerulären p38 von unbehandelten und STZ-behandelten Wildtyp-Tieren, sowie STZ-behandelten p38^{PodKO}-Tieren. Im Vergleich zu der p38^{fl/fl}-Gruppe, ist die Menge an p38 durch die fehlende Behandlung mit STZ bei den NCP-Kontrolltieren signifikant um 30% erhöht (p38^{fl/fl} 100,0 ± 3,33 (n = 8), NCP 129,7 ± 5,83 (n = 8), p = 0,0010, *Abbildung 41 A*).

Betrachtet man weiter die p38 Expression bei STZ-behandelten p38^{fl/fl}- und p38^{PodKO}-Tieren, lässt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied beobachten. Dabei weisen die p38^{PodKO}-Tiere 16% weniger p38 auf als die p38^{fl/fl}-Gruppe (p38^{fl/fl} 100,0 ± 3,33 (n = 8), p38^{PodKO} 84,41 ± 2,52 (n = 13), p = 0,0021, *Abbildung 41 A*). Betrachtet man hingegen die p38-Phosphorylierung, kann kein signifikanter Unterschied zwischen den STZ-behandelten Gruppen gemessen werden (p38^{fl/fl} 100,0 ± 1,95 (n = 8), p38^{PodKO} 100,3 ± 6,67 (n = 13), p = 0,9681, *Abbildung 41 B*). Beide Gruppen zeigen aber eine im Vergleich zu den Puffer-behandelten Kontrolltieren signifikant erhöhte p38-Phosphorylierung. Bei der Kontrollgruppe kommt es durch die fehlende STZ-Behandlung zu einer 18% geringeren p38-Phosphorylierung (p38^{fl/fl} 100,0 ± 1,95 (n = 8), NCP 81,66 ± 5,19 (n = 8), p = 0,0092, *Abbildung 41 B*).

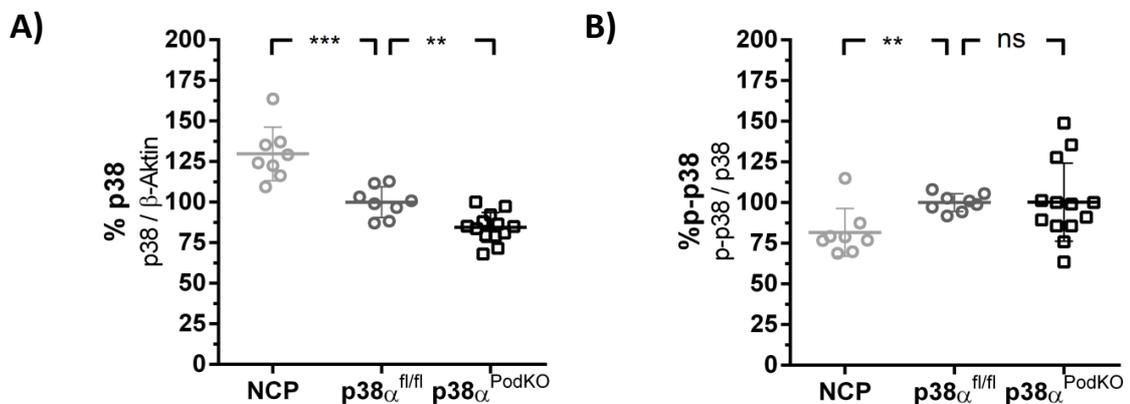


Abbildung 41: p38 Expression und p38-Phosphorylierung an Tag 4 nach STZ-Injektion

Dargestellt sind die densitometrischen Ergebnisse der Untersuchung der p38-Expression und p38-Phosphorylierung an Tag 4 der STZ-Behandlung. Verglichen werden die Puffer-behandelte Kontrollgruppe (NCP), die STZ-behandelte p38^{fl/fl}-Gruppe und p38^{PodKO}-Gruppe. **A) p38 Expression NCP – STZ – STZ-KO** Die Menge an p38 normiert auf β -Aktin ist bei den Puffer-Kontrollen um 30% signifikant größer, als bei der p38^{fl/fl}-Gruppe. p38^{fl/fl} 100,0 ± 3,33 (n = 8), NCP 129,7 ± 5,83 (n = 8), p = 0,0010. Dahingegen ist p38 bei den STZ-behandelten p38^{PodKO}-Tieren signifikant reduziert. p38^{fl/fl} 100,0 ± 3,33 (n = 8), p38^{PodKO} 84,41 ± 2,52 (n = 13), p = 0,0021. **B) p38 Phosphorylierung (Thr180/Tyr182) NCP – STZ – STZ-KO** Die Phosphorylierung von p38 normiert auf Gesamt-p38 und korrigiert für β -Aktin ist bei den mit STZ behandelten Tieren um 18% signifikant höher, als bei den Puffer-Kontrollen. p38^{fl/fl} 100,0 ± 1,95 (n = 8),

NCP $81,66 \pm 5,19$ (n = 8), $p = 0,0092$. Zwischen den $p38\alpha^{fl/fl}$ - und $p38\alpha^{PodKO}$ -Tieren gibt es keinen signifikanten Unterschied. $p38\alpha^{fl/fl}$ $100,0 \pm 1,95$ (n = 8), $p38\alpha^{PodKO}$ $100,3 \pm 6,67$ (n = 13), $p = 0,9681$.

Die Kontrolle des Einflusses der Hyperglykämie auf das Oberflächennephrin erfolgte ebenfalls unter Berücksichtigung der unbehandelten Kontrollgruppe. Dabei konnte, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Weder der erhöhte Blutzucker, noch der $p38\alpha$ -knockout hatten einen Einfluss auf das Oberflächen-/ Gesamtnephrin-Verhältnis ($p38\alpha^{fl/fl}$ $100,0 \pm 8,73$ (n = 8), NCP $104,5 \pm 7,90$ (n = 8), $p = 0,7083$; $p38\alpha^{fl/fl}$ $100,0 \pm 8,73$ (n = 8), $p38\alpha^{PodKO}$ $107,7 \pm 8,94$ (n = 13), $p = 0,5474$, *Abbildung 42*).

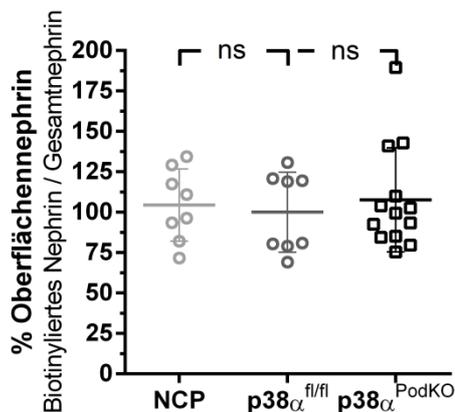


Abbildung 42: Oberflächen-/ Gesamtnephrin-Verhältnis an Tag 4 nach STZ-Injektion

Densitometrische Auswertung der Nephrin und Streptavidin Western Blots nach der Nephrin-IP aus Glomerulilysaten. Das Verhältnis von Oberflächennephrin zu Gesamtnephrin zeigt an Tag 4 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. $p38\alpha^{fl/fl}$ $100,0 \pm 8,73$ (n = 8), NCP $104,5 \pm 7,90$ (n = 8), $p = 0,7083$; $p38\alpha^{fl/fl}$ $100,0 \pm 8,73$ (n = 8), $p38\alpha^{PodKO}$ $107,7 \pm 8,94$ (n = 13), $p = 0,5474$.

7.2. Untersuchung an Tag 11

Die weitere Untersuchung im Verlauf des Krankheitsmodells lieferte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bei der Betrachtung der Albuminurie. Die Messungen wurden an Tag 11 nach STZ-Injektion durchgeführt, da es im Vorversuch bei den STZ-behandelten Tieren ab diesem Zeitpunkt zu einer signifikant erhöhten Albuminausscheidung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe kam. Bei der Analyse des Einflusses von $p38\alpha$ auf die Albuminausscheidung ist zu diesem Zeitpunkt eine tendenziell verminderte Albuminurie bei der $p38\alpha^{PodKO}$ -Gruppe messbar ($p38\alpha^{fl/fl}$ $144,4 \pm 19,54$ (n = 10), $p38\alpha^{PodKO}$ $104,7 \pm 14,05$ (n = 10), $p = 0,1167$, *Abbildung 43*).

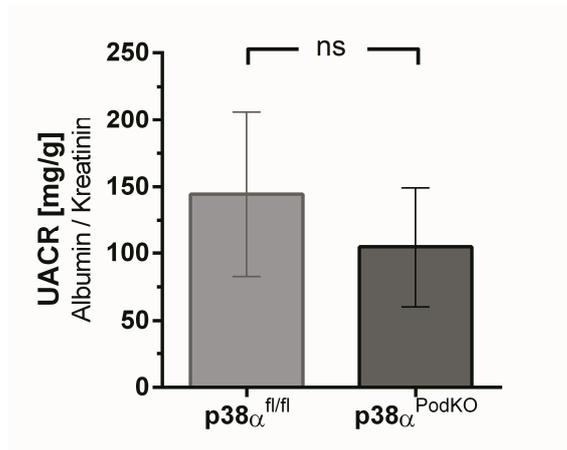


Abbildung 43: Albuminurie an Tag 11 nach STZ-Injektion bei p38 $\alpha^{fl/fl}$ und p38 α^{PodKO}

Albuminausscheidung im Sammelurin normiert auf die Kreatininausscheidung an Tag 11 nach STZ-Injektion. Der Vergleich zwischen p38 $\alpha^{fl/fl}$ und p38 α^{PodKO} zeigt zu diesem Zeitpunkt eine tendenziell verminderte Albuminurie bei den Knockout-Tieren. p38 $\alpha^{fl/fl}$ 144,4 ± 19,54 (n = 10), p38 α^{PodKO} 104,7 ± 14,05 (n = 10), p = 0,1167.

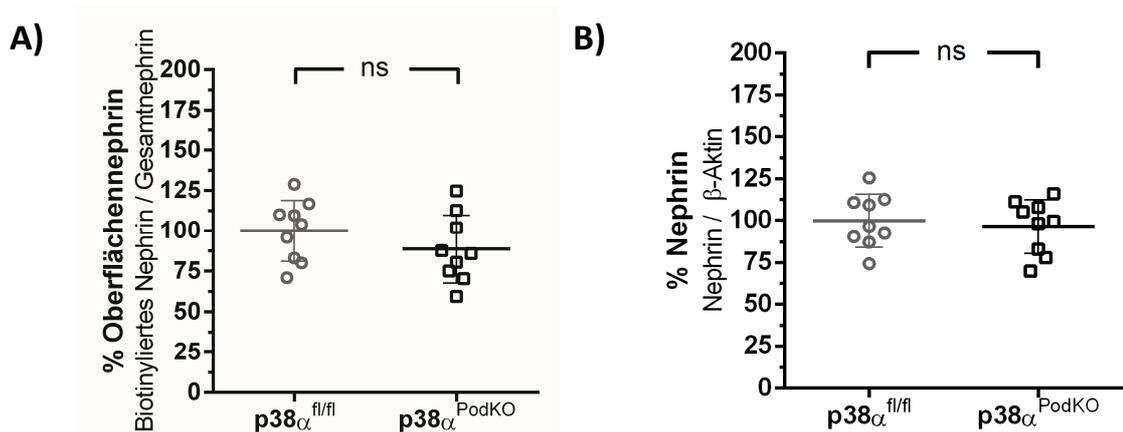


Abbildung 44: Veränderung der Nephrin Expression und Verteilung an Tag 11 der Hyperglykämie

Densitometrische Auswertung der Oberflächennephrin- und Gesamtnephrin Analysen mittels Western Blot. **A) Oberflächennephrin an Tag 11 bei p38 $\alpha^{fl/fl}$ und p38 α^{PodKO}** Vergleich des an der Oberfläche exprimierten Nephrins der p38 $\alpha^{fl/fl}$ - und p38 α^{PodKO} -Tiere. Die densitometrischen Werte des biotinylierten Nephrins sind im Verhältnis zum Gesamtnephrin dargestellt. Die Messwerte sind auf die Expression des Wildtyps normiert. p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 ± 6,31 (n = 9), p38 α^{PodKO} 88,68 ± 6,98 (n = 9), p = 2468. **B) Nephrin Gesamtexpression an Tag 11 nach STZ-Injektion bei p38 $\alpha^{fl/fl}$ und p38 α^{PodKO}** Die densitometrischen Messwerte sind auf β -Aktin als Ladekontrolle bezogen und auf die Expression des Wildtyps normiert. p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 ± 5,25 (n = 9), p38 α^{PodKO} 96,58 ± 5,33 (n = 9), p = 0,6537.

Die Menge an Oberflächennephrin und Gesamtnephrin weist an Tag 11 keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf (Oberflächennephrin: p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 ± 6,31 (n = 9), p38 α^{PodKO} 88,68 ± 6,98 (n = 9), p = 2468, Gesamtnephrin: p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 ± 5,25 (n = 9), p38 α^{PodKO} 96,58 ± 5,33 (n = 9), p = 0,6537, *Abbildung 44*). Ebenso gibt es keine Unterschiede bei der Menge an Gesamt-p38 und bei der Stärke der p38-

Phosphorylierung (p38-Expression: $p38\alpha^{fl/fl}$ $100,0 \pm 6,49$ ($n = 9$), $p38a^{PodKO}$ $106,3 \pm 9,83$ ($n = 9$), $p = 0,6009$, p38-Phosphorylierung: $p38\alpha^{fl/fl}$ $100,0 \pm 8,36$ ($n = 9$), $p38a^{PodKO}$ $113,1 \pm 11,45$ ($n = 9$), $p = 0,3693$, *Abbildung 45*).

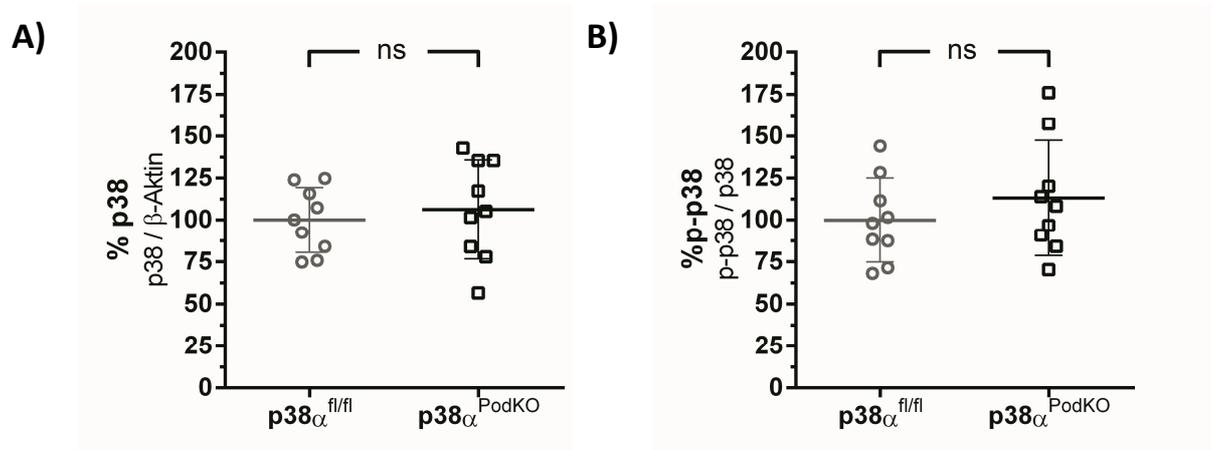


Abbildung 45: p38 Expression und p38 Phosphorylierung an Tag 11

Dargestellt sind die densitometrischen Ergebnisse der Untersuchung der p38-Expression und p38-Phosphorylierung an Tag 11 der STZ-Behandlung. Verglichen werden die Puffer-behandelte Kontrollgruppe (NCP), die STZ-behandelte $p38\alpha^{fl/fl}$ -Gruppe und $p38\alpha^{PodKO}$ -Gruppe. **A) p38 Expression an Tag 11 nach STZ-Injektion** Die densitometrischen Messwerte sind auf β -Aktin als Ladekontrolle bezogen und auf die Expression des Wildtyps normiert. $p38\alpha^{fl/fl}$ $100,0 \pm 6,49$ ($n = 9$), $p38a^{PodKO}$ $106,3 \pm 9,83$ ($n = 9$), $p = 0,6009$. **B) p38-Phosphorylierung (Thr180/Tyr182) an Tag 11** Die densitometrischen Messwerte sind auf β -Aktin als Ladekontrolle bezogen und auf die Expression des Wildtyps normiert. $p38\alpha^{fl/fl}$ $100,0 \pm 8,36$ ($n = 9$), $p38a^{PodKO}$ $113,1 \pm 11,45$ ($n = 9$), $p = 0,3693$.

7.3. Untersuchung an Tag 21

Auch bei der weiteren Kontrolle im Verlauf an Tag 21 nach der STZ-Injektion konnten keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den Versuchsgruppen gemessen werden. Zu diesem Zeitpunkt ist der Blutzuckerspiegel schon über mehrere Wochen stabil erhöht. Bei der Untersuchung der Albuminausscheidung im Urin lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den $p38\alpha^{fl/fl}$ und den $p38\alpha^{PodKO}$ Tieren erkennen ($p38\alpha^{fl/fl}$ $71,67 \pm 14,55$ ($n = 9$), $p38a^{PodKO}$ $53,12 \pm 9,97$ ($n = 9$), $p = 0,3107$, *Abbildung 46*). Die $p38\alpha^{PodKO}$ -Tiere weisen lediglich eine tendenziell geringere Albuminurie auf im Vergleich zu den Kontrollen.

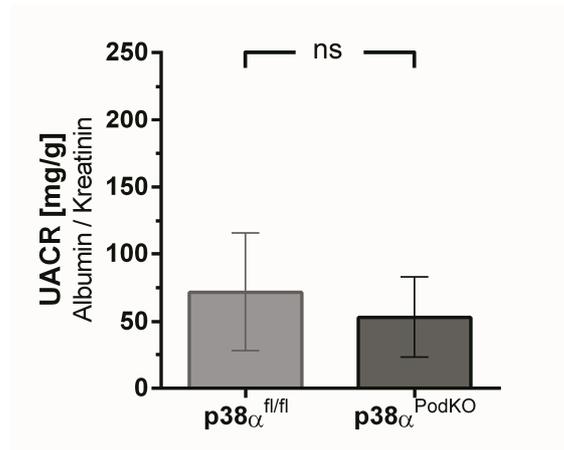


Abbildung 46: Albuminausscheidung an Tag 21 nach STZ-Injektion bei p38 $\alpha^{fl/fl}$ und p38 α^{PodKO}

Albuminausscheidung im Sammelurin normiert auf die Kreatininausscheidung an Tag 21 nach STZ-Injektion. Der Vergleich zwischen p38 $\alpha^{fl/fl}$ und p38 α^{PodKO} zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. p38 $\alpha^{fl/fl}$ 71,67 ± 14,55 (n = 9), p38 α^{PodKO} 53,12 ± 9,97 (n = 9), p = 0,3107.

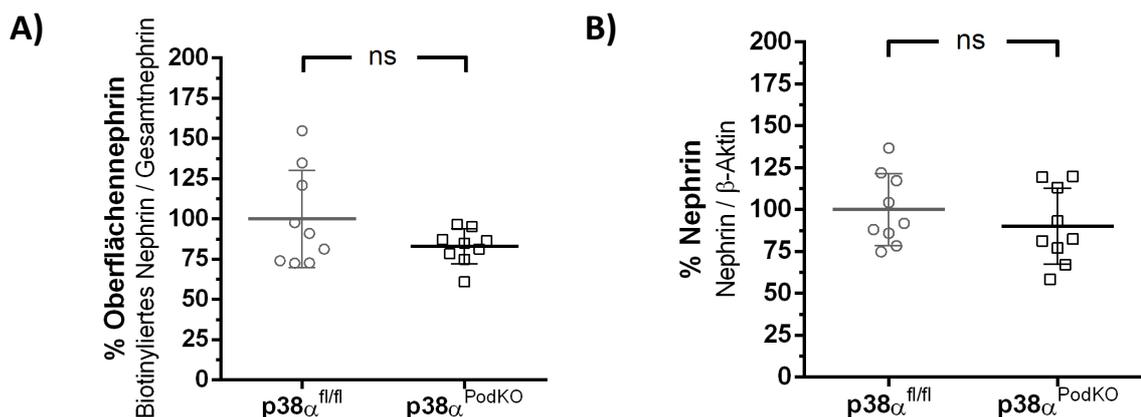


Abbildung 47: Veränderung der Nephrin-Expression und -Verteilung an Tag 21 der Hyperglykämie

Densitometrische Auswertung der Oberflächennephrin- und Gesamtnephrin Analysen mittels Western Blot. **A) Oberflächennephrin an Tag 21 bei p38 $\alpha^{fl/fl}$ und p38 α^{PodKO}** Vergleich des an der Oberfläche exprimierten Nephrins der p38 $\alpha^{fl/fl}$ - und p38 α^{PodKO} -Tiere. Die densitometrischen Werte des biotinylierten Nephrins wurden im Verhältnis zum Gesamtnephrin dargestellt. Die Messwerte sind auf die Expression des Wildtyps normiert. p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 ± 10,04 (n = 9), p38 α^{PodKO} 82,95 ± 3,62 (n = 9), p = 0,1413. **B) Nephrin Gesamtexpression an Tag 21 nach STZ-Injektion bei p38 $\alpha^{fl/fl}$ und p38 α^{PodKO}** Die densitometrischen Messwerte sind auf β -Aktin als Ladekontrolle bezogen und auf die Expression des Wildtyps normiert. p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 ± 7,13 (n = 9), p38 α^{PodKO} 90,22 ± 7,56 (n = 9), p = 0,3606.

Bei der weiteren Untersuchung des Oberflächennephrins in den Glomerulilysaten kann ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen beobachtet werden (p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 ± 10,04 (n = 9), p38 α^{PodKO} 82,95 ± 3,62 (n = 9), p = 0,1413, *Abbildung 47 A*). Auch die Menge an Gesamtnephrin ist bei den

Versuchsgruppen gleich groß (p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 \pm 7,13 (n = 9), p38 α^{PodKO} 90,22 \pm 7,56 (n = 9), p = 0,3606, *Abbildung 47 B*).

Diskussion

Nephrin spielt eine zentrale Rolle für den Aufbau und die Funktion der glomerulären Schlitzmembran und ist somit von entscheidender Bedeutung im glomerulären Filtrationsapparat (*Ruotsalainen, Ljungberg et al. 1999*). Störungen und Veränderungen dieses hochkomplexen Systems führen, vor allem wenn sie anhaltend sind, zu schwerwiegenden Verlusten der Filtrationsleistung der Niere (*Kestila, Lenkkeri et al. 1998*). Da ein Verlust von Nephrin aus diesem System nur zu einem gewissen Grad kompensiert werden kann, ist die Erforschung der molekularen Grundlagen und des Pathomechanismus von entscheidender Bedeutung. Sie liefert letztendlich den Grundstein für das Verständnis akuter und chronischer Nierenerkrankungen und ermöglicht dadurch gegebenenfalls eine rechtzeitige Intervention.

Eine entscheidende Erkenntnis lieferten *Nagata, Yamaguchi et al. (1993)* als sie herausfanden, dass Podozyten im Zuge ihrer komplexen Differenzierung die Fähigkeit der vollständigen Proliferation durch Verlust der Fähigkeit zur Zellteilung verlieren. Dadurch kann der Verlust von Podozyten nur durch benachbarte Podozyten kompensiert werden. Diese weiten sich in begrenztem Umfang in den frei gewordenen Bereich aus und schließen somit entstandene Filtrationslücken (*Kriz, Gretz et al. 1998*). Dass diese Fähigkeit gewissen Grenzen unterliegt, ist offensichtlich. Umso bedeutsamer ist die rechtzeitige Intervention in die Progression eines entstehenden glomerulären Schadens, so dass der Verlust von Podozyten reduziert, im besten Fall verhindert werden kann. Dabei gilt es glomeruläre Veränderungen möglichst frühzeitig zu erkennen und zu therapieren. Der Verlust bereits von geringen Mengen Albumin über den Urin kann ein deutliches Indiz für eine Störung des glomerulären Filters sein.

Um auf molekularer Ebene Aussagen speziell über das Verhalten von Nephrin im Verlauf nephrologischer Erkrankungen treffen zu können, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine neue Methode etabliert (*Haase, Potthoff et al. 2017*). Durch sie besteht die Möglichkeit, zu einem definierten Zeitpunkt das Verhältnis von in der Membran eingebauten Proteinen, zu der Gesamtmenge des Zielproteins exakt zu quantifizieren. Sie liefert somit eine wichtige Ergänzung im Untersuchungsspektrum glomerulärer Oberflächenproteine zu der eher qualitativ analysierenden Immunhistologie. Vor allem für die pathophysiologische Betrachtung von Nephrin, das eines der Hauptbestandteile der Schlitzmembran ist, ist diese Methode von

entscheidender Bedeutung. Gegenüber dem bislang verwendeten Vorgehen, bei dem isolierte Glomeruli für die Biotinylierung verwendet wurden (Sato, Hirose et al. 2014) bringt sie den Vorteil, dass eine morphologische Veränderung der Podozyten durch eine Umgebungs- und Milieuänderung unmittelbar vor der Biotinylierung keinen negativen Einfluss nehmen kann. Der entscheidende Biotinylierungsschritt, mit dem die Oberflächenproteine markiert werden, findet bereits vorher, direkt *in situ* mit eiskaltem, biotinhaltigem Puffer statt.

Es konnte gezeigt werden, dass sich neben Nephrin auch andere podozytäre Membranproteine wie Podocalyxin mit dieser Methode spezifisch markieren lassen. Dahingegen findet keine Markierung zytoplasmatischer Bestandteile wie p38, ERK oder β -Aktin statt. Da Biotin nicht membrangängig ist, werden nur oberflächlich exprimierte Proteine durch Biotin markiert. Durch die kovalente Bindung des Biotins an die Proteine, lässt sich der *in vivo* Zustand membranständiger Proteine zum Zeitpunkt der Perfusion auf diese Weise nahezu exakt festhalten. Die Aufreinigung der Proteinlysate mittels Immunpräzipitation oder Streptavidin-Affinitätschromatographie ermöglicht im Folgenden eine differenzierte Analyse der markierten Proteine. Abschließend lassen sich mittels Western Blot Verteilungsverhältnisse von membranständigen Proteinen und der Gesamtproteinmenge eines Zielproteins objektiv quantifizieren.

Interessanterweise fällt auf, dass bei dem Nachweis von Nephrin in Proteinlysaten und in der IP eine um wenige Kilodalton kleinere Nephrinbande zusätzlich nachweisbar ist. Diese verschwindet bei schwacher Nephrin Färbung. Bei der Färbung der IP-Proben mittels Streptavidin, ist dagegen auch bei starker Färbung eine derartige Bande nicht zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass es sich um nicht in der Membran eingebautes Nephrin handelt. Bevor Proteine in die Plasmamembran eingebaut werden, kommt es zu einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen. Membranproteine werden in der Regel im Zuge dieser Modifikation am endoplasmatischen Retikulum glykosyliert. Dies dient vor allem dem späteren Einbau in die Plasmamembran. Da die angehängten Kohlenhydratketten bis zur 50% des glykosylierten Proteins ausmachen können, ist das Wanderverhalten dieser Proteine in der Gelelektrophorese deutlich beeinträchtigt. Unvollständig modifizierte Proteine wandern bei der Gelelektrophorese entsprechend schneller.

Doxorubicin-Nephropathie

Mit Hilfe dieser Methode konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es im Laufe einer Doxorubicin-induzierten Nephropathie zu einem deutlichen Verlust von Oberflächennephrin aus der Schlitzmembran kommt. Am frühesten Zeitpunkt maximaler Albuminausscheidung an Tag 7 im Krankheitsverlauf ist dies, neben einem deutlichen Verlust von Podozyten, signifikant nachweisbar. Dieser, bereits von *Pereira Wde, Brito-Melo et al. (2015)* beschriebene Verlust konnte durch die Quantifizierung von Gesamtnephrin und eines weiteren podozytären Markers, Synaptopodin, mittels Western Blot bestätigt werden.

Die immunhistologischen Aufnahmen der Nieren zeigen, dass die Nephrinverteilung bei den ADR-behandelten Tieren deutlich gestört ist. Weiterhin kommt es intrazellulär zu einer Überlagerung von Nephrin- und EEA1-Signalen. Diese Überlagerung ist dagegen in den Kontrolltieren nur minimal vorhanden. Bei EEA1 handelt es sich um einen Marker für das frühe Endosom. Bei der Endozytose von Membranproteinen werden Vesikel gebildet, die im Weiteren mit primären Endosomen fusionieren. Anschließend kommt es zum Abbau der endozytierten Proteine oder zum Wiedereinbau in die Plasmamembran. Daher ist anzunehmen, dass es sich bei dem zugrundeliegenden Mechanismus, der zu der Reduktion des oberflächlich exprimierten Nephrin führt, vor allem im frühen Stadium um Endozytose handelt. Diese geht im weiteren Verlauf mit Veränderungen der Morphologie und dem Verlust von Podozyten einher. Entsprechende Erkenntnisse konnten bereits in früheren Arbeiten von *Babayeva, Rocque et al. (2013)* schon publiziert werden.

Zum untersuchten Zeitpunkt scheint p38 eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen messbar. Aufgrund der bereits an Tag 3 vorhandenen, im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöhten, Albuminausscheidung, ist davon auszugehen, dass der Verlust von Oberflächennephrin und der Verlust von Podozyten einem kontinuierlich fortschreitenden Prozess unterliegen. Eine weitere Untersuchung des Oberflächennephrin an Tag 2 und Tag 3 im Krankheitsverlauf ist notwendig, um dies darüber hinaus zu bestätigen. Wie in anderen Modellen wäre anzunehmen, dass zu einem früheren Zeitpunkt zwar die Menge an Oberflächennephrin reduziert sein, jedoch keine allgemeine Reduktion an Podozytenmarkern stattgefunden haben sollte.

Weiterhin wäre zu diesem früheren Zeitpunkt zu untersuchen, ob p38 eine zentralere Rolle einnimmt. Trotz der stark erhöhten Albuminausscheidung und der molekularen Veränderung des glomerulären Filters, war bei den in dieser Arbeit

durchgeführten Versuchen äußerlich keine Veränderung der behandelten Tiere erkennbar. Entgegen des von *Wang, Wang et al. (2000)* beschriebenen Phänomens einer drastischen Abnahme des Körpergewichts in Folge der ADR-Injektion, konnte in diesen Versuchen nur eine geringe Reduktion des Körpergewichtes festgestellt werden. Während *Wang, Wang et al. (2000)* eine signifikante Reduktion von circa 30% innerhalb der ersten sieben Tage messen konnten, betrug der Gewichtsunterschied an Tag 7 im Vergleich zur Kontrollgruppe lediglich 6%. Verglichen mit dem Körpergewicht an Tag 0 betrug die Reduktion innerhalb der ADR-Gruppe nur 0,5% des Ausgangsgewichtes. Da Gewicht der Tiere und Art der Applikation identisch ist, könnten mögliche Gründe für die Abweichung leichte Unterschiede zwischen den Mäusen eines Stammes oder Abweichungen bei der Tierhaltung sein. So findet die Tierhaltung bei *Wang, Wang et al. (2000)* als Einzelhaltung statt, während die Tiere in dieser Arbeit nur nach Versuchsgruppen getrennt gehalten wurden. Außerdem kann Stress bei der Haltung der Tiere in den Stoffwechsellkäfigen eine Auswirkung auf das Körpergewicht haben (*Kalliokoski, Jacobsen et al. 2013*). Daher wurde in dieser Arbeit das Gewicht der Tiere unmittelbar vor und nicht nach der Haltung in den Stoffwechsellkäfigen erfasst. Da auf diesen Punkt in der Arbeit von *Wang, Wang et al. (2000)* nicht näher eingegangen wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die einmal pro Woche stattfindenden Gewichtsmessungen nach dem Aufenthalt im Stoffwechsellkäfig stattgefunden haben.

Nephrotoxische Nephritis

Wie bei der Doxorubicin-induzierten Nephropathie, konnte auch mittels NTN-Modell ein Nierenschaden akut induziert werden. Im Gegensatz zu der ADR-Versuchsreihe liegen durch diese Arbeit bereits Daten zu einem frühen Zeitpunkt, nämlich 24 Stunden nach Injektion des Antiserums, vor. Wie auch für das ADR-Modell vermutet, ist im NTN-Modell ein Rückgang an Oberflächennephrin im Verhältnis zu dem Gesamtnephrin signifikant messbar. Jedoch bleibt die Gesamtmenge an Nephrin 24 Stunden nach der Injektion stabil. Ein Verlust von Nephrin aus dem Podozyten in den Urin, als Hauptursache für das veränderte Oberflächen-/ Gesamtnephrin Verhältnis, ist somit unwahrscheinlich. Dieses Ergebnis legt vielmehr den bereits oben beschriebenen Schluss nahe, dass Nephrin in einer Stresssituation vom Podozyten endozytiert wird. Möglicherweise wird gerade so, in erster Instanz, dem Verlust von Nephrin vorgebeugt. Alternativ ist eine Art Rettungssystem als kurzfristige Stabilisierung des Podozyten denkbar. Die immunhistologische Untersuchung der Nierenschnitte bestätigt die Theorie einer Endozytose.

Durch die NTN-Behandlung kommt es, wie im Modell der Doxorubicin-Nephropathie, zu einer deutlich gestörten Nephrinverteilung und einer verstärkten Überlagerung von Nephrin- und EEA1-Signalen. Dies legt nahe, dass es zu einer Prozessierung von Nephrin im endosomalen System kommt, was die vorherige Endozytose voraussetzt. Entgegen den Beobachtungen im ADR-Modell, ist dieser Effekt im NTN-Modell an Tag 1 deutlich ausgeprägter. Der frühere Untersuchungszeitpunkt ist eine mögliche Ursache für diese Beobachtung.

Im Laufe der Erkrankung nimmt der Albuminverlust bei den erkrankten Tieren linear ab. Zeitgleich ist an Tag 18 kein signifikanter Unterschied im Oberflächen-/Gesamtnephrin-Verhältnis mehr detektierbar. Jedoch ist eine signifikante Reduktion, sowohl von Gesamtnephrin als auch von Synaptopodin, messbar. Dies geht einher mit den Erkenntnissen von *Sussman, Sun et al. (2009)*. In ihrer Arbeit konnten sie unter anderem zeigen, dass es im Verlauf einer nephrotoxischen Nephritis zu einem deutlichen Verlust von Podozyten in den Urin kommt. Auffällig ist, dass im Gegensatz zu der ADR-induzierten Nephropathie kein gleichmäßiger Verlust von Nephrin und Synaptopodin stattfindet. Vielmehr steht ein relativ geringer Verlust an Nephrin von 25%, einem deutlichen Verlust von Synaptopodin um circa 75% gegenüber.

In weiteren Versuchen ist zu prüfen, ob in diesem Modell der Podozyt versucht, den Verlust an benachbarten Podozyten durch eine Ausdehnung in lückenhafte Bereiche und eine gesteigerte Expression von Nephrin zu kompensieren. Dies könnte gewissermaßen als Kompensationsmechanismus zum Erhalt der Filtrationsleistung trotz reduzierter Podozytenzahl gewertet werden. Eine weitergehende Untersuchung des Oberflächennephrins zusammen mit histologischen Analysen könnte weiteren Aufschluss geben. Auch wenn der Unterschied in der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse nicht signifikant ist, so stärkt die bei den NTN-Tieren tendenziell größere Menge an Oberflächennephrin diese These.

Streptozotocin-Diabetes

Im Gegensatz zu den zuvor verwendeten Krankheitsmodellen, dient die Streptozotocin-induzierte Hyperglykämie als Modell für eine mildere Form einer Nierenschädigung. Sie stellt ein Modell des Diabetes mellitus Typ 1 dar. Besonderes Interesse gilt diesem Modell, da es im Verlauf der Krankheit besonders häufig zu einer Schädigung der Niere kommt (*Dabla 2010*). Weiterhin ermöglicht es durch den vergleichsweise milderen Schädigungscharakter, eine weitergehende Analyse glomerulärer Pathomechanismen. Ziel der Untersuchungen war es, Veränderungen der

Schlitzmembran zu erkennen, welche ohne starken Verlust von Podozyten stattfinden. Zentrale Bedeutung hat der Einfluss des erhöhten Blutzuckerspiegels als Stressfaktor auf die Proteinurie als Maß für die Schädigung der Niere. Dazu sollten zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf die Filtrationsleistung und die molekularen Veränderungen der Glomeruli näher untersucht werden.

Wie die Pilotversuche zu diesem Modell zeigen, lässt sich mittels einmaliger Streptozotocin Dosis von 180 µg/gKG eine Hyperglykämie bei männlichen Mäusen auf C57Bl/6 Hintergrund stabil induzieren. Bereits 48 Stunden nach Injektion des Streptozotocin kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Blutzuckerspiegels. Infolgedessen weist die STZ-behandelte Gruppe eine signifikant erhöhte Albuminausscheidung an Tag 4 und ab Tag 10 in männlichen Wildtyp C57Bl/6 Mäusen auf. Die leicht erhöhte Albuminausscheidung bei der Kontroll- und der STZ-Gruppe zu Beginn des Versuchs ist auf Stress der Tiere aufgrund der ungewohnten Umgebung in den metabolischen Käfigen zurückzuführen. Zu diesem Zeitpunkt war die Eingewöhnungsphase an die metabolischen Käfige noch nicht derart ausgeprägt, wie es im weiteren Verlauf der folgenden Versuche der Fall war. Dies verdeutlicht die Sensitivität des glomerulären Filters auf endogene sowie exogene Stressfaktoren. Bis Tag 4 nimmt dieser Effekt in beiden Versuchsgruppen kontinuierlich ab. Ab Tag 4 treten so erste durch die Hyperglykämie verursachte Effekte auf. Im weiteren Verlauf der Hyperglykämie scheinen neben diesen anfänglichen Auswirkungen, weitere Effekte aufzutreten. Dadurch steigt die Albuminausscheidung bis Tag 15 weiter an. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse, konnten die weitergehenden Versuche zum Einfluss von p38 und p38α auf die Signaltransduktion mit Hilfe der auf C57Bl/6-Hintergrund etablierten podozytenspezifischen Knockout-Maus durchgeführt werden.

Einfluss des podozytenspezifischen p38α-Knockouts auf die Hyperglykämie-vermittelte Nierenschädigung

Bei der Analyse der neu eingeführten podozytenspezifischen Knockout-Maus konnte gezeigt werden, dass der Knockout in isolierten Primärpodozyten mittels PCR als 411 bp großes Produkt nachgewiesen werden kann. Zeitgleich kann aber weiterhin das Wildtypprodukt von 789 bp nachgewiesen werden. Ähnliches zeigt sich ebenfalls auf Proteinebene. Hier liegt die Menge an p38α in den isolierten Podozyten der Knockout-Tiere im Mittel bei circa 50% der Menge in den Podozyten der Wildtyp-Tiere. Die Effizienz des Knockout-Systems liegt in diesem Fall entsprechend nur bei etwa 50%. Die erzielten Ergebnisse mit dieser Knockout-Linie sind dahingehend zu bewerten.

Auf dieser Grundlage wurden drei im Vorfeld ausgewählte Zeitpunkte näher charakterisiert. Aus den Ergebnissen der Arbeit von Frau Dr. med. M. Woznowski, war Tag 4 als untersuchenswerter Zeitpunkt bekannt. Durch die Erkenntnisse aus dem zusätzlichen Pilotversuch mit C57Bl/6 Mäusen, konnte Tag 11 als weiterer interessanter Zeitpunkt ausgewählt werden. Ab dort war die Albuminausscheidung bei der STZ-behandelten Gruppe im Vergleich zu der Puffer-behandelten Gruppe signifikant erhöht. Tag 21 diente außerdem der Überprüfung eines Rückgangs möglicher Effekte aus der Anfangsphase der Hyperglykämie.

In der frühen Phase des Krankheitsverlaufs an Tag 4 waren im Pilotversuch erste signifikante Anzeichen einer erhöhten Albuminausscheidung bei STZ-behandelten Tieren messbar. Bei der Betrachtung der $p38\alpha^{fl/fl}$ - und $p38\alpha^{PodKO}$ -Tiere konnte ein signifikanter Unterschied bei der Albuminausscheidung zu diesem Zeitpunkt beobachtet werden. Auch wenn die Albuminausscheidung mit 68 mg Albumin/g Kreatinin bei den $p38\alpha^{fl/fl}$ Tieren und 43 mg Albumin/g Kreatinin bei den $p38\alpha^{PodKO}$ -Tieren verhältnismäßig gering ist, so zeigte der Knockout doch eine protektive Wirkung. Die relative Reduktion der Albuminausscheidung betrug 37% bei den Knockout-Tieren. Dieser Knockout kann an Tag 4 auch in den Glomerulilysaten signifikant nachgewiesen werden. Er entspricht einer Reduktion des glomerulären Gesamt-p38 um 16%. Bei der Betrachtung dieses Ergebnisses muss bedacht werden, dass es sich um die Summe aller p38-Isoformen in den Glomerulilysaten handelt. Außerdem ist in den Glomerulilysaten eine Vielzahl weiterer, potenziell ebenfalls p38 enthaltender Zellen vorhanden. Einen Rückschluss aus diesem Ergebnis auf die absolute p38 α -Reduktion in den Podozyten zu ziehen, ist entsprechend nicht möglich.

Bei der Betrachtung des phosphorylierten p38 ist jedoch kein Unterschied zwischen den Streptozotocin-behandelten Versuchsgruppen festzustellen. Verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren, kommt es im Allgemeinen insgesamt zu einer signifikanten Steigerung der p38-Phosphorylierung in den Glomeruli der STZ-behandelten Tiere.

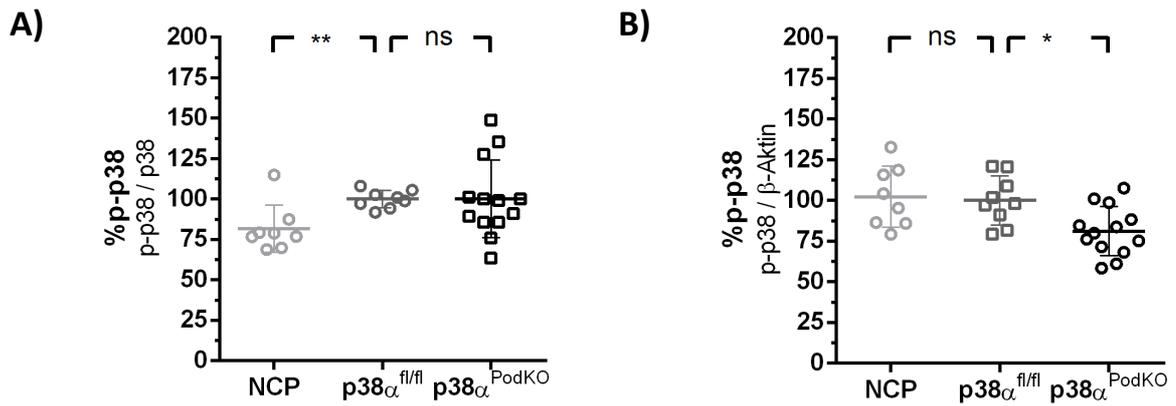


Abbildung 48: Vergleich des Einflusses der Normierung der Phosphorylierungsergebnisse auf Gesamt-p38 oder nur auf die Ladekontrolle

A) p38-Phosphorylierung normiert auf Gesamt-p38 Darstellung der Phosphorylierungsergebnisse von p38 als Quotient aus phosphoryliertem-p38 und Gesamt-p38. Während sich die NCP- und p38 $\alpha^{fl/fl}$ -Gruppe signifikant voneinander unterscheiden (p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 \pm 1,95 (n = 8), NCP 81,66 \pm 5,19 (n = 8), p = 0,0092), ist kein signifikanter Unterschied zwischen p38 $\alpha^{fl/fl}$ - und p38 α^{PodKO} -Gruppe messbar (p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 \pm 1,95 (n = 8), p38 α^{PodKO} 100,3 \pm 6,67 (n = 13), p = 0,9681). **B) p38-Phosphorylierung ohne p38-Normierung** Betrachtet man die gleichen Phosphorylierungsergebnisse lediglich auf β -Aktin normiert, ist kein Unterschied zwischen NCP- und p38 $\alpha^{fl/fl}$ -Gruppe (p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 \pm 5,03 (n = 9), NCP 102,3 \pm 6,65 (n = 8), p = 0,7825), dafür aber zwischen p38 $\alpha^{fl/fl}$ - und p38 α^{PodKO} -Gruppe messbar (p38 $\alpha^{fl/fl}$ 100,0 \pm 5,03 (n = 9), p38 α^{PodKO} 91,18 \pm 4,17 (n = 13), p = 0,0102).

Betrachtet man die Ergebnisse der p38-Phosphorylierung nur korrigiert für die Ladekontrolle, ohne Normierung auf Gesamt-p38, fällt auf, dass es zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung bei den p38 α^{PodKO} -Tieren kommt. Kein Unterschied ist dagegen bei der NCP- und p38 $\alpha^{fl/fl}$ -Gruppe messbar. Daher kann festgehalten werden, dass es durch die STZ-Behandlung an Tag 4 zu einer signifikanten Erhöhung der p38-Phosphorylierung bei gleichzeitigem Verlust von p38 kommt. Weiterhin legen die Ergebnisse aus *Abbildung 48 B* nahe, dass p38 α die im Wesentlichen phosphorylierte Isoform ist. So sind keine Unterschiede bei der p38-Phosphorylierung zwischen p38 $\alpha^{fl/fl}$ -Gruppe und p38 α^{PodKO} -Gruppe erkennbar, solange die Normierung auf die Menge an Gesamt-p38 erfolgt. Dies ist verständlich, da bei der p38 α^{PodKO} -Gruppe die Menge an Gesamt-p38 ebenfalls geringer ist. Verzichtet man auf die Normierung auf die p38-Gesamtmenge und beschränkt sich auf die Normierung auf β -Aktin als Ladekontrolle, ist eine signifikante Reduktion der p38-Phosphorylierung durch den Knockout messbar. Dies bestätigt die signifikant reduzierte Albuminausscheidung an Tag 4 bei der p38 α^{PodKO} -Gruppe. Dadurch werden die bisherigen Erkenntnisse, dass p38 α eine Rolle bei der Signalvermittlung in frühen Phasen der Schädigung des Glomerulären Filters spielen könnte, untermauert.

Während die bisherigen *in vitro* und *in vivo* Versuche zur Analyse des an der Oberfläche exprimierten Nephrin stets eine Reduktion des Oberflächen-/Gesamtnephrin-Verhältnisses unter erhöhter Glukosekonzentration zeigten, konnte in diesem Versuch kein Unterschied festgestellt werden. Bei näherer Betrachtung der Messwerte fällt auf, dass das Ergebnis der $p38^{fl/fl}$ -Gruppe zweigeteilt scheint (*Abbildung 49*).

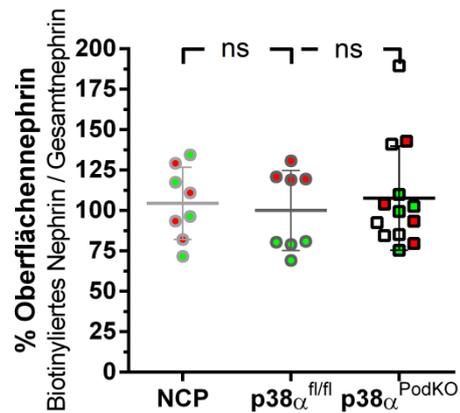


Abbildung 49: Markierung der Einzelwerte anhand der Perfusionsreihenfolge

Rot dargestellte Messwerte markieren die in einem Versuchsdurchlauf jeweils zuerst perfundierten Tiere. Grün dargestellte Messwerte zeigen die zuletzt perfundierten Tiere. Während bei der NCP- und $p38\alpha^{PodKO}$ -Gruppe die Verteilung der Einzelwerte homogen ist, existieren bei der $p38\alpha^{fl/fl}$ -Gruppe zwei Teilgruppen.

Die Markierung der Messwerte anhand der Perfusionsreihenfolge der Einzeltiere zeigt, dass die jeweils zu Beginn eines Versuchsdurchlaufs perfundierten $p38\alpha^{fl/fl}$ -Tiere mehr Nephrin an der Oberfläche zu haben scheinen, als die gegen Ende des Versuches perfundierten Tiere. Interessanterweise tritt dieser Effekt nur bei der $p38\alpha^{fl/fl}$ -Gruppe und nicht bei den anderen beiden Gruppen auf. Eine unterschiedliche Gruppengröße kann als Grund für diesen Effekt ausgeschlossen werden, da auch die NCP-Gruppe pro Versuchsdurchlauf stets die gleiche Gruppengröße aufwies. Naheliegender ist demnach ein durch $p38\alpha$ vermittelter und durch die Hyperglykämie bedingter Effekt. Die beiden auftretenden $p38\alpha^{fl/fl}$ -Teilgruppen unterscheiden sich in dem Versuchsablauf allein dadurch, dass die zuerst perfundierten Nieren längere Zeit auf Eis verweilen, bis sie zerkleinert und mit Kollagenase A verdaut werden. *Abbildung 50* zeigt schematisch den zeitlichen Ablauf einer Organentnahme für den Biotinylierungsassay. Aufgrund der gleichmäßigen Verteilung der Versuchstiere einer Versuchsgruppe, kommt es zu einer Verschiebung der Organentnahme von ungefähr 2 – 3 Stunden innerhalb einer Versuchsgruppe.

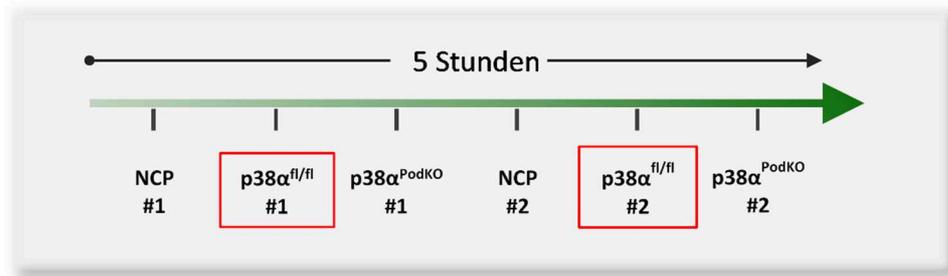


Abbildung 50: Zeitlicher Verlauf der Organentnahme für den Biotinylierungsassay

Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs eines Biotinylierungsassays im STZ-Modell. Der Ablauf beschreibt die Reihenfolge der Perfusion und Organentnahme. Als Versuchsgruppen dienten in dem dargestellten Versuch NCP-behandelte p38α^{fl/fl}-Kontrollen, sowie STZ-behandelte p38α^{fl/fl}- und p38α^{PodKO}-Mäuse. Die zu betrachtende STZ-p38α^{fl/fl}-Gruppe ist mittels roter Umrandung hervorgehoben. Der zeitliche Versatz der Perfusion innerhalb der Tiere einer Gruppe beträgt ungefähr 2,5 Stunden.

Dieser Versatz könnte den entscheidenden Einfluss auf die STZ-behandelte p38α^{fl/fl}-Gruppe genommen haben. Analysiert man die Ergebnisse der STZ-behandelten p38α^{fl/fl}-Gruppe getrennt nach zuerst- und zuletzt-perfundierten Tieren, ergeben sich deutlich unterschiedliche Ergebnisse. *Abbildung 51* zeigt die differenzierte Betrachtung der p38α^{fl/fl}-Versuchsgruppe. Die jeweils zuerst perfundierten p38α^{fl/fl}-Tiere wurden in *Abbildung 51 A* getrennt von den zuletzt perfundierten p38α^{fl/fl}-Tieren in *Abbildung 51 B* erfasst. Während bei den zuerst perfundierten p38α^{fl/fl}-Tieren kein signifikanter Unterschied zu den anderen Versuchsgruppen messbar ist, ist der Anteil an Oberflächennephrin bei den zuletzt perfundierten p38α^{fl/fl}-Tieren signifikant reduziert. Die Ursache für diesen Effekt ist derzeit noch nicht bekannt. Es bleibt zu überprüfen, ob sich dieses Phänomen in weiteren Versuchen tatsächlich wiederholt, oder ob es sich um einen nicht reproduzierbaren Zufall handelt. Ähnliche Effekte konnten bei keinem anderen in dieser Arbeit genutzten Krankheitsmodell beobachtet werden. Da zum aktuellen Zeitpunkt ein Effekt durch die zeitliche Verzögerung der Organentnahme nicht ausgeschlossen werden kann, sind die Ergebnisse auf dieser Grundlage zu bewerten. Um diesen möglichen Effekt bei Folgeversuchen reduzieren zu können, wäre die Versuchsdurchführung mit nur jeweils einem Tier pro Versuchsgruppe denkbar und notwendig.

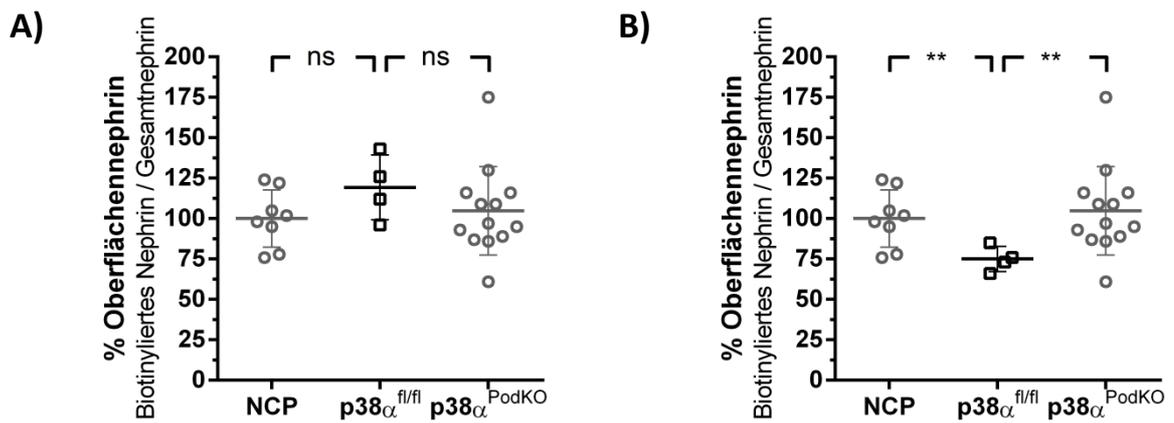


Abbildung 51: Differenzierte Analyse der p38 $\alpha^{fl/fl}$ -Versuchsgruppe hinsichtlich des Perfusionszeitpunktes

Dargestellt sind die Ergebnisse des Oberflächennephrin-Verhältnisses bei den unbehandelten und STZ-behandelten Versuchsgruppen. **Abbildung A)** zeigt die Ergebnisse unter Berücksichtigung der lediglich zuerst perfundierten p38 $\alpha^{fl/fl}$ -Tiere. Diese Gruppe unterscheidet sich nicht signifikant von den anderen beiden Versuchsgruppen. (NCP $100,0 \pm 6,24$ (n = 8), p38 $\alpha^{fl/fl}$ $119,3 \pm 10,01$ (n = 4), p = 0,1590; p38 $\alpha^{fl/fl}$ $119,3 \pm 10,01$ (n = 4), p38 α^{PodKO} $104,8 \pm 7,59$ (n = 13), p = 0,2899) **Abbildung B)** zeigt die zuletzt perfundierten p38 $\alpha^{fl/fl}$ -Versuchstiere. Hier ist der Anteil an Oberflächennephrin im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen signifikant reduziert. (NCP $100,0 \pm 6,24$ (n = 8), p38 $\alpha^{fl/fl}$ $75,0 \pm 3,94$ (n = 4), p = 0,0069; p38 $\alpha^{fl/fl}$ $75,0 \pm 3,94$ (n = 4), p38 α^{PodKO} $104,8 \pm 7,59$ (n = 13), p = 0,0033)

An Tag 21 konnte kein signifikanter Unterschied mehr bei der Albuminausscheidung, dem Oberflächennephrin und dem Gesamtnephrin zwischen p38 $\alpha^{fl/fl}$ und p38 α^{PodKO} gemessen werden. Zwar wiesen die p38 α^{PodKO} -Tiere tendenziell weniger Albuminurie auf, dies könnte zu diesem Zeitpunkt jedoch eine Folge der protektiven Wirkung des Knockouts zu einem früheren Zeitpunkt sein.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Betrachtung an Tag 11 erzielt. Auffällig jedoch war die stets tendenziell verminderte Albuminausscheidung bei den p38 α^{PodKO} -Tieren im Vergleich zu den Wildtypen. Dieser Unterschied war an Tag 11 wesentlich deutlicher (Differenz: 40 mg Albumin/g Kreatinin) als an Tag 21 (Differenz: 19 mg Albumin/g Kreatinin). Da generell die Albuminausscheidung an Tag 21 signifikant geringer ist als an Tag 11 (p38 $\alpha^{fl/fl}$: Tag 11 $71,7 \pm 14,55$ (n = 9), Tag 21 $144,4 \pm 19,54$ (n = 10), p = 0,0087; p38 α^{PodKO} : Tag 11 $53,12 \pm 9,97$ (n = 9), Tag 21 $104,7 \pm 14,05$ (n = 10), p = 0,0086) kann man annehmen, dass bis Tag 21 die zu einem früheren Zeitpunkt der Hyperglykämie hervorgerufene erhöhte Albuminausscheidung rückläufig ist. Dies kann zum derzeitigen Zeitpunkt nicht mit den Ergebnissen aus dem Pilotversuch bestätigt werden. Dieser zeigt zwar an Tag 15 weiterhin eine erhöhte Albuminausscheidung bei den STZ-behandelten Tieren, Daten zu Tag 16 - 21 konnten bislang jedoch nicht generiert werden.

Interessanterweise lieferte die Analyse der Phosphorylierung von p38 an Tag 11 keine unterschiedlichen Ergebnisse für $p38\alpha^{fl/fl}$ und $p38\alpha^{PodKO}$. Als Zielkinase sollte sie der Ausgangstheorie nach die Signaltransduktion zwischen erhöhten Blutzuckerspiegel und der zellulären Antwort inklusive Reduktion des Oberflächennephrens bewirken. Möglicherweise spielt sie jedoch nur im akuten Zustand eine Rolle, da eine Veränderung des Oberflächennephrens bei $p38\alpha^{fl/fl}$ und $p38\alpha^{PodKO}$ ebenfalls nicht zu beobachten war.

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse zum Einfluss der Hyperglykämie auf den glomerulären Filter zeigen, dass vor allem im frühen Verlauf p38 α eine Rolle bei der pathophysiologischen Signaltransduktion spielt. Zwar konnte der protektive Effekt des p38 α -Knockout auf das Oberflächennephrin nicht abschließend gezeigt werden. Die differenzierte Auswertung der Einzelwerte der Versuche zu Tag 4 gibt jedoch einen möglichen Hinweis darauf, dass die Überarbeitung des Versuchsablaufs die Genauigkeit der Versuche erhöhen könnte.

Die Schwierigkeit des STZ-Modells besteht vor allem darin, die Balance zwischen einem maximalen toxischen Effekt auf die β -Zellen bei minimalen toxischen Effekten auf andere Zellen zu erzielen. Nephrotoxische Effekte, die aufgrund der Gabe des STZ und nicht durch den erhöhten Blutzucker entstehen, gilt es dabei unbedingt zu vermeiden. Die einmalige Gabe von 180 $\mu\text{g/gKG}$ STZ in 0,1 M Natriumcitratpuffer hat sich in den Pilotversuchen als geeignet erwiesen. Retrospektiv betrachtet, könnte eine leicht stärkere Dosis von 200 $\mu\text{g/gKG}$ für die Beantwortung der Fragestellung und das Erzielen stärker ausgeprägter Effekte geeigneter sein. Durch die stärkere Zerstörung der β -Zellen und somit einen schneller ansteigenden Blutzuckerspiegel im Versuchsverlauf, könnten die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen stärker hervortreten. Erste, in dieser Arbeit nicht dargestellte Versuche zeigten bei einer einmaligen Gabe von 200 $\mu\text{g/gKG}$ STZ in 0,1 M Natriumcitratpuffer einen deutlicheren Unterschied der Proteinurie bei $p38\alpha^{fl/fl}$ - und $p38\alpha^{PodKO}$ -Tieren.

Festzuhalten bleibt, dass mit dem in dieser Arbeit angewandten Protokoll, der erhoffte protektive Charakter eines podozytenspezifischen p38 α -Knockouts nicht eindeutig bestätigt werden konnte. Ob dies an dem nicht vollständigen p38 α -Knockout, der gegebenenfalls zu geringen STZ-Dosis, oder generell an dem möglicherweise für diese Fragestellung ungeeigneten STZ-Modell liegt, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beantwortet werden. Weitergehende Untersuchungen an anderen Modellen wie der Nephrotoxischen Nephritis oder der ADR-Nephropathie sind für die Beantwortung dieser Frage notwendig.

Eine weitergehende, derzeit noch nicht abgeschlossene Untersuchung des Knockouts soll aufklären, ob mittels Cre-Cre-Verpaarung ein effizienterer Knockout erzielt werden kann. Dabei wurden Cre-heterologe Elterntiere miteinander verpaart, um Cre-homozygote Nachkommen zu erhalten. Erste Versuche hierzu konnten zeigen, dass mittels quantitativer RT-PCR ein Nachkomme dieser Verpaarung die doppelte Menge an Cre-RNA nachgewiesen werden konnte. Ausgangsmaterial dieser Untersuchung war Gewebe aus einer Schwanzspitzenbiopsie. Mit Hilfe dieser Ergebnisse wurde die Selektion einzelner Kandidaten eines Wurfes für weitergehende Analysen realisiert. Dadurch wurde die Isolierung von Primärpodozyten aus $p38\alpha^{Cre-/-}$, $p38\alpha^{Cre+/-}$ und $p38\alpha^{Cre+/+}$ -Tieren ermöglicht. Im Western Blot konnte aus den auf diese Weise gewonnenen Podozyten-Lysaten eine Reduktion um weitere 35% bei den $p38\alpha^{Cre+/-}$ -Tieren gezeigt werden. Dieses vorläufige Ergebnis bedarf weiterer Bestätigung durch erneute Untersuchung anderer Würfe mit gleicher Verpaarung. Mit Hilfe dieser Erkenntnis könnten die durch das Fehlen von $p38\alpha$ im Podozyten hervorgerufenen Effekte, durch eine für die Cre-Rekombinase homozygote Maus entscheidend hervorgehoben werden.

Zusammenfassend konnten mit den Ergebnissen der ADR-Nephropathie und der Nephrotoxischen Nephritis in dieser Arbeit sowohl milde, als auch starke, spontan induzierbare Krankheitsmodelle Anwendung finden. Gemeinsam betrachtet, liefern sie den Eindruck, als dass die erste Reaktion des Podozyten auf unwirtliche Umgebungsverhältnisse die Endozytose von membranständigem Nephrin ist. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Art Rettungssystem für den Podozyten selbst. Hilft dieser Rettungsversuch nicht, die Bedrohung zu überstehen, kommt es im Verlauf unausweichlich zum Verlust von Nephrin und im weiteren Verlauf zum Verlust von ganzen Podozyten. Dies ist deutlich im Doxorubicin-Modell zu erkennen. Bei der Nephrotoxischen Nephritis hingegen, kann durch eine gesteigerte Nephrin Expression und den tendenziell vermehrten Einbau von Nephrin in die Plasmamembran der Verlust von Podozyten sogar teilweise kompensiert werden. Dadurch kann die glomeruläre Filtrationsleistung in Teilen wiederhergestellt werden.

Literatur- und Quellenverzeichnis

Adams, R. H., A. Porras, G. Alonso, M. Jones, K. Vintersten, S. Panelli, A. Valladares, L. Perez, R. Klein and A. R. Nebreda (2000). "Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development." Mol Cell **6**(1): 109-116.

Babayeva, S., B. Rocque, L. Aoudjit, Y. Zilber, J. Li, C. Baldwin, H. Kawachi, T. Takano and E. Torban (2013). "Planar cell polarity pathway regulates nephrin endocytosis in developing podocytes." J Biol Chem **288**(33): 24035-24048.

Bansal, R., N. Ahmad and J. R. Kidwai (1980). "Alloxan-glucose interaction: effect on incorporation of 14C-leucine into pancreatic islets of rat." Acta Diabetol Lat **17**(2): 135-143.

Ben-Levy, R., S. Hooper, R. Wilson, H. F. Paterson and C. J. Marshall (1998). "Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2." Curr Biol **8**(19): 1049-1057.

Boute, N., O. Gribouval, S. Roselli, F. Benessy, H. Lee, A. Fuchshuber, K. Dahan, M. C. Gubler, P. Niaudet and C. Antignac (2000). "NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome." Nat Genet **24**(4): 349-354.

Chen, Z., T. B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt and M. H. Cobb (2001). "MAP kinases." Chem Rev **101**(8): 2449-2476.

Dabla, P. K. (2010). "Renal function in diabetic nephropathy." World Journal of Diabetes **1**(2): 48-56.

Dai, T., R. Natarajan, C. C. Nast, J. LaPage, P. Chuang, J. Sim, L. Tong, M. Chamberlin, S. Wang and S. G. Adler (2006). "Glucose and diabetes: effects on podocyte and glomerular p38MAPK, heat shock protein 25, and actin cytoskeleton." Kidney Int **69**(5): 806-814.

Degasperi, A., M. R. Birtwistle, N. Volinsky, J. Rauch, W. Kolch and B. N. Kholodenko (2014). "Evaluating strategies to normalise biological replicates of Western blot data." PLoS One **9**(1): e87293.

Eid, A. A., Y. Gorin, B. M. Fagg, R. Maalouf, J. L. Barnes, K. Block and H. E. Abboud (2009). "Mechanisms of podocyte injury in diabetes: role of cytochrome P450 and NADPH oxidases." Diabetes **58**(5): 1201-1211.

Gekle, M. (2005). "RENAL TUBULE ALBUMIN TRANSPORT." Annual Review of Physiology **67**(1): 573-594.

Guan, Z., S. Y. Buckman, A. P. Pentland, D. J. Templeton and A. R. Morrison (1998). "Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway." J Biol Chem **273**(21): 12901-12908.

Haase, R., S. A. Potthoff, C. Meyer-Schwesinger, C. Frosch, T. Wiech, U. Panzer, E. Königshausen, J. Stegbauer, L. Sellin, L. C. Rump, I. Quack and M. Woznowski (2017). "A novel in vivo method to quantify slit diaphragm protein abundance in murine proteinuric kidney disease." PLOS ONE **12**(6): e0179217.

Heinrichsdorff, J., T. Luedde, E. Perdiguero, A. R. Nebreda and M. Pasparakis (2008). "p38 alpha MAPK inhibits JNK activation and collaborates with I κ B kinase 2 to prevent endotoxin-induced liver failure." EMBO Rep **9**(10): 1048-1054.

Herold, G. (2017). Innere Medizin. Köln, Herold, Gerd.

Huber, T. B. and T. Benzing (2005). "The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function." Curr Opin Nephrol Hypertens **14**(3): 211-216.

Kalliokoski, O., K. R. Jacobsen, H. S. Darusman, T. Henriksen, A. Weimann, H. E. Poulsen, J. Hau and K. S. P. Abelson (2013). "Mice Do Not Habituate to Metabolism Cage Housing—A Three Week Study of Male BALB/c Mice." PLoS ONE **8**(3): e58460.

- Kestila, M., U. Lenkkeri, M. Mannikko, J. Lamerdin, P. McCready, H. Putaala, V. Ruotsalainen, T. Morita, M. Nissinen, R. Herva, C. E. Kashtan, L. Peltonen, C. Holmberg, A. Olsen and K. Tryggvason (1998). "Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome." Mol Cell **1**(4): 575-582.
- Kriz, W., N. Gretz and K. V. Lemley (1998). "Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit?" Kidney Int **54**(3): 687-697.
- Kriz, W. and K. V. Lemley (2015). "A potential role for mechanical forces in the detachment of podocytes and the progression of CKD." J Am Soc Nephrol **26**(2): 258-269.
- Kriz, W. and K. V. Lemley (2017). "Mechanical challenges to the glomerular filtration barrier: adaptations and pathway to sclerosis." Pediatric Nephrology **32**(3): 405-417.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiol Rev **81**(2): 807-869.
- Lasagni, L., E. Lazzeri, S. J. Shankland, H. J. Anders and P. Romagnani (2013). "Podocyte mitosis - a catastrophe." Curr Mol Med **13**(1): 13-23.
- LeDoux, S. P., S. E. Woodley, N. J. Patton and G. L. Wilson (1986). "Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Alterations in DNA." Diabetes **35**(8): 866-872.
- Lee, J. Y., M. J. Kim, C. K. Moon and J. H. Chung (1993). "Degradation products of streptozotocin do not induce hyperglycemia in rats." Biochem Pharmacol **46**(11): 2111-2113.
- Lenkkeri, U., M. Mannikko, P. McCready, J. Lamerdin, O. Gribouval, P. M. Niaudet, C. K. Antignac, C. E. Kashtan, C. Homberg, A. Olsen, M. Kestila and K. Tryggvason (1999). "Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the finnish type (NPHS1) and characterization of mutations." Am J Hum Genet **64**(1): 51-61.

Like, A. A. and A. A. Rossini (1976). "Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus." Science **193**(4251): 415-417.

Liu, L., S. C. Done, J. Khoshnoodi, A. Bertorello, J. Wartiovaara, P. O. Berggren and K. Tryggvason (2001). "Defective nephrin trafficking caused by missense mutations in the NPHS1 gene: insight into the mechanisms of congenital nephrotic syndrome." Hum Mol Genet **10**(23): 2637-2644.

Liu, X., Q. Fan, G. Yang, N. Liu, D. Chen, Y. Jiang and L. Wang (2013). "Isolating glomeruli from mice: A practical approach for beginners." Exp Ther Med **5**(5): 1322-1326.

Mace, G., M. Miaczynska, M. Zerial and A. R. Nebreda (2005). "Phosphorylation of EEA1 by p38 MAP kinase regulates mu opioid receptor endocytosis." EMBO J **24**(18): 3235-3246.

Menzel, S. and M. J. Moeller (2011). "Role of the podocyte in proteinuria." Pediatr Nephrol **26**(10): 1775-1780.

Moeller, M. J., S. K. Sanden, A. Soofi, R. C. Wiggins and L. B. Holzman (2003). "Podocyte-specific expression of cre recombinase in transgenic mice." Genesis **35**(1): 39-42.

Nagata, M., Y. Yamaguchi and K. Ito (1993). "Loss of mitotic activity and the expression of vimentin in glomerular epithelial cells of developing human kidneys." Anat Embryol (Berl) **187**(3): 275-279.

Ono, K. and J. Han (2000). "The p38 signal transduction pathway: activation and function." Cell Signal **12**(1): 1-13.

Panzer, U., O. M. Steinmetz, H. J. Paust, C. Meyer-Schwesinger, A. Peters, J. E. Turner, G. Zahner, F. Heymann, C. Kurts, H. Hopfer, U. Helmchen, F. Haag, A. Schneider and R. A. Stahl (2007). "Chemokine receptor CXCR3 mediates T cell recruitment and tissue injury in nephrotoxic nephritis in mice." J Am Soc Nephrol **18**(7): 2071-2084.

Pavenstadt, H., W. Kriz and M. Kretzler (2003). "Cell biology of the glomerular podocyte." Physiol Rev **83**(1): 253-307.

Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-183.

Pereira Wde, F., G. E. Brito-Melo, C. A. de Almeida, L. L. Moreira, C. W. Cordeiro, T. G. Carvalho, E. C. Mateo and E. S. A. C. Simoes (2015). "The experimental model of nephrotic syndrome induced by Doxorubicin in rodents: an update." Inflamm Res **64**(5): 287-301.

Purves, W. K. (2006). "Biologie." Elsevier **7. Edition**.

Quack, I., M. Woznowski, S. A. Potthoff, R. Palmer, E. Königshausen, S. Sivritas, M. Schiffer, J. Stegbauer, O. Vonend, L. C. Rump and L. Sellin (2011). "PKC alpha mediates beta-arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia." J Biol Chem **286**(15): 12959-12970.

Raingeaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch and R. J. Davis (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J Biol Chem **270**(13): 7420-7426.

Richard, D., P. Chevalet and T. Soubaya (2013). "Biologie in Farbtafeln." Springer: 145-151.

Rodewald, R. and M. J. Karnovsky (1974). "Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse." J Cell Biol **60**(2): 423-433.

Rossini, A. A., A. A. Like, W. E. Dulin and G. F. Cahill, Jr. (1977). "Pancreatic beta cell toxicity by streptozotocin anomers." Diabetes **26**(12): 1120-1124.

Roux, P. P. (2004). "ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions." **68**(2): 320-344.

Roux, P. P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 320-344.

Ruotsalainen, V., P. Ljungberg, J. Wartiovaara, U. Lenkkeri, M. Kestila, H. Jalanko, C. Holmberg and K. Tryggvason (1999). "Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7962-7967.

Ruxton, G. D. (2006). "The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann–Whitney U test." Behavioral Ecology **17**(4): 688-690.

Satoh, D., T. Hirose, Y. Harita, C. Daimon, T. Harada, H. Kurihara, A. Yamashita and S. Ohno (2014). "aPKC λ maintains the integrity of the glomerular slit diaphragm through trafficking of nephrin to the cell surface." J Biochem **156**(2): 115-128.

Sauer, B. (1987). "Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **7**(6): 2087-2096.

Schnedl, W. J., S. Ferber, J. H. Johnson and C. B. Newgard (1994). "STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells." Diabetes **43**(11): 1326-1333.

Siegenthaler, W. (2006). Klinische Pathophysiologie : 239 Tabellen. Stuttgart u.a., Thieme.

Stambe, C., R. C. Atkins, P. A. Hill and D. J. Nikolic-Paterson (2003). "Activation and cellular localization of the p38 and JNK MAPK pathways in rat crescentic glomerulonephritis." Kidney Int **64**(6): 2121-2132.

Stambe, C., D. J. Nikolic-Paterson, P. A. Hill, J. Dowling and R. C. Atkins (2004). "p38 Mitogen-activated protein kinase activation and cell localization in human glomerulonephritis: correlation with renal injury." J Am Soc Nephrol **15**(2): 326-336.

Sussman, A. N., T. Sun, R. M. Krofft and R. V. Durvasula (2009). "SPARC accelerates disease progression in experimental crescentic glomerulonephritis." Am J Pathol **174**(5): 1827-1836.

Takenaka, K., T. Moriguchi and E. Nishida (1998). "Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest." Science **280**(5363): 599-602.

Tryggvason, K. (1999). "Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm." J Am Soc Nephrol **10**(11): 2440-2445.

Tryggvason, K., J. Patrakka and J. Wartiovaara (2006). "Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria." N Engl J Med **354**(13): 1387-1401.

Vavra, J. J., C. Deboer, A. Dietz, L. J. Hanka and W. T. Sokolski (1959). "Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic." Antibiot Annu **7**: 230-235.

Wang, Y., Y. P. Wang, Y. C. Tay and D. C. Harris (2000). "Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events." Kidney Int **58**(4): 1797-1804.

Wartiovaara, J., L. G. Ofverstedt, J. Khoshnoodi, J. Zhang, E. Makela, S. Sandin, V. Ruotsalainen, R. H. Cheng, H. Jalanko, U. Skoglund and K. Tryggvason (2004). "Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography." J Clin Invest **114**(10): 1475-1483.

Danksagung

Vielmals möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, welche mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt Frau Dr. med. Magdalena Woznowski und Herrn Prof. Dr. med. Ivo Quack für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema arbeiten zu dürfen. Auch für den kreativen Freiraum bei der Bearbeitung dieser komplexen Fragestellung danke ich ihnen vielmals. Ihre Begeisterung für den Podozyten und die glomeruläre Schlitzmembran haben mich auch in schwierigen Zeiten immer wieder motiviert.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. L. C. Rump bedanken, dass ich diese Arbeit in seinem Institut durchführen konnte.

Bei Herrn Prof. Dr. William F. Martin möchte ich mich vielmals für die Erstellung des Zweitgutachtens und die unkomplizierte Betreuung bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Christina Schwandt, Frau Blanka Duvnjak und Frau Nicola Kuhr für die Unterstützung im Labor bedanken. Ihre hilfsbereite Art und ihr stets offenes Ohr waren mir eine sehr große Hilfe. Ebenso geht mein Dank an alle weiteren Mitglieder der Experimentellen Nephrologie für ihre Unterstützung, die interessanten Diskussionen und ihren Rat.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Frau Clara Frosch für die besonders lustigen Zeiten im Labor. Es war mir eine ganz besondere Freude an ihrem medizinischen Wissen teilhaben zu dürfen und mit ihr umfangreiche fachliche Diskussionen führen zu können. Dadurch konnte ich interdisziplinäre Zusammenarbeit auf einem ganz neuen Niveau kennenlernen.

Vor allem aber bedanke ich mich bei meiner Familie und bei meiner Freundin für die Unterstützung und die Geduld. Ihr habt mir sehr geholfen und wart immer für mich da!

Vielen lieben Dank!

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ort, Datum

Raphael Haase

Anhang

Bildrechte für verwendete Abbildungen

Abbildung 1:

Verwendung der Abbildung zur Darstellung oder Veröffentlichung in dieser Dissertation genehmigt durch das *Copyright Clearance Center* unter der Bestätigungsnummer 11703891.

Abbildung 2:

Reproduced with permission from *Tryggvason, Patrakka et al. (2006)*, Copyright Massachusetts Medical Society.

Entsprechend der Angaben der *Massachusetts Medical Society (MMS)* ist die Verwendung dieser Abbildung in Dissertationen auch ohne formale Genehmigung gestattet.

Abbildung 3:

Verwendung der Abbildung zur Darstellung oder Veröffentlichung in dieser Dissertation genehmigt durch das *Copyright Clearance Center* unter der Bestätigungsnummer 11703894.

Abbildung 4A:

Verwendung der Abbildung zur Darstellung oder Veröffentlichung in dieser Dissertation genehmigt durch das *Copyright Clearance Center* unter der Bestätigungsnummer 11703897.

Abbildung 4B:

Verwendung der Abbildung zur Darstellung oder Veröffentlichung in dieser Dissertation genehmigt durch das *Copyright Clearance Center* unter der Bestätigungsnummer 11703898.

Abbildung 6:

Reproduced with permission from *Tryggvason, Patrakka et al. (2006)*, Copyright Massachusetts Medical Society.

Entsprechend der Angaben der Massachusetts Medical Society (MMS) ist die Verwendung dieser Abbildung in Dissertationen auch ohne formale Genehmigung gestattet.

Abbildung 10:

Verwendung der Abbildung zur Darstellung oder Veröffentlichung in dieser Dissertation genehmigt durch das *Copyright Clearance Center* unter der Lizenznummer 4305541122781.

Abbildung 11:

Eine schriftliche Genehmigung von *Spandidos Publications* zur Verwendung der Abbildung im Rahmen dieser Dissertation liegt vor. Diese Bestätigung wurde in Form einer E-Mail am 15. Juni 2017 13:24 Uhr zugesandt.

Abbildung 12, Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 22, Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 25, Abbildung 27, Abbildung 28, Abbildung 29, Abbildung 30, Abbildung 31:

Bei der Originalpublikation handelt es sich um einen frei zugänglichen Artikel, welcher uneingeschränkt genutzt, verteilt und reproduziert werden darf. Er unterliegt der Creative Commons Attribution License.

„© 2017 Haase et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.“
(zitiert von <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0179217> am 11. März 2018 11:38 Uhr)